

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA

ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS Y
BIOFARMACÉUTICOS DEL ACAMPROSATO EN LA RATA

TEODORO ZORNOZA SABINA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 28 de Novembre de 2003 davant un tribunal format per:

- D^a. Marina Herráez Domínguez
- D^a. Francisca Torres Molina
- D. Martiniano Santiago Pavón
- D. Juan Sastre Belloch
- D. Rafael Vicente Martín Algarra

Va ser dirigida per:

D^a. Ana Polache Vengut

D. Luis Granero Maciá

D^a. Consuelo Guerri Sirera

©Copyright: Servei de Publicacions
Teodoro Zornoza Sabina

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5877-5

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



Facultat de Farmàcia

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

Estudios Farmacocinéticos y Biofarmacéuticos del Acamprosato en la rata

Memoria que para optar al grado de Doctor en Farmacia presenta

Teodoro Zornoza Sabina

Valencia, Julio 2003



Facultat de Farmàcia

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

Los que suscriben, **Dra. Ana Polache Vengut** y **Dr. Luis Granero Maciá**, Profesores Titulares del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica, y **Dra. Consuelo Guerri Sirera**, investigadora titular del Instituto Valenciano de Investigaciones Biomédicas

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D. Teodoro Zornoza Sabina que lleva por título: "**Estudios Farmacocinéticos y Biofarmacéuticos del Acamprosatato en la rata**" ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Lo que suscriben en Valencia, a 28 de Julio de 2003.

Fdo. Dra. Ana Polache Vengut

Fdo. Dr. Luis Granero Maciá

Fdo. Dra. Consuelo Guerri Sirera

Esta Tesis doctoral ha sido realizada gracias al Proyecto financiado “Optimización de la farmacoterapia de la dependencia alcohólica con acamprosato: estudios de los mecanismos de absorción y eliminación del fármaco: estrategias para la mejora de las pautas posológicas” (GV99-119-1-4), otorgado por la Conselleria de Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana, y con la ayuda de una beca de Formación de Profesorado Universitario otorgada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Hace aproximadamente cinco años, que el destino quiso que yo tropezara con dos personas maravillosas como son, Ana y Luis. Su talento innato, unido a su capacidad de trabajo y sacrificio hizo que en menos de nueve meses yo tuviera depositada mi Tesis de Licenciatura. Por aquel entonces ya traté de expresar lo afortunado que me sentía al haberlos conocido y el exquisito trato que me habían proporcionado. Pero bueno, como en las mejores parejas, al principio todo es perfecto, pero con el tiempo pueden aparecer las diferencias y los problemas de “convivencia”. Sin embargo, en nuestro caso, el tiempo sólo ha servido para unirnos más y que nos apreciemos como los mejores amigos, o al menos así yo lo siento y me lo hacen sentir. Aunque parezca un tópico, yo pregunto, ¿quién no ha discutido en cinco años con un amigo?, o más fácil todavía, ¿qué doctorando no lo ha hecho con su director? Pues bueno, por lo menos ya puedo presumir de algo que muy pocos hemos conseguido: nunca nos hemos peleado y de lo único que hemos disfrutado es de la risa y el buen humor. Quiero que todas las personas que tengan la oportunidad de leer estas líneas, aunque sea por simple curiosidad de..... “a ver que ha puesto en los agradecimientos” sepan quienes son Ana Polache y Luis Granero. Ambos son ese tipo de personas que “valen la pena” y que uno siempre quiere tener a su lado. Además de una formación científico-académica, me habéis transmitido otros valores humanos que nunca os podré devolver. La deuda contraída es impagable, lo único que puedo deciros es GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS por todo lo que me habéis dado. Aunque espero que lo sepáis, siempre estaré para todo aquello que me pidáis.

Marisol, gracias por tu infinita comprensión y paciencia con “lo” del portátil. ¡¡Andrés, eres un tío cojonudo!! ¡¡Amunt València!!

¿Alguien conoce a Consuelo Guerri? Desde aquí invito a la gente que lea estas líneas a que le hagan una rápida búsqueda bibliográfica¿qué os ha parecido?Como se puede observar se trata de la especialista número uno del mundo en el tema del alcoholismo. Si su currículum como investigadora es sencillamente apabullante, su currículum como persona lo es todavía más. Chelo, nunca olvidaré el detalle que tuviste hacia mí, y más aún cuando todavía no sabías quien era yo. Gracias.

...y como todas las buenas familias, al tiempo apareció el primer “retoño”, Mary Joe. MJ es el equilibrio que nos faltaba a todos; bueno mejor pensado, el “desequilibrio”. La verdad que eres un pozo de bondad y de buenos sentimientos, y eso es, al fin y al cabo lo que vale. Hemos gestado unos lazos afectivos que durarán toda la vida. ¿Te imaginas cuando yo lleve un taca-taca y unos pañales de cometa y aún me amenaces con un “te vii a rajaaá”. Desde aquí quiero darte las gracias por ser como eres, tan buena, tan cariñosa y tan tú.

Pero si alguien da alegría a un hogar, esos son los amigos que siempre están en tu casa bebiéndose las cervezas que tú te preocupas de “religiosamente” tener bien fresquitas. Ricardo, Raúl, Carlos e Issam, esos sois mis amigos. Todos habéis jugado un papel fundamental en el desarrollo de este trabajo y desde aquí quiero expresaros mi absoluta amistad. Y digo yo ¿qué culpa tiene Ricardo de que le guste la informática? Pues eso, sólo puedo pedirte perdón por las veces que te he molestado, incluso invadiendo tu casa los fines de semana y darte las mas sinceras de las “gracias”. ¿Qué puedo decir de Zipi y Zape que no se sepa? Pocas personas habrán con un corazón tan grande y ese buen humor como Raúl y Carlos. En cuanto a Issam, bien sabe que tiene las puertas de mi casa abiertas si algún día quiere volver de Londres, aunque realmente lo que me

colmaría de felicidad es que pudiera volver a Palestina. ¡¡Ánimo Issam!!

Pero si alguien ha jugado un papel básico en todo este trabajo ha sido Jose María. El día que nos dejaste, te llevaste una parte de mí. Las lecciones del “tío Jose María” siempre retumbarán en mi interior, y a pesar de no encontrarte entre nosotros tu llama siempre me guiará.

Otra persona fundamental en mi corta trayectoria científica es Arturo. Él fue mi primer maestro, y eso no lo olvidaré nunca, él fue quien me bautizó en las técnicas experimentales y me llevó de la mano cuando empecé a andar en el duro hábitat del laboratorio. Siendo purista, no he debido decir “fue” sino “es” puesto que cada vez que lo veo me enseña algo nuevo. Arturo: Siempre serás mi Maestro.....Gracias por todo y especialmente por ser como eres. El Dr. Juan Condomina es otro de los personajes que ha aparecido en mi corta pero intensa historia. “Joé” como impone eso de “El doctor Condomina”...., pero..... si es “Juanillo”, en tío más auténtico que he conocido nunca. ¿Y que puedo decir de Nima? Sin duda alguna otra persona peculiar y muy muy especial. En el grupo te echamos constantemente de menos, siempre has aportado lo más bonito y lo que más falta en la sociedad que nos ha tocado vivir: la risa y el buen humor.....¿Acaso tendrá la culpa un Bogavante?

Pero si una etapa ha sido “dura” y a la vez “gratificante” para mí, esa ha sido mi “Estancia Breve” en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de Sevilla. “Dura” por el simple hecho de tener que adaptarte a un lugar nuevo, con gente nueva, con “jefes” nuevos,...“gratificante” porque nunca he conocido a gente tan buena y tan acogedora. Desde el primer día me hicisteis sentir como en casa. Además de introducirme en el extenso y apasionante mundo de la neurociencia, a convertir ratas “plebeyas” en ratas de “sangre azul” o a como destrozarse un cerebro en el criostato por acabar antes, lo más grande que me habéis dado es vuestra amistad. Perdonadme por no haber ido todavía a veros. Marti, gracias por dejarme ser amigo tuyo, pero amigo de esos que son para toda la vida. Gracias a Mayka, Inma, Rocío, Isita y Rosa por dejarme ser “una más”; siempre os llevaré en el corazón. Gracias a Fina y Don Alberto por abrirme las puertas de su Casa desde el primer día, así como a José Luis, Marisa, Antonio Ayala y Antonio J por su amistad y comprensión.

Recientemente he comenzado una nueva estancia en el Departamento de Psicobiología de la Universitat Jaume I de Castellón. En el poco tiempo que llevo ya puedo decir que he tropezado con un grupo exquisito, tanto desde el punto de vista humano como científico. Gracias a todos por tratarme tan bien. Gracias a Carlos, Marta, Mercé, Héctor, Raúl, Laura, Alicia, Gema y Juanjo.

No querría dejar de acordarme de la Dra. Francisca Torres-Molina, un torrente de bondad, buena, noble y transparente. Su sencillez llega hasta el punto de que tal vez sea la única persona de este país que aún pregunta: ¿Qué es eso del “Gran Hermano”?... Respecto a José Esteban Peris me gustaría resaltar su habilidad docente así como su calidad humana; gracias por transmitirme mis primeros conocimientos en el difícil campo de la estadística. Desde aquí también querría darles las gracias a todos aquellos profesores del Departamento que en algún momento me hayan echado una mano en mis problemas del día a día.

Los años que he pasado en esta “Casa” me han servido para conocer a muchas personas, al fin y al cabo, creo que todos hemos tenido suerte de encontrarnos aquí. Gracias a todos. Gracias a

Amparo Montesinos, Eduardo, Eva, Alejandra, Patricio, Víctor, “Isa” Vicent, Manoli, Jaume, Jaime, Marga, Isabel, Carlos, Belén, Rocío, M^a Ángeles,...

Para ir concluyendo me gustaría mentar a mis más estrechos colaboradores: David, José Manuel, Nacho, Jorge, Jose, Raquel y Begoña. Posiblemente, tengáis un dominio del tema de esta Tesis mayor que yo, y no lo digo porque verse acerca del alcoholismo.....Todos los días doy gracias por haber conseguido tener un grupo de amigos así. ¡¡¡Normal que nos tengan envidia!!! Y si el objetivo último de una Tesis es “descubrir”, imagino que el hecho de “redescubrir” aún tendrá mucho más valor; a mi GRAN GRAN amigo Pepe, su mujer Yolanda y sus dos retoños, Pepe y María. Espero que formemos una pequeña gran familia.

También sé que desde el cielo mis “abuelos de Tous” estarán infinitamente orgullosos de mí. Puesto que nunca te lo pude decir: “gracias abuela por ser una persona tan buena. Sólote quejaste una vez y fue para morirme.....me debes una”.

Finalmente quiero gritar por el amor que siento hacia mis Padres. Sé de buena tinta que todo lo que habéis hecho en esta vida ha ido encaminado hacia un mismo objetivo: Yo. Quiero que sintáis este trabajo como propio. Si vosotros no sois Doctores es simplemente porque el día que acabasteis la carrera empezasteis a levantar los cimientos que yo disfruto. GRACIAS por todo lo que me habéis dado, lo que me dais cada día y lo que sé que me daréis, porque sé que nunca dejareis de darme amor, amor del puro, amor del que se puede cortar. ¡Abuela! Gracias por dejarme ser tu quinto hijo; ¡Abuelo! Siempre has sido el espejo en el que me he mirado. Aunque nos separen más de 3000 kilómetros, os llevo guardaditos en el corazón.

Pero si alguien tiene la culpa de todo esto es mi mujer, Susana. Siempre has sido mi principal valedora. Tú me animaste a seguir estudiando y a embarcarme en este lío. Bien sabes que hemos tenido que pagar un precio muy caro por esta Tesis; espero poderte devolver todo lo que te debo. Gracias por hacerme sentir el hombre más feliz del Mundo. TE QUIERO

¡¡HASTA LUEGOOO!!

A Ana, Chelo y Luis

A mi familia

A mis padres

A Susana

INTRODUCCIÓN.....	7
1. ANTECEDENTES	11
1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ACAMPROSATO	11
1.1.1 Estructura química	11
1.1.2 Propiedades físico-químicas	12
1.1.3 Propiedades farmacológicas.....	13
1.2 FARMACOCINÉTICA DEL ACAMPROSATO.....	17
1.2.1 Farmacocinética en animales	17
1.2.2 Farmacocinética en voluntarios sanos.....	19
1.2.2.1 Absorción.....	19
1.2.2.2 Distribución	23
1.2.2.3 Metabolismo y excreción	23
1.2.2.4 Linealidad farmacocinética.....	24
1.2.3 Farmacocinética en pacientes con insuficiencia hepática	27
1.2.4 Farmacocinética en pacientes con disfunción renal.....	28
1.2.5 Farmacocinética en el paciente alcohólico	30
1.2.6 Interacciones con los alimentos.....	33
1.2.7 Interacciones con otros fármacos.....	36
1.2.8 Influencia de la edad y el sexo en la farmacocinética del acamprosato.....	37
1.3 ABSORCIÓN INTESTINAL Y MECANISMOS PARA SU PROMOCIÓN.....	39
1.3.1 Mecanismos de absorción intestinal.....	39
1.3.2 Mecanismos implicados en la absorción del acamprosato.....	41
1.3.3 Promoción de la absorción intestinal.....	43
1.4 OBJETIVOS	47
2. MATERIALES Y MÉTODOS	49
2.1 COMPUESTOS ENSAYADOS.....	49
2.2 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.....	52
2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ELIMINACIÓN	53
2.3.1 DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN INALTERADA DE ACAMPROSATO EN ORINA TRAS ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA RÁPIDA	53
2.3.1.1 Soluciones de trabajo.....	53
2.3.1.2 Métodos quirúrgicos.....	54
2.3.1.2.1 Implantación de la cánula en la vejiga urinaria	55
2.3.1.2.2 Implantación de la cánula en la vena yugular.....	57
2.3.1.3 Protocolo experimental.....	60
2.3.1.4 Tratamiento analítico y valoración de las muestras.....	61

2 Índice

2.3.1.4.1	Valoración de acamprosato	62
2.3.1.4.1.1	Evaluación de la técnica analítica: exactitud y precisión	63
2.3.1.4.2	Valoración de inulina	63
2.3.1.4.2.1	Rectas de calibración. Evaluación de la linealidad del método analítico. ..	64
2.3.1.5	Cálculos farmacocinéticos.....	65
2.3.2	CURVAS DE NIVEL PLASMÁTICO TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA RÁPIDA DE TRES DOSIS DE ACAMPROSATO	66
2.3.2.1	Soluciones de trabajo	66
2.3.2.2	Métodos quirúrgicos.....	67
2.3.2.3	Protocolo experimental.....	67
2.3.2.4	Tratamiento analítico y valoración de las muestras.....	70
2.3.2.4.1	Cálculo de las concentraciones de acamprosato	71
2.3.2.4.2	Evaluación de la técnica analítica: exactitud y precisión	71
2.3.2.5	Métodos farmacocinéticos.....	73
2.3.3	ESTIMACIÓN DE LOS ACLARAMIENTOS TOTAL Y RENAL DEL ACAMPROSATO EN ESTADO ESTACIONARIO	76
2.3.3.1	Soluciones de trabajo	76
2.3.3.2	Métodos quirúrgicos.....	77
2.3.3.3	Protocolo experimental.....	77
2.3.3.4	Tratamiento analítico y valoración de las muestras.....	79
2.3.3.4.1	Valoración de ¹⁴ C-acamprosato.....	80
2.3.3.4.2	Valoración de inulina	80
2.3.3.5	Cálculo de los aclaramientos renal, total y velocidad de filtración glomerular .	81
2.3.4	EFFECTOS DEL PROBENECID SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DEL ACAMPROSATO	83
2.3.4.1	Soluciones de trabajo	83
2.3.4.2	Técnica quirúrgica	84
2.3.4.3	Protocolo experimental.....	84
2.3.4.4	Tratamiento analítico y valoración de las muestras.....	85
2.4	ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DEL ACAMPROSATO	86
2.4.1	ADMINISTRACIÓN POR VÍA ORAL DE ACAMPROSATO. CÁLCULO DE BIODISPONIBILIDAD EN MAGNITUD.....	86
2.4.1.1	Soluciones de trabajo	86
2.4.1.2	Técnica quirúrgica	87
2.4.1.3	Protocolo experimental.....	87
2.4.1.4	Tratamiento analítico y valoración de muestras.....	90
2.4.1.5	Cálculos farmacocinéticos.....	92
2.4.1.5.1	Cálculo de los parámetros farmacocinéticos tras administración oral.....	92
2.4.1.5.2	Determinación de la biodisponibilidad en magnitud	93

2.4.2	ESTUDIO TOPOGRÁFICO DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE ACAMPROSATO. PERFUSIÓN <i>IN SITU</i>	94
2.4.2.1	Soluciones de trabajo	94
2.4.2.2	Técnica quirúrgica	95
2.4.2.3	Protocolo experimental.....	98
2.4.2.4	Tratamiento analítico y valoración de las muestras.....	100
2.4.2.4.1	Cálculo de las concentraciones remanentes de acamprosato.....	101
2.4.2.4.2	Evaluación de la técnica analítica: exactitud y precisión	101
2.4.2.4.3	Preparación de las muestras	102
2.4.2.5	Determinación de la constante aparente de velocidad de absorción.....	103
2.4.2.5.1	Cálculo de la velocidad de reabsorción de agua.....	103
2.4.2.5.2	Cálculo de la constante aparente de velocidad de absorción	105
2.4.3	ENSAYOS DE PROMOCIÓN DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE ACAMPROSATO	109
2.4.3.1	<i>Ensayos In situ</i>	109
2.4.3.1.1	<i>Soluciones de trabajo</i>	109
2.4.3.1.2	<i>Técnica quirúrgica</i>	110
2.4.3.1.3	<i>Protocolo experimental</i>	111
2.4.3.1.4	<i>Tratamiento analítico y valoración de las muestras</i>	113
2.4.3.1.5	<i>Determinación de la constante aparente de velocidad de absorción</i>	114
2.4.3.2	<i>Ensayos In vivo: administración oral</i>	114
2.4.3.2.1	<i>Soluciones de trabajo</i>	114
2.4.3.2.2	<i>Técnica quirúrgica</i>	115
2.4.3.2.3	Protocolo experimental	115
2.4.3.2.4	<i>Tratamiento analítico y valoración de las muestras</i>	116
2.4.3.2.5	<i>Cálculos farmacocinéticos. Cálculo de la biodisponibilidad en magnitud</i>	116
2.4.3.3	<i>Ensayos In vitro. Cultivos celulares</i>	117
2.4.3.3.1	<i>Soluciones de trabajo</i>	117
2.4.3.3.2	<i>Mantenimiento de las líneas celulares</i>	121
2.4.3.3.2.1	Crecimiento en frascos	121
2.4.3.3.2.2	Dilución celular y cambio a un nuevo frasco	123
2.4.3.3.2.3	Congelación.....	124
2.4.3.3.2.4	Descongelación.....	125
2.4.3.3.3	<i>Ensayo de permeabilidad</i>	126
2.4.3.3.3.1	Preparación de las membranas	127
2.4.3.3.3.2	Sembrado celular y crecimiento.....	127
2.4.3.3.3.3	Ensayo de permeabilidad	130
2.4.3.3.3.4	Comprobación de la monocapa.....	130
2.4.3.3.4	<i>Protocolo experimental</i>	132

4 Índice

2.4.3.3.5	<i>Tratamiento analítico y valoración de las muestras</i>	133
2.4.3.3.5.1	Rectas de calibración. Evaluación de la precisión y exactitud del método analítico	133
2.4.3.3.5.2	Preparación de las muestras	134
2.4.3.3.6	<i>Cálculo del coeficiente de permeabilidad</i>	135
2.5	MÉTODOS MATEMÁTICOS Y ESTADÍSTICOS	137
2.5.1	Programas utilizados en el análisis de regresión	137
2.5.2	Criterios de calidad de los ajustados.....	137
2.5.3	Criterios de selección de modelo	139
2.5.4	Pruebas de comparación de medias	141
3.	RESULTADOS.....	143
3.1	EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	143
3.1.1	Determinación de acamprosato	143
3.1.2	Determinación de ¹⁴ C-acamprosato.....	146
3.1.3	Determinación de inulina	154
3.1.4	Determinación de ¹⁴ C-manitol.....	156
3.2	CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ELIMINACIÓN DEL ACAMPROSATO	158
3.2.1	Determinación de la fracción inalterada de acamprosato en orina tras administración intravenosa rápida	159
3.2.2	Curvas de nivel plasmático tras la administración intravenosa rápida de tres dosis de acamprosato.....	161
3.2.2.1	Niveles plasmáticos.....	161
3.2.2.2	Elección del modelo farmacocinético	170
3.2.2.3	Parámetros farmacocinéticos.....	172
3.2.2.4	Análisis estadístico de los resultados.....	178
3.2.3	Estimación de los aclaramientos total y renal del acamprosato en estado estacionario	180
3.2.3.1	Parámetros farmacocinéticos.....	180
3.2.3.2	Análisis estadístico de los resultados.....	183
3.2.4	Estudio del efecto del probenecid sobre la farmacocinética del acamprosato ...	185
3.2.4.1	Niveles plasmáticos.....	185
3.2.4.2	Elección del modelo farmacocinético	191
3.2.4.3	Parámetros farmacocinéticos.....	193
3.2.4.4	Análisis estadístico de los resultados.....	197

3.3	ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE ACAMPROSATO	199
3.3.1	Administración por vía oral del acamprosato. Cálculo de su biodisponibilidad en magnitud.....	199
3.3.1.1	<i>Niveles plasmáticos</i>	199
3.3.1.2	Elección del modelo farmacocinético	206
3.3.1.3	Parámetros farmacocinéticos.....	208
3.3.2	Estudio topográfico de la absorción intestinal de acamprosato.....	212
3.3.3	Ensayos para la promoción de la absorción intestinal del acamprosato.....	217
3.3.3.1	Ensayos <i>In situ</i>	218
3.3.3.1.1	Ensayos con polisorbato 80	218
3.3.3.1.2	Ensayos con caprato sódico.....	224
3.3.3.2	<i>Ensayos In vivo</i>	234
3.3.3.3	<i>Ensayos In vitro</i>	236
4.	DISCUSIÓN	251
4.1	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	251
4.2	ESTUDIO DE LA ELIMINACIÓN DEL ACAMPROSATO	254
4.2.1	Linealidad cinética y eliminación del acamprosato.....	254
4.2.2	Efecto del probenecid en la farmacocinética del acamprosato	258
4.3	ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE ACAMPROSATO	260
4.3.1	Administración por vía oral de acamprosato.....	260
4.3.2	Estudio topográfico de la absorción intestinal de acamprosato.....	263
4.3.3	Promoción de la absorción intestinal del acamprosato.....	246
5.	RESUMEN Y CONCLUSIONES	273
6.	BIBLIOGRAFÍA	277

INTRODUCCIÓN

Las **recaídas en el consumo de alcohol** son uno de los problemas más importantes con los que se enfrentan, el paciente alcohólico sometido a tratamiento deshabitador por un lado, y el equipo clínico que lo trata, por otro. Hay que tener en cuenta que alrededor del 50% de los pacientes alcohólicos recaen durante los 3 meses siguientes a la finalización de su tratamiento usual (WHITHWORT, 1996). Por consiguiente, en la actualidad, uno de los principales objetivos en el tratamiento de la dependencia alcohólica es aumentar la tasa de abstinencia tras la interrupción brusca del consumo de alcohol (LITTEN y ALLEN, 1998).

Hasta hace relativamente poco tiempo, el arsenal terapéutico disponible para este tipo de tratamientos quedaba prácticamente restringido a los fármacos aversivos o interdictores (disulfiram y cianamida) que junto con el tratamiento psicoterapéutico constituyen los pilares básicos de las actuaciones clínicas. Sin embargo, los importantes

8 *Introducción*

avances que se han venido realizando en la comprensión de los mecanismos neurofisiológicos implicados en la adicción al etanol han supuesto un impulso decisivo para la búsqueda de nuevos fármacos que permitan la prevención de recaídas. En esta línea, se introdujo en España en 1997 y en 1995 en otros países de la Unión Europea, el **acamprosato**.

El acamprosato (bisacetilhomotaurinato cálcico) ha demostrado ser un fármaco eficaz en el mantenimiento de la abstinencia en pacientes dependientes del alcohol. La eficacia de este fármaco se ha atribuido a su efecto "anticraving", es decir a su capacidad para disminuir el deseo compulsivo de consumir alcohol (LITTLETON, 1995; SPANAGEL y ZIEGLGANSBERGER, 1997). El tratamiento con acamprosato debe iniciarse inmediatamente tras el periodo agudo de desintoxicación y mantenerse durante, al menos, 6-12 meses. Se administra en forma de comprimidos con recubrimiento gastrorresistente a la dosis de 2 g/día y a intervalos de tiempo de aproximadamente 8 horas.

A pesar de su probada eficacia, se conocen pocos datos sobre su farmacocinética. De hecho, los pocos estudios existentes, por no decir la totalidad de los mismos, son documentos internos del laboratorio preparador (realizados en su mayoría en humanos) a los cuales han tenido acceso Saivin y cols. y que se referencian en el trabajo de revisión publicado por este grupo (SAIVIN y cols., 1998). Por tanto, aunque muchos datos manejados en la presente Memoria se han obtenido a partir de este trabajo, se ha considerado oportuno citar la fuente original, la cual se ha precedido de un asterisco (*).

El principal problema en el manejo clínico del acamprosato deriva de su baja biodisponibilidad oral. Numerosos estudios (SAIVIN y cols., 1998), (CHABENAT y cols., 1988) y (monografía MERCK, 1997) han puesto de manifiesto que la absorción intestinal del acamprosato es errática y muy escasa, obteniendo datos de biodisponibilidad en magnitud en humanos que, en promedio, pueden situarse en torno al 10% (*FOURTILLAN, 1990; *SCOTT, 1991). Este hecho obliga a la administración de elevadas dosis diarias, lo que encarece y hace más incómodos para el paciente los tratamientos con este fármaco, y, lo que es más grave, puede ser el responsable del fracaso terapéutico detectado en una cierta proporción de pacientes tratados.

El trabajo desarrollado en la presente Memoria pretende subsanar esta falta de datos

desde un punto de vista farmacocinético, con el objetivo de poder recurrir al diseño biofarmacéutico para optimizar la terapia con este fármaco. En concreto, los aspectos menos conocidos de su farmacocinética están relacionados con dos de los procesos más importantes del ADME: absorción y eliminación.

El **estudio de los mecanismos implicados en la eliminación del acamprosato** en la rata se ha abordado, a través de diversos y sencillos diseños experimentales. Para ello, en primer lugar, se ha caracterizado la ausencia de rutas metabólicas implicadas en la eliminación del fármaco. Posteriormente se ha estudiado la linealidad farmacocinética del acamprosato en la rata tras su administración por vía intravenosa rápida. Al mismo tiempo, se ha profundizado en el conocimiento de los mecanismos implicados en la excreción renal de este compuesto mediante la perfusión endovenosa del mismo a tres velocidades diferentes hasta alcanzar el estado estacionario, determinándose los valores de aclaramiento total y renal del fármaco. Finalmente se han realizado diversos experimentos en los que se ha administrado conjuntamente el acamprosato con el probenecid, conocido inhibidor de la secreción tubular activa de diversos fármacos a nivel renal.

Por otro lado y con el objetivo de identificar las causas de la escasa biodisponibilidad oral en magnitud del acamprosato, se continuó con el **estudio de la absorción intestinal** de este fármaco en la rata, iniciado con anterioridad por nuestro grupo investigador. Para un análisis íntegro de la fase de absorción del fármaco, se ha empleado un amplio abanico de técnicas experimentales. Primeramente se estimó el valor de biodisponibilidad en magnitud del fármaco tras su administración oral. Al mismo tiempo se ha intentado dilucidar el motivo o motivos de su exiguo valor, así como incrementarlo de un modo significativo con el empleo de promotores de la absorción intestinal. Para ello, utilizando una sencilla técnica de perfusión *in situ*, se ha perfundido conjuntamente el acamprosato con el polisorbato 80 o con el caprato sódico, dos conocidos promotores de la absorción intestinal transcelular y paracelular, respectivamente. A la luz de los resultados obtenidos, se realizaron ensayos adicionales con el caprato sódico en condiciones *in vivo* e *in vitro* (células Caco-2)

1. ANTECEDENTES

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ACAMPROSATO

1.1.1 Estructura química

El fármaco objeto de estudio de la presente Memoria es el acamprosato, cuya denominación química es bisacetilhomotaurinato cálcico o bisacetilaminopropano sulfonato cálcico.

Posee un peso molecular de 403.39 g/mol, y su estructura es análoga a la de ciertos aminoácidos farmacológicamente activos como taurina, GABA y glutamato (LITTLETON, 1995). El ¹⁴C-acamprosato, empleado también en la presente Memoria, cuenta en su estructura con el isótopo radiactivo del carbono según se representa en la *Figura 1.1*.

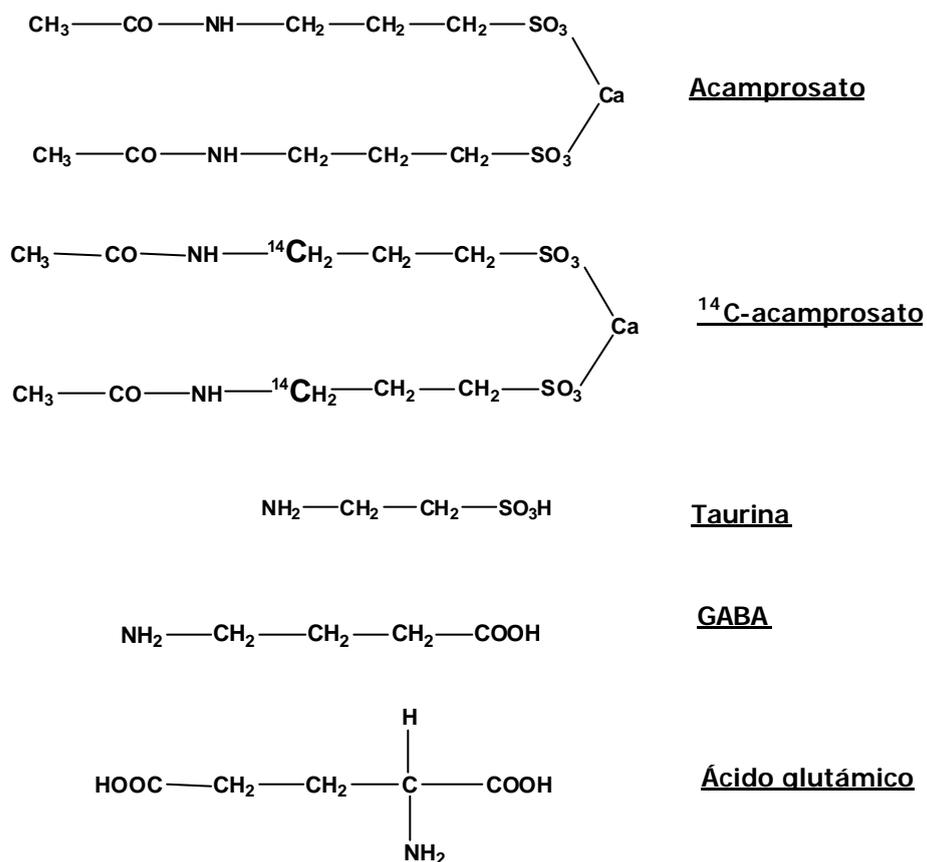


Figura 1.1 Representación gráfica de la estructura química de acamprosato, ^{14}C -acamprosato, taurina, ácido γ -aminobutírico (GABA) y ácido glutámico.

1.1.2 Propiedades físico-químicas

Es un polvo blanco, inodoro o prácticamente inodoro y de sabor amargo. Es soluble en agua, en un medio gástrico artificial y en la mayoría de fluidos biológicos (FAUS y cols., 1996).

En disolución acuosa se encuentra casi totalmente disociado (98%) (CHABENAT y cols., 1988) originando dos moléculas de acetilhomotaurinato y un ión de Ca^{+2} .

Sus disoluciones acuosas presentan un pH entre 5.5 y 7.0. Los estudios potenciométricos confirman que el acamprosato es una base débil, por lo que el pH de sus disoluciones acuosas está próximo al del agua destilada. De aquí se deduce que su ácido conjugado, el ácido acetilhomotaurínico, es un ácido fuerte (CHABENAT y cols., 1988).

Las propiedades físico-químicas y organolépticas del ^{14}C -acamprosato son iguales a las del producto no radiactivo.

La estabilidad del acamprosato fue estudiada por Chabenat y cols. en 1988 con ayuda de un espectrofotómetro de absorción UV y un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) provisto de un detector de UV. La estabilidad del fármaco se ensayó en diversos medios: disolución acuosa a distintos pH (entre 0 y 8), HCl 4N, disolución acuosa a 100°C durante 4 horas y suero humano a 37°C durante un mes. Durante estos experimentos el espectro de absorción UV y el pico del cromatograma correspondiente a la molécula en estudio aparecieron siempre constantes. De acuerdo con estos resultados los autores concluyeron que el acamprosato es un compuesto de elevada estabilidad química por lo que parece extremadamente improbable que pueda actuar como precursor de la homotaurina (metabolito potencialmente más probable) (CHABENAT y cols., 1988).

1.1.3 Propiedades farmacológicas

El acamprosato se utiliza en la terapia de mantenimiento de la abstinencia en pacientes dependientes del alcohol. Se le atribuye una acción, que en terminología anglosajona se ha denominado "anticraving", es decir, es capaz de disminuir el deseo compulsivo por consumir alcohol (DURBIN y cols., 1995; LITTLETON, 1995; SPANAGEL y ZIEGLGÄNSBERGER, 1997).

Tanto los estudios desarrollados en animales, como los realizados en humanos, demuestran que no produce aversión por el etanol (a diferencia del disulfiram o la cianamida), ni inhibe los efectos gratificantes del mismo (a diferencia de naltrexona).

14 Antecedentes

Tampoco reemplaza, ni potencia los efectos del alcohol (a diferencia de los ansiolíticos) (GEWIS y cols., 1989).

A) Mecanismo de acción

El mecanismo de acción del acamprosato no está totalmente dilucidado, y los estudios al respecto, en ocasiones, no son concordantes. Parece actuar sobre distintos sistemas de neurotransmisión implicados en la dependencia alcohólica y, por tanto, sus acciones a nivel del sistema nervioso central son variadas. En términos generales este fármaco, probablemente, reduciría la hiperexcitabilidad neuronal, que aparece durante la deshabitación enólica.

Uno de los primeros mecanismos de acción que se sugirieron fue la capacidad para restablecer la transmisión y actividad gabaérgica, aumentando la población de receptores del GABA en el hipocampo de ratas dependientes al alcohol, tal y como demuestran los estudios realizados por Daoust y cols., en 1986. Estudios posteriores determinaron que el acamprosato también incrementa los niveles de serotonina (5-hidroxitriptamina) en plasma y en cerebro (NALPAS y cols., 1990)

Por otro lado se ha comprobado que durante la instauración de la alcohol-dependencia, el número de receptores NMDA (receptor del glutamato) aumenta (GUERRI y GRISOLÍA, 1983; SAKIMURA y cols., 1995; FADDA y ROSSETI, 1998; FAINGOLD y cols., 1998). Este receptor permite la entrada de cationes calcio al citosol produciendo excitación neuronal (GUERRI y GRISOLÍA, 1983). De acuerdo con algunos estudios realizados en ratas, el acamprosato actuaría bloqueando estos receptores y por tanto inhibiría dicha excitación (AL QATARI y LITTLETON, 1995). Sin embargo otros estudios sugieren que el acamprosato actúa como agonista parcial, incrementando la activación de los receptores NMDA cuando los niveles endógenos de aminoácidos excitatorios son bajos e inhibiendo su activación cuando estos niveles endógenos aumentan (NAASSILA y cols., 1998; AL QATARI y cols., 1998). Recientemente, los ensayos realizados en nuestro laboratorio empleando una técnica de microdiálisis *in vivo* en los que se perfundieron distintas soluciones de acamprosato (0.05, 0.5 y 5 mM) en ausencia y presencia de diversos agonistas y antagonistas de los receptores NMDA en el núcleo accumbens de la rata, parecen confirmar que el acamprosato actúa como antagonista de dichos

receptores (CANO-CEBRIÁN y cols., 2003).

Por otra parte, según algunos autores, el acamprosato también sería capaz de aumentar la liberación de taurina en el núcleo accumbens en ratas alcohol-preferentes, lo que permitirían restablecer su nivel normal, y suprimir así la excitación neuronal típica del periodo de deshabitación (LITTLETON, 1995).

B) Indicaciones

El acamprosato se utiliza en la terapia de mantenimiento de la abstinencia en pacientes dependientes del alcohol, estando indicado en las siguientes situaciones:

- 1) Bebedores con bajo nivel de motivación y/o bebedores con elevado índice de severidad de su adicción con el fin de que resulte más confortable el abandono de bebidas alcohólicas.
- 2) Prevención de recaídas tras el cese de consumo.
- 3) Prevención de recaídas en épocas de especial riesgo (vacaciones, situaciones personales conflictivas, etc.)

C) Ensayos clínicos

El acamprosato se ha mostrado eficaz en la reducción de la ingesta alcohólica, tanto en modelos animales (BOISMARE y cols., 1984; GEWISS y cols., 1991; LITTLETON, 1995; SPANAGEL y cols., 1996; SPANAGEL y ZIEGLGÄNSBERGER, 1996), como en ensayos iniciales en humanos (LHUINTRE y cols., 1985; LHUINTRE y cols., 1990; LE MAGNEN, 1990).

En el año 1988, se diseñó un programa de ensayos clínicos a nivel europeo con la intención de confirmar la eficacia del acamprosato en el mantenimiento de la abstinencia alcohólica observada en los primeros estudios. El programa englobaba trece estudios multicéntricos, controlados con placebo y doble ciego, y un estudio abierto para valorar

16 Antecedentes

interacciones medicamentosas, su tolerancia clínica y biológica (AUBIN y cols., 1994).

Considerando conjuntamente todos los datos del programa europeo de ensayos clínicos, puede afirmarse que la tasa de abstinencia, en todos los niveles de valoración, fue significativamente superior en los pacientes tratados con acamprosato. De esta forma, tras 180 días de tratamiento, el 35% de los pacientes que recibieron acamprosato, mantenían su abstinencia, frente al 25% de los tratados con placebo ($p < 0.001$). Tras 360 días, las tasas de abstinencia eran del 33% en los tratados con acamprosato, y del 21% en los tratados con placebo ($p < 0.001$) (monografía MERCK, 1997.). De los ensayos clínicos también se extrajo información adicional como la obtenida por Besson y cols. (1994) los cuales detectaron una mayor tasa de abstinencia en pacientes que combinaron el tratamiento de acamprosato con disulfiram. Además no se detectó ningún tipo de interacción entre ambas sustancias. Otra conclusión importante que se extrajo del estudio de Sass (1995) fue que el efecto beneficioso del acamprosato comienza a detectarse tras 60 días de tratamiento.

Existen otros estudios no incluidos en el estudio multicéntrico europeo, como el realizado por Ades y cols., en 1992, o el publicado por Whitworth y cols. en 1996, en los que se alcanzan conclusiones similares a las anteriormente citadas.

D) Toxicidad y reacciones adversas

Los estudios de toxicidad aguda, subcrónica y crónica realizados en distintas especies animales no han revelado riesgo potencial para el hombre (FAUS y cols., 1996).

No se han detectado alteraciones a nivel de la fertilidad y reproducción. Tampoco se han encontrado signos de actividad mutagénica ni carcinogénica (FAUS SOLER y cols., 1997).

En general se puede afirmar que el acamprosato es bien tolerado. De todos los estudios clínicos realizados, las reacciones adversas más comunes detectadas son la diarrea y las nauseas.

Parece ser que la toxicidad del fármaco está relacionada con la ingesta excesiva de calcio presente en el compuesto (WITHWORTH y cols., 1996).

E) Posología y forma de administración

En pacientes cuyo peso es superior a los 60 kg, el acamprosato se administra tres veces al día (2 comprimidos por la mañana, 2 al mediodía y 2 por la noche), en forma de comprimidos con recubrimiento gastrointestinal (333 mg de acamprosato por comprimido).

En pacientes con peso inferior a los 60 kg, la posología es de 4 comprimidos recubiertos en tres tomas diarias (2 comprimidos por la mañana, 1 al mediodía y 1 por la noche).

La duración recomendada del tratamiento es de un año (monografía MERCK, 1997)

1.2 FARMACOCINÉTICA DEL ACAMPROSATO

1.2.1 Farmacocinética en animales

Tan sólo existe publicado un estudio sobre la farmacocinética del acamprosato en animales de experimentación. Dicho estudio fue realizado por Chabenat y cols. en 1988, sobre 3 perros de 9, 12, y 11 kg a los que se les administró una inyección intravenosa rápida de 150, 100, y 50 mg/kg, respectivamente. Los perros fueron anestesiados con pentobarbitona a la dosis de 30 mg/kg, seguido de cloralosa al 5% según las necesidades.

La representación gráfica de las concentraciones plasmáticas de acamprosato obtenidas frente a sus correspondientes tiempos de muestreo (*Figura 1.2*) refleja, tal y como señalaron los autores, que el mejor ajuste para los datos experimentales obtenidos es el de una curva biexponencial (modelo bicompartimental).

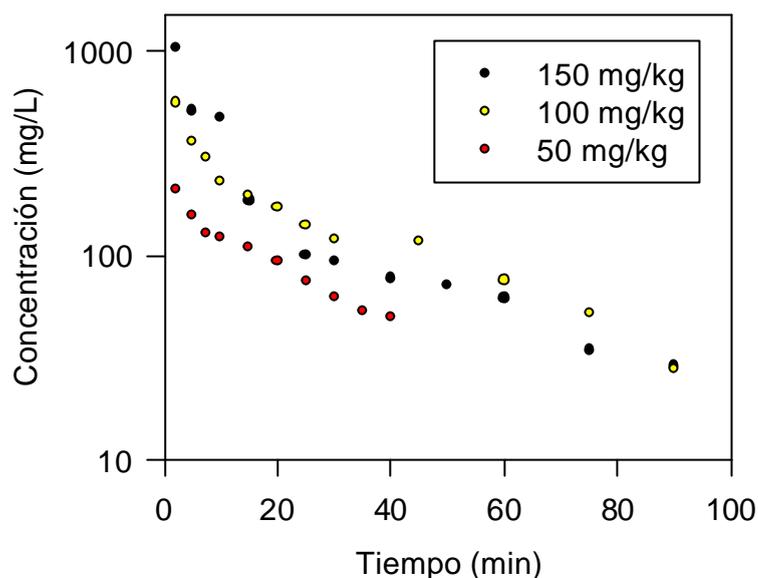


Figura 1.2 Representación gráfica de las concentraciones plasmáticas obtenidas en perros por Chabenat y cols. en 1988, tras administración intravenosa rápida de tres dosis diferentes de acamprosato.

Para el ámbito de las dosis administradas (desde 550 hasta 1350 mg), los aclaramientos totales obtenidos oscilaron entre 93.6 y 101.2 ml/min, indicando una aparente linealidad en la farmacocinética del acamprosato por vía intravenosa.

Otro hecho destacable de este estudio es que el acamprosato se distribuye y se elimina muy rápidamente; la semivida de distribución obtenida osciló entre 3.67 y 1.42 minutos, mientras que la semivida de eliminación varió entre 34.78 y 21.89 minutos.

1.2.2 Farmacocinética en voluntarios sanos

1.2.2.1 Absorción

En general, y de acuerdo con los escasos resultados publicados, puede aceptarse que la absorción intestinal del acamprosato es pobre en magnitud y lenta en velocidad.

Poco se sabe acerca de los mecanismos implicados en su absorción intestinal, de hecho sólo existe publicado un trabajo, que estudia en profundidad el mecanismo de absorción del acamprosato utilizando la rata como modelo animal de experimentación y, en el cual, se demuestra que el fármaco se absorbe, presentemente por difusión pasiva (MÁS-SERRANO y cols., 2000).

Uno de los estudios (no publicado) más revelantes sobre la farmacocinética del acamprosato es el realizado por *Fourtillan en 1990. Se realizó en 24 voluntarios sanos (varones), a los que se administró el acamprosato según distintos protocolos: dosis oral única de 2 comprimidos de 333 mg, 2 comprimidos de 333 mg tres veces al día durante 7 días (21 dosis), y perfusión intravenosa de 666 mg durante 15 minutos. Entre los resultados del estudio destaca el referido a la baja biodisponibilidad oral en magnitud obtenida, que fue del 11 ± 1 %. Por otra parte, los resultados del estudio llevaron a los autores a proponer la existencia de un fenómeno FLIP-FLOP en la farmacocinética del acamprosato tras su administración oral.

Similares resultados se han obtenido en otros estudios posteriores tampoco publicados. Así en 1991, *Scott realizó un estudio con 4 voluntarios sanos, a los que administró 1320 mg de solución oral de acamprosato marcado radiactivamente. De nuevo tan sólo el 11% de la dosis radiactiva se encontró en orina y el 88% en heces, lo que sugería una absorción limitada.

En los *Cuadros 1.1 a 1.3* se resumen los parámetros farmacocinéticos más importantes obtenidos en humanos tras la administración del acamprosato por distintos autores y trabajos y que han sido recopilados por Saivin y cols. (1998).

Formulación	Dosis	n	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	AUC (µg/l·h)	t _{1/2} (h)	Cl _r (l/h)	Cl _r (l/h)	Cl _r (l/h)	U ₀₋₉₆ (% dosis)	Autor
Perfusión iv	Simple 666 mg	24	-	-	39696±1737	3.2±0.2	15.78±0.72	7.92±1.08	7.92±1.08	49.0±5.4	Fourtillan 1990
Perfusión iv	Simple 10 mg/kg	12	-	-	43369±22580	0.7±0.4	24.12±14.88	17.76±9.24	17.76±9.24	89.0±37.0	Jaillon 1991
Perfusión iv	Simple 20 mg/kg	12	-	-	93760±29140	0.8±0.2	17.04±8.52	14.94±7.8	14.94±7.8	88.0±23.0	Jaillon 1991
Perfusión iv	Simple 30 mg/kg	12	-	-	159130±54460	1.1±0.4	14.22±2.82	12.06±2.82	12.06±2.82	90.0±21.0	Jaillon 1991
Sol. Oral	Simple 333 mg	6	326±143	1.4±0.2	1155±658	2.0±0.7	-	23.82±16.56	23.82±16.56	4.9±6.8*	Dewland 1991
Sol. Oral	Simple 666 mg	6	581±197	1.5±0.7	4195±879	15.0±6.6	-	17.03±6.83	17.03±6.83	6.9±1.1	Fourtillan 1989
Sol. Oral	Simple 666 mg	6	783±257	1.5±0.5	5443±1888	13.0±3.2	-	7.74±2.28	7.74±2.28	4.1±8.2*	Dewland 1991
Sol. Oral	Simple 1332 mg	6	914±316	1.4±0.5	7197±2317	12.5±3.7	-	12.9±3.48	12.9±3.48	5.3±7.8*	Dewland 1991
Sol. Oral	Simple 2664 mg	6	1549±744	1.2±0.5	12624±5265	14.5±3.4	-	16.86±7.62	16.86±7.62	4.1±9.9*	Dewland 1991

Cuadro 1.2 Resultados obtenidos en diversos estudios sobre la farmacocinética del acamprosato en humanos. n=número de participantes; U₀₋₉₆=porcentaje de dosis excretada en la orina durante 96 horas; * =orina recogida en el intervalo de tiempo 0-48 horas postadministración (Adaptado de Saivin y cols., 1998).

Formulación	Dosis	n	C_{max} ($\mu\text{g/l}$)	T_{max} (h)	AUC ($\mu\text{g/l}\cdot\text{h}$)	$t_{1/2}$ (h)	Cl_t (l/h)	Cl_r (l/h)	U_{0-96} (% dosis)	Autor
Comp. Oral	Simple 666 mg	6	196 \pm 138	6.3 \pm 4.9	1988 \pm 431	13.0 \pm 4.5	-	16.34 \pm 7.90	3.5 \pm 1.2	Fourtillan 1989
Comp. Oral	Simple 666 mg	24	206 \pm 23	5.2 \pm 0.6	4110 \pm 442	32.7 \pm 4.3	178.86 \pm 15.18	8.88 \pm 0.66	5.4 \pm 0.6	Fourtillan 1990
Comp. Oral	Simple 666 mg	12	172 \pm 30	9.6 \pm 3.6	2555 \pm 257	-	-	-	5.8 \pm 0.4	Fourtillan 1992
Comp. Oral	Simple 666 mg	6	198 \pm 38	5.8 \pm 1.3	-	18.2 \pm 3.2	183.96 \pm 25.86	10.05 \pm 1.22	5.6 \pm 0.8	Sennessel 1992
Comp. Oral	Simple 666 mg	12	188 \pm 81	5.0 \pm 1.9	3242 \pm 2885	27.5 \pm 18.8	-	-	-	Dewland 1995
Comp. Oral	Simple 666 mg	12	212 \pm 83	4.3 \pm 1.2	3866 \pm 2011	28.4 \pm 15.1	-	-	-	Dewland 1995

Cuadro 1.3 Resultados obtenidos en diversos estudios sobre la farmacocinética del acamprosato. n=número de participantes; U_{0-96} =porcentaje de dosis excretada en la orina durante 96 horas (Adaptado de Saivin y cols., 1998).

Formulación	Dosis	n	C_{max} ($\mu\text{g/l}$)	T_{max} (h)	AUC ($\mu\text{g/l}\cdot\text{h}$)	$t_{1/2}$ (h)	Cl_r (l/h)	U_{0-96} (% dosis)	Autor
Comp. oral	Múltiple 666 mg tid. (día 1)	12	162±22	15.3±2.2	1802±217	-	-	-	Saivin y col.
Comp. oral	Múltiple 666 mg tid. (día 1)	6	360±66	15.3±6.4	3973±836	-	-	-	Haug, 1992
Comp. oral	Múltiple 666 mg tid. (día 7)	6	644±386	7.3±4.4	9728±5491	-	-	13.7±7.2	Haug, 1992
Comp. oral	Múltiple 666 mg tid. (día 7)	24	608±63	-	8436±879	20.8±2.9	-	-	Fourtillan, 1990
Comp. oral	Múltiple 666 mg tid. (día 7)	8	-	-	8717±4733	-	-	-	Fourtillan, 1995
Comp. oral	Múltiple 666 mg tid. (día 8)	6	534±195	3.5±0.5	11019±6732	13.0±2.9	-	-	Haug, 1992
Comp. oral	Múltiple 666 mg tid. (día 8 ó 17)	23	523±57	7.1±1.3	7365±871	-	14.93±0.88	5.1±0.5	Saivin y col.
Comp. oral	Múltiple 666 mg tid. (día 9 ó 18)	23	471±39	9.0±1.9	6884±661	17.0±2.7	15.71±1.76	4.9±0.4	Saivin y col.

Cuadro 1.4 Resultados obtenidos en diversos estudios sobre la farmacocinética del acamproato. n=número de participantes; U_{0-96} =porcentaje de dosis excretada en la orina durante 96 horas; tid=3 veces al día (Adaptado de Saivin y cols., 1998).

1.2.2.2 Distribución

No existen estudios publicados en los que se aborde el análisis detallado de la distribución del acamprosato. Se sabe, sin embargo, que el acamprosato no se une apreciablemente a proteínas plasmáticas (WILDE y WAGSTAFF, 1997; DURBIN y cols., 1995).

Su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y acceder al sistema nervioso central está probada, a pesar de su marcada naturaleza polar. En los estudios realizados por Durbin y cols. en 1995, se administraron dosis de 100 y 30 mg/kg de ¹⁴C-acamprosato por vía oral e intravenosa respectivamente. La relación del área bajo la curva de niveles cerebrales y niveles plasmáticos fue de 0.17 para la vía oral y 0.19 para la vía intravenosa. Por tanto, el acamprosato es capaz de acceder al sistema nervioso central en proporción apreciable (aproximadamente un 18%).

1.2.2.3 Metabolismo y excreción

Diversos autores han postulado la ausencia de rutas metabólicas en la eliminación del acamprosato (*FOURTILLAN, 1989; *DEWLAND, 1991; *SCOTT, 1991).

La excreción del acamprosato parece producirse fundamentalmente por vía renal. Sin embargo, existen ciertas discrepancias en los resultados publicados por diferentes autores sobre este aspecto.

En este sentido, de acuerdo con el estudio de *Fourtillan (1990), tras la administración de 666 mg de acamprosato en perfusión intravenosa durante 15 minutos a 24 voluntarios sanos, se obtuvo un valor de aclaramiento total igual a 15.78 ± 0.72 l/h, y el aclaramiento renal fue de 7.92 ± 1.08 l/h. Es decir, aproximadamente la mitad de la dosis fue eliminada de forma inalterada por la orina (*Cuadro 1.1*).

Sin embargo, en otro estudio realizado por *Jaillon y Salvat en 1991 sobre un total de

24 Antecedentes

12 individuos a los que se administró dosis de 10, 20 y 30 mg/kg, en perfusión intravenosa durante 10 minutos, se pudo comprobar que el aclaramiento renal era prácticamente equivalente al aclaramiento total del fármaco.

Esta discrepancia en los resultados obtenidos en ambos estudios puede residir, tal vez, como bien han señalado Saivin y cols. (1998), en el diferente método analítico empleado por los dos grupos de investigación.

Tampoco se conocen con claridad los mecanismos implicados en la excreción renal del compuesto. De hecho, ninguno de los trabajos publicados disponibles, aventura ningún mecanismo paralelo a la filtración glomerular. Tan sólo *Dewland, en 1991, indica la posibilidad de la existencia de un proceso de secreción tubular activa, aunque no fundamenta esta afirmación.

1.2.2.4 Linealidad farmacocinética

A) Linealidad de la disposición del acamprosato

El estudio de la linealidad cinética de la disposición del acamprosato ha sido abordado en dos estudios diferentes. En el estudio realizado por *Jaillon y Salvat en 1991, a 12 voluntarios sanos se les perfundió durante 10 minutos placebo, 10, 20, y 30 mg/kg de acamprosato, dejando un periodo de una semana entre cada una de las dosis. El área bajo la curva de concentraciones plasmáticas de acamprosato (*AUC*), va aumentando de forma lineal con el aumento en la dosis administrada, lo que demuestra la linealidad cinética de la disposición del acamprosato (*Cuadro 1.4*)

Dosis (mg/kg)	AUC (mg/l·h)
10	49360 ± 22580
20	93760 ± 29140
30	159130 ± 54460

Cuadro 1.4 Valores de *AUC* obtenidos tras la administración de diferentes dosis de acamprosato. Se aprecia que al aumentar la dosis administrada, el *AUC* aumenta linealmente (adaptado de Saivin y cols., 1998).

Dewland abordó el problema administrando por vía oral, varias soluciones del fármaco de concentración creciente (333, 666, 1332 y 2664 mg). De acuerdo con sus resultados, el T_{\max} no se modificó con la dosis administrada. Sin embargo, el C_{\max} y el área bajo la curva de niveles plasmáticos del fármaco sí aumentaron de forma lineal con la dosis (*DEWLAND, 1991)

26 Antecedentes

Dosis (mg)	T_{\max} (h)	C_{\max} ($\mu\text{g/l}$)	AUC ($\mu\text{g/l.h}$)
333	1.4 ± 0.2	326 ± 143	1155 ± 658
666	1.5 ± 0.5	783 ± 257	5443 ± 1888
1332	1.4 ± 0.5	914 ± 316	7197 ± 2317
2664	1.2 ± 0.5	1549 ± 744	12624 ± 5265

Cuadro 1.5 Resultados obtenidos por *Dewland en 1991. Se puede observar el aumento de forma lineal tanto del C_{\max} como del AUC con respecto a la dosis de acamprosato administrada (Adaptado de Saivin y cols., 1998).

B) Linealidad en el tiempo

Tras la administración oral de 666 mg de acamprosato tres veces al día en régimen posológico, se obtuvo que la cantidad total excretada en orina entre dos dosis del séptimo día (34.8 ± 3.3 mg), no varía con respecto a la excretada tras la primera dosis (32.5 ± 2.4 mg). Esto confirma que no existe modificación en la excreción del acamprosato tras un largo período de administración (*FOURTILLAN, 1990).

1.2.3 Farmacocinética en pacientes con insuficiencia hepática

Tanto el estudio realizado por *Miguet en 1991, como el realizado por *Haug en 1992, permiten concluir que la farmacocinética del acamprosato no se ve afectada por cambios en la función hepática. Por tanto, el acamprosato no está contraindicado en pacientes con insuficiencia hepática, complicación habitual en el potencial usuario de este fármaco. En el *Cuadro 1.6* se recogen los parámetros farmacocinéticos más relevantes obtenidos en el estudio.

Dosis (mg)	C_{\max} ($\mu\text{g/l}$)	T_{\max} (h)	AUC ($\mu\text{g/l.h}$)	$t_{1/2}$ (h)	Cl_r (l/h)	Autor
666	527 \pm 314	2.3 \pm 0.8	4614 \pm 2763	17.9 \pm 10.1	7.74 \pm 2.28	*Miguet 1991
666	581 \pm 197	1.5 \pm 0.7	4195 \pm 879	15.0 \pm 6.6	17.03 \pm 6.83	*Fourtillan 1989
666	783 \pm 257	1.5 \pm 0.5	5443 \pm 1888	13.0 \pm 4.5	7.74 \pm 2.28	*Dewland 1991

Cuadro 1.6 Resultados obtenidos por *Miguet, en 1991, en pacientes con enfermedad hepática, comparados con resultados obtenidos por otros autores (*Fourtillan y *Dewland) en voluntarios sanos. (Adaptado de Saivin y cols., 1998).

1.2.4 Farmacocinética en pacientes con disfunción renal

Diversos autores han sugerido que el acamprosato no debe ser administrado a pacientes con insuficiencia renal ante el riesgo seguro de acumulación del fármaco (DURBIN y cols., 1995; WILDE y WAGSTAFF, 1997).

En el estudio de *Sennesael (1992) se utilizaron 12 pacientes con distinto grado de insuficiencia renal, así como 6 voluntarios sanos. Los enfermos se distribuyeron en insuficientes renales “moderados” y “severos” en función de su aclaramiento de creatinina (moderado: 1.8-3.6 l/h·1.73m²) (severo: 0.3-1.74 l/h·1.73m²). Se administró el acamprosato en forma de comprimidos (2 x 333 mg), y en una única dosis. Las concentraciones plasmáticas obtenidas se representan en la *Figura 1.3*.

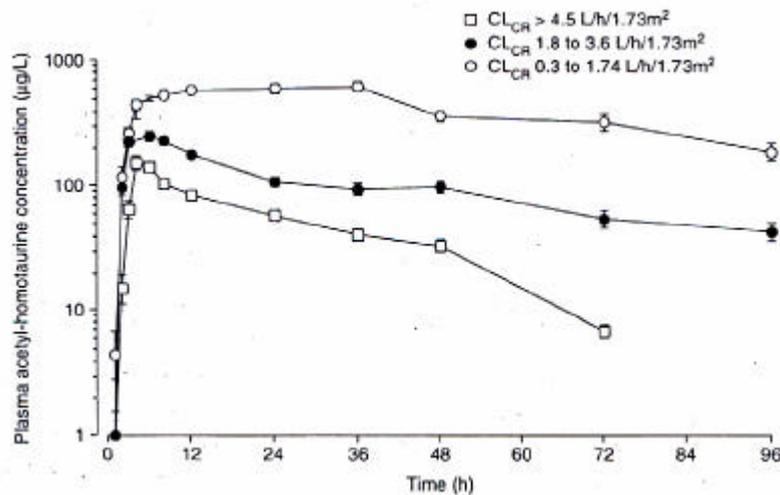


Figura 1.3 Farmacocinética del acamprosato en pacientes con distinto grado de afectación renal (Tomado de Saivin y cols., 1998).

Como se aprecia, las curvas de nivel plasmático promedio sufrieron importantes cambios como consecuencia del empeoramiento en la función renal.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos por Sennesael se reflejan en el Cuadro 1.7.

$Cl_{creatinina}$ (l/h·1.73 m ²)	Dosis (mg)	C_{max} (μg/l)	T_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	Cl_{total} (l/h)	Cl_r (l/h)
0.3-1.74	666	198 ± 3.8	5.8 ± 1.3	18.2 ± 3.2	183.96 ± 25.86	10.05 ± 1.22
1.8-3.6	666	398 ± 78	4.3 ± 0.8	33.4 ± 6.6	66.50 ± 18.10	3.29 ± 0.85
>4.5	666	813 ± 109	23.3 ± 7.7	46.6 ± 12.8	15.85 ± 4.5	1.10 ± 0.21

Cuadro 1.7 Parámetros farmacocinéticos obtenidos por *Sennesael en 1992, en pacientes con distinto grado de afectación renal. (Insuficiencia renal severa ($Cl_{creatinina} = 0.3-1.74$ l/h. 1.73m²), insuficiencia renal moderada ($Cl_{creatinina} = 1.8-3.6$ l/h. 1.73 m²), sano = ($Cl_{creatinina} > 4.5$ l/h.1.73 m²)). Adaptado de Saivin y cols. (1998)

Como se aprecia, los valores de C_{max} , T_{max} y semivida de eliminación aumentaban cuanto mayor era la intensidad de la disfunción renal. Por el contrario, los aclaramientos total (Cl_t) y renal (Cl_r) disminuían cuanto más alto era el grado de la enfermedad. Además se encontró una correlación lineal entre los valores de aclaramiento total y renal con los valores de aclaramiento de creatinina en los pacientes. Los coeficientes de correlación obtenidos fueron de 0.8235 para el Cl_t y 0.8932 para el Cl_r , respectivamente.

1.2.5 Farmacocinética en el paciente alcohólico

La interacción entre el acamprosato y el etanol se ha estudiado en los dos sentidos, es decir, la influencia del etanol sobre la farmacocinética del acamprosato y viceversa.

La influencia del acamprosato en la cinética del alcohol se ha abordado a través de un estudio cruzado con 12 voluntarios sanos. Se establecieron dos grupos experimentales: un grupo control y otro sometido a un pretratamiento con 666 mg de acamprosato cada 8 horas administrado por vía oral durante 2 días. En cada uno de ellos se analizó la farmacocinética del etanol a lo largo de 6 horas tras una administración de aproximadamente 32 g del mismo (80 ml de Whisky 40% mezclado con 80 ml de soda). El valor de C_{\max} del etanol fue de $413 \pm 127 \mu\text{g/ml}$ en el grupo tratado con acamprosato y $401 \pm 88 \mu\text{g/ml}$ en el grupo control. Los valores de AUC tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas, siendo de $623 \pm 260 \mu\text{g/l}\cdot\text{h}$ y $653 \pm 264 \mu\text{g/l}\cdot\text{h}$, respectivamente. Tras el análisis estadístico de los resultados los autores han concluido que el acamprosato no influye en la disposición del alcohol (*LUCKER, 1989).

El estudio de la influencia del etanol sobre la farmacocinética del acamprosato ha sido abordado, según nuestros datos, por dos grupos de trabajo. A partir de sus resultados se puede afirmar que el etanol no afecta a la disposición del acamprosato (*DEWLAND, 1991; DURBIN y cols., 1995).

*Dewland en 1991 realizó un estudio sobre 12 voluntarios sanos a los que se les administró una dosis inicial de 0.9 g/kg de etanol o placebo, una hora antes de la administración de 1332 mg de acamprosato por vía oral, en forma de comprimidos. Posteriormente se fueron administrando reiteradamente dosis de etanol de 0.09 g/kg desde tiempo 0 y cada 30 minutos, hasta las 7.5 horas después de haber administrado el fármaco. La toma de muestras de sangre se prolongó durante 48 horas. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos quedan reflejados en el *Cuadro 1.8*.

Dosis (mg)	C_{\max} ($\mu\text{g/l}$)	T_{\max} (h)	AUC ($\mu\text{g/l}\cdot\text{h}$)	$t_{1/2}$ (h)	Cl_{renal} (l/h)
1332 (comp)	258 ± 82	7.8 ± 5.1	9573 ± 5136	46.8 ± 51.0	9.33 ± 3.77
1332 (comp) + etanol	289 ± 91	6.0 ± 4.1	8894 ± 6537	30.8 ± 30.4	9.62 ± 5.15

Cuadro 1.8 Resultados obtenidos por *Dewland en 1991, en el estudio de la influencia del etanol sobre la farmacocinética del acamprosato (Adaptado de Saivin y cols., 1998).

La comparación de los valores de AUC desde tiempo cero hasta tiempo infinito en las dos condiciones estudiadas muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas. Las curvas de niveles plasmáticos obtenidas se pueden observar en la *Figura 1.4*.

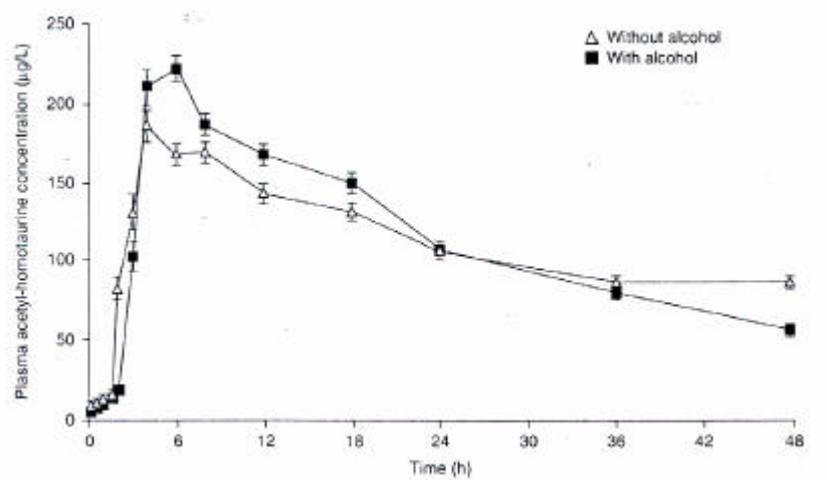


Figura 1.4 Influencia del etanol en la farmacocinética del acamprosato (Tomado de Saivin y cols., 1998).

Adicionalmente, en nuestro laboratorio se realizó un estudio sobre la influencia del alcoholismo crónico en la absorción intestinal del acamprosato. Los ensayos se realizaron mediante una técnica *in vitro*, utilizando el intestino delgado de la rata Wistar. Los ensayos realizados demostraron que el flujo de acamprosato a través del borde en cepillo del enterocito no se modificó de un modo estadísticamente significativo en los animales alimentados mediante una dieta líquida enriquecida con etanol con respecto a los animales alimentados con dieta sólida convencional o dieta líquida control (sin etanol) (MÁS-SERRANO y cols., 2000). Los resultados obtenidos en este estudio se resumen en la *Figura 1.5*.

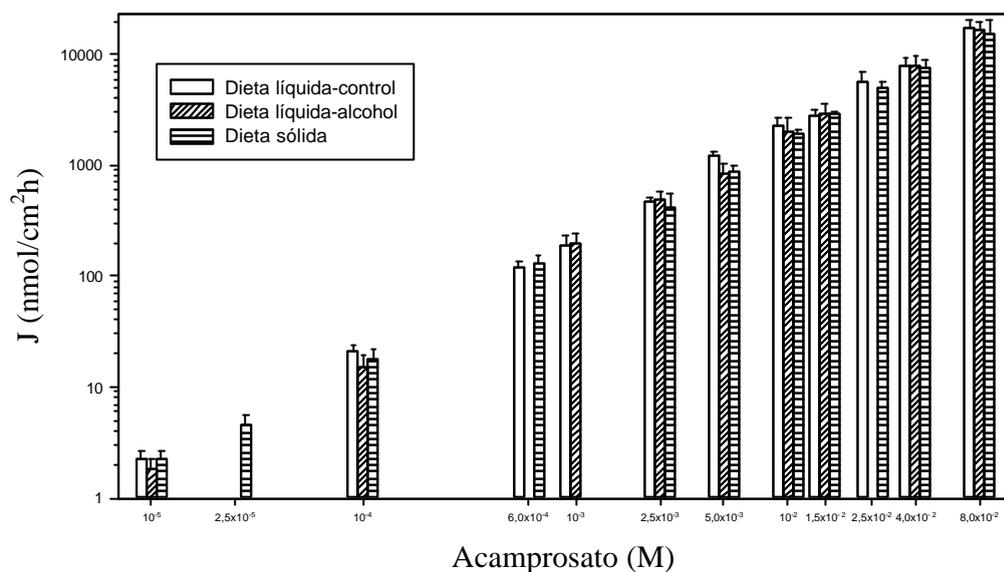


Figura 1.5 Flujo de acamprosato a través del borde en cepillo del enterocito (J) determinado en yeyuno de rata de los animales alimentados con dieta líquida-control, dieta líquida-alcohol y dieta sólida (Tomado de Más-Serrano y cols., 2000).

1.2.6 Interacciones con los alimentos.

*Fourtillan (1992) estudió la influencia de la ingesta de alimentos en la farmacocinética del acamprosato. Para ello se administraron 666 mg de acamprosato en comprimidos en presencia o ausencia de alimentos a 12 voluntarios sanos. Se tomaron muestras de sangre durante 72 horas, y la orina fue recogida hasta las 96 horas después de la administración. Los resultados obtenidos por el autor, reflejados en el *Cuadro 1.9*, muestran que el C_{\max} descendió un 42% y el AUC un 23% cuando el fármaco se administró conjuntamente con alimentos.

Dosis	C_{\max} ($\mu\text{g/l}$)	T_{\max} (h)	AUC ($\mu\text{g/l.h}$)	U_0^{96} (%dosis)
2 x comp. 333mg	172 ± 30	9.6 ± 3.6	2555 ± 257	5.8 ± 0.4
2 x comp. 333mg + comida	99 ± 10	6.9 ± 1.7	1970 ± 221	5.0 ± 0.4

Cuadro 1.9 Resultados obtenidos por *Fourtillan en 1992. Se detecta un descenso significativo en el valor de C_{\max} y en el de AUC cuando se administra el fármaco junto con alimentos (Adaptado de Saivin y cols., 1998)

No obstante, los resultados en orina parecen ser contradictorios puesto que la diferencia en la cantidad de fármaco excretado inalterado en orina en ayuno y en presencia de comida fue solamente del 14%.

Adicionalmente, otro estudio (SOYKA, 1996) demostró que la biodisponibilidad del acamprosato disminuyó aproximadamente un 20% debido a la presencia de alimentos tal y como se observa en la siguiente *Figura*.

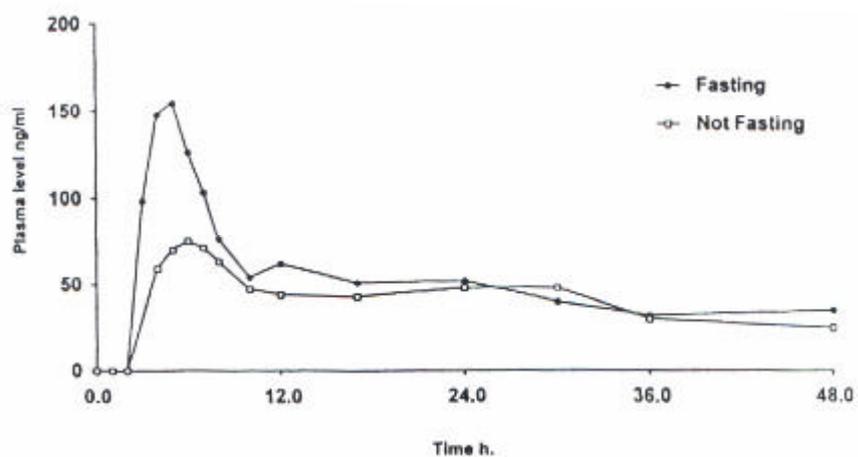


Figura 1.6 Niveles plasmáticos de acamprosato tras administración por vía oral de 2 comprimidos de 333 mg del fármaco en voluntarios en ausencia ("Fasting") o presencia de alimentos ("Not fasting"). Tomado de Soyka (1996).

Hasta la fecha, ningún autor ha tratado de explicar de forma coherente esta variación. Sin embargo, cabe resaltar que en la mayoría de los estudios clínicos el acamprosato se administró en presencia de alimentos.

1.2.7 Interacciones con otros fármacos

De modo general, puede decirse que el acamprosato no presenta interacciones significativas con ninguno de los fármacos que habitualmente se han administrado en la terapia de mantenimiento de la abstinencia en pacientes dependientes del alcohol con la excepción de la naltrexona. Diversos estudios así lo confirman.

En un ensayo realizado por *Fourtillan en 1995 se estudió la interacción del acamprosato con diazepam. El diazepam es un ansiolítico, perteneciente al grupo de las benzodiazepinas, que se usa como adyuvante en las terapias para el abandono de la dependencia enólica. El mencionado estudio se realizó sobre 16 voluntarios sanos, 8 de ellos recibieron 5 mg de diazepam dos veces al día durante 7 días, y al séptimo día se les administró conjuntamente el diazepam con acamprosato (666 mg tres veces al día). Los ocho restantes recibieron el tratamiento en sentido inverso. Los parámetros cinéticos del acamprosato, diazepam y nordiazepam (principal metabolito del diazepam) no sufrieron variaciones estadísticamente significativas, por lo tanto no se detectó ninguna interacción entre estas tres sustancias (*FOURTILLAN, 1995).

El mismo autor también diseñó un ensayo para estudiar las interacciones entre el acetilhomotaurinato cálcico y la imipramina. La imipramina es un conocido antidepresivo tricíclico que se asocia muchas veces al acamprosato en las terapias de deshabitación alcohólica. El diseño del ensayo fue exactamente igual al realizado con diazepam, a excepción de que la imipramina se administró una vez al día a dosis de 50 mg. En el estudio se comprobó de nuevo la ausencia de interacciones entre ambos fármacos (*FOURTILLAN, 1995).

Aubin y cols. en 1994 y 1995, realizaron varios estudios sobre la interacción de ansiolíticos como oxazepam o meprobamato con acamprosato. Tampoco estos autores detectaron ningún efecto clínico o indeseable anormal, atribuible a una interacción entre los fármacos.

Respecto al consumo conjunto de acamprosato con disulfiram, conocido fármaco utilizado como aversivo alcohólico, *Dewland mostró en 1995 que el disulfiram no interfiere en la disposición del acamprosato.

Recientemente, se ha venido proponiendo la utilización conjunta de acamprosato y naltrexona para la prevención de las recaídas en el hábito enólico. Este hecho ha obligado a la realización de estudios que evalúen la potencial interacción, no sólo desde el punto de vista farmacodinámico, sino también desde el punto de vista farmacocinético. En este sentido, Mason y cols., han publicado recientemente un trabajo de gran importancia a nuestro entender. Este grupo de trabajo comprobó que la coadministración de acamprosato y naltrexona aumentó en un 33% el valor de C_{\max} del acamprosato en los voluntarios sanos con respecto al grupo control. Adicionalmente detectaron una disminución del 33% en el valor de T_{\max} y un incremento del 25% en el valor de AUC del acamprosato cuando se coadministraban ambos fármacos (MASON y cols., 2002). Paralelamente el acamprosato no afectó los parámetros farmacocinéticos de la naltrexona ni de su metabolito 6- β -naltrexol. La naltrexona es un antagonista selectivo de los receptores opioides (CHANG y cols., 1979), y aunque su mecanismo de acción "anticraving" es completamente diferente al del acamprosato, se ha propuesto su uso conjunto para la prevención de las recaídas del paciente alcohólico. Los autores sugieren como posible causa del incremento en la fracción absorbida de acamprosato al hecho de que los antagonistas de receptores opioides afectan al tránsito gastrointestinal (KREVSKY y cols., 1990; AURICH y cols., 1993); esto podría afectar a la absorción intestinal del acamprosato. Adicionalmente sugieren que la interacción de la naltrexona con receptores opioides presentes en el intestino también podría inducir cambios en la permeabilidad intestinal del acamprosato.

1.2.8 Influencia de la edad y el sexo en la farmacocinética del acamprosato

Debido a que la mayoría de estudios farmacocinéticos del acamprosato se han realizado en varones sanos (SAIVIN y cols., 1998), se realizó un estudio comparativo entre voluntarios de sexo diferente. Para ello se compararon los principales parámetros farmacocinéticos tras la administración oral simple de 666 mg de acamprosato a 12 voluntarios sanos de cada sexo. Las muestras plasmáticas se recogieron durante 120 horas y la comparación estadística de los parámetros obtenidos (*Cuadro 1.10*) no reveló la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos (*DEWLAND, 1995).

Dosis	n	sexo	C_{\max} ($\mu\text{g/l}$)	T_{\max} (h)	AUC_0^∞ ($\mu\text{g/l.h}$)	$t_{1/2}$ (h)
666 mg	12	masculino	188 \pm 81	5.0 \pm 1.9	3242 \pm 2885	27.5 \pm 18.8
666 mg	12	femenino	212 \pm 83	4.3 \pm 1.2	3866 \pm 2011	28.4 \pm 15.1

Cuadro 1.10 Parámetros farmacocinéticos del acamprosato en voluntarios de ambos sexos (Adaptado de Saivin y cols., 1998).

Aunque no se ha realizado un estudio estricto para evaluar la influencia de la edad de los pacientes en la farmacocinética del acamprosato, se pueden extraer ciertas conclusiones a partir de otros estudios. En el estudio desarrollado por *Haug en 1992 con el objetivo de dilucidar la relación entre el grado de insuficiencia hepática y la farmacocinética del acamprosato, el grupo correspondiente a los voluntarios sanos estaba constituido por personas con una edad media de 50 años. Los parámetros farmacocinéticos del acamprosato obtenidos en este grupo experimental no presentaron diferencias estadísticamente significativas con los obtenidos en otros estudios desarrollados en personas jóvenes sanas (SAIVIN y cols., 1998).

1.3 ABSORCIÓN INTESTINAL Y MECANISMOS PARA SU PROMOCIÓN

1.3.1 Mecanismos de absorción intestinal

La absorción de los xenobióticos a través del tracto gastrointestinal se realiza por varios mecanismos que permiten su entrada al torrente sanguíneo. Hay que considerar que los compuestos se absorben mayoritariamente en el intestino delgado, aunque en algunos casos, y en función de sus características, pueden absorberse también en el colon y en el estómago.

El intestino delgado es una formación tubular que, en la rata adulta, presenta aproximadamente un metro de longitud. La pared del intestino delgado consta de cuatro capas, siendo la denominada capa mucosa la que está en contacto con el líquido luminal y, por tanto, la que interviene directamente en el proceso de absorción.

Las características morfológicas de la mucosa del intestino delgado corresponden a las funciones altamente especializadas en absorción que realiza. El detalle morfológico más sobresaliente en este sentido es el aumento de superficie útil para la absorción (GUYTON y HALL, 1999) en virtud a las válvulas conniventes (pliegues de Kerkring), las vellosidades intestinales y las microvellosidades de los enterocitos. En consecuencia, el aumento de la superficie de la mucosa intestinal debido a estas adaptaciones es del orden de 600 veces respecto al cilindro fundamental.

De un modo general se puede decir que el epitelio intestinal actúa como barrera para separar al organismo del medio externo, lo cual consigue mediante la membrana celular del enterocito, la presencia de transportadores asociados a la membrana, las enzimas intracelulares y los complejos de unión (denominados en terminología anglosajona "tight junctions"). Aunque el movimiento de iones a través del epitelio intestinal se encuentra parcialmente restringido, es suficiente para conseguir un gradiente de potencial eléctrico a su través.

Una molécula podrá atravesar el epitelio intestinal, principalmente, mediante tres mecanismos que implican a dos posibles vías de entrada: difusión pasiva a través de la membrana celular (ruta transcelular), difusión pasiva entre células adyacentes (ruta paracelular) y paso mediado por transportadores a través de la membrana celular (Figura 1.7). La denominada ruta paracelular corresponde al paso acuoso a través del espacio intercelular, el cual se encuentra restringido por el complejo de unión (tight junction) situado en la zona apical de los enterocitos (DIAMOND, 1977).

Los compuestos de naturaleza lipofílica atravesarán fácilmente la membrana celular mediante difusión transcelular. Por su parte, la naturaleza acuosa de la ruta paracelular lo convierte en la ruta favorable para la absorción, mediante difusión pasiva, de moléculas hidrofílicas que no sean sustrato de ningún transportador.

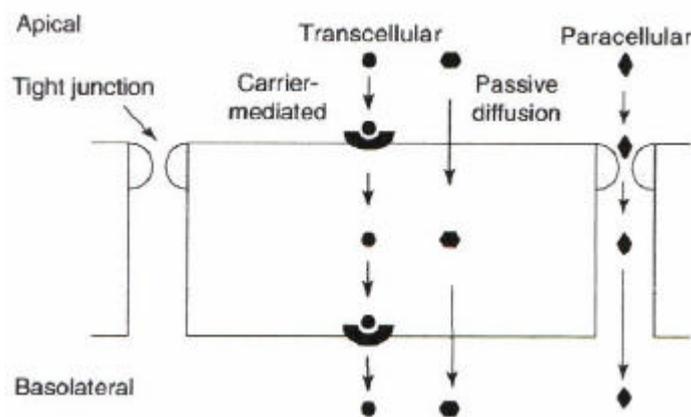


Figura 1.7 Representación esquemática de los distintos mecanismos para atravesar el epitelio intestinal (Adaptado de Ward y cols., 2000).

1.3.2 Mecanismos implicados en la absorción del acamprosato

Los estudios presentes en la literatura que aborden los mecanismos implicados en la absorción del acamprosato son escasos. En general, consideran que el acamprosato se absorbe muy poco en el tracto gastrointestinal, presentando una gran variabilidad interindividual (FAUS-SOLER y cols., 1997; SAIVIN y cols., 1998).

Los datos existentes en la bibliografía hasta hace relativamente poco tiempo eran más bien contradictorios. Chabenat y cols. (1988) indican que, probablemente, debido a sus características fisicoquímicas, el acamprosato sea capaz de cruzar las barreras biológicas gracias a la presencia de algún tipo de portador.

Sin embargo, otro estudio posterior (SAIVIN y cols., 1998) sugiere que el acamprosato podría absorberse a nivel intestinal, al menos en parte, por la vía paracelular, es decir, a través de las uniones que existen entre las células epiteliales. No obstante, estos autores no aportan evidencias experimentales que avalen su hipótesis.

El estudio publicado recientemente por Más-Serrano y cols. (2000) es el único que aborda un estudio mecanístico del problema. Para ello, los autores ensayaron una amplia gama de concentraciones de fármaco (desde 0.01 mM hasta 80 mM) en intestino de rata aislado mediante una técnica *in vitro*. Sus resultados demostraron que el acamprosato se absorbe a través del intestino de rata mediante un proceso de difusión pasiva, es decir, se trata de una cinética aparente de carácter lineal. Adicionalmente el estudio se realizó tanto en ratas alcohólicas como en ratas control comprobándose, además, que no existe ningún efecto del alcoholismo crónico en el transporte intestinal del fármaco. De hecho, los valores de permeabilidad efectiva obtenidos en el grupo control (0.213 ± 0.004 cm/h) y en el grupo alcohólico (0.206 ± 0.001 cm/h) son prácticamente idénticos.

Aunque algunos autores han sugerido la posibilidad del transporte del fármaco mediante portadores (CHABENAT y cols., 1988), en el estudio de Más-Serrano y cols. (2000) no se detectaron indicios de saturabilidad del proceso. Sin embargo, este grupo investigador, estudió la absorción del acamprosato en presencia de compuestos estructuralmente relacionados con él, como la taurina o el GABA, que pudieran actuar

como posibles inhibidores. En los ensayos realizados con una concentración de fármaco 1 mM y 40 mM de inhibidor no se detectó una inhibición apreciable del proceso. Sin embargo, cuando ensayaron una concentración de acamprosato de 100 μ M y 40 mM de taurina o de GABA, se evidenció una inhibición del flujo de acamprosato a través del intestino del orden del 30 % en ambos casos tanto en el grupo control como en el grupo sometido a un tratamiento de alcoholismo crónico. En la *Figura 1.8* se resumen los resultados obtenidos por este grupo de trabajo.

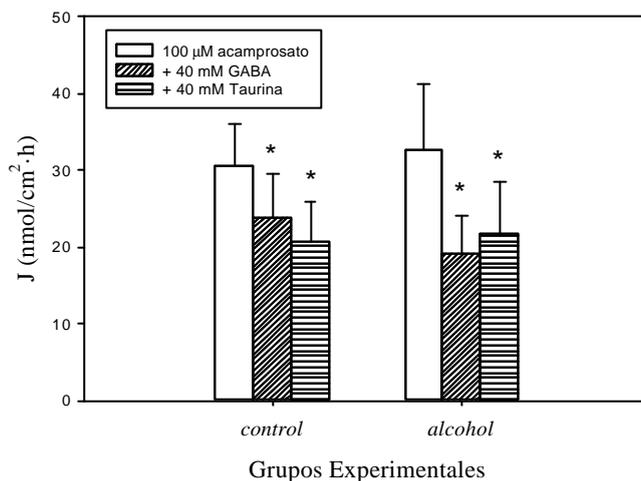


Figura 1.8 Efecto inhibitor de la taurina y del GABA en el flujo de acamprosato. Las barras representan el transporte de fármaco 100 μ M en ausencia y en presencia de los aminoácidos ensayados. (*) Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). (Tomado de Más-Serrano y cols., 2000)

Finalmente Más-Serrano y cols. apuntan como posible proceso implicado en el transporte intestinal del acamprosato, y que podría ser responsable de su baja biodisponibilidad oral en magnitud, a un hipotético sistema de secreción desde el enterocito hasta el lumen intestinal. Diversos estudios han demostrado la presencia de transportadores específicos que median la secreción de fármacos y reducen su biodisponibilidad. Un ejemplo de estos sistemas es la Glicoproteína P (ARIMORI y

NAKANO, 1998). Se trata de un portador de amplio espectro localizado en la membrana del borde en cepillo de los enterocitos y que está involucrado en la secreción, desde el enterocito hasta el lumen intestinal, de diversos fármacos, como algunos antineoplásicos (LEU y HUANG, 1995), glicósidos cardíacos (SU y HUANG, 1996), péptidos (AUNGST y SAITOH, 1996) y cationes orgánicos (SAITOH y AUNGST, 1995), provocando una reducción aparente de su absorción. La mayoría de sustratos de la glicoproteína P son sustancias de naturaleza hidrofóbica (ZAMORA y cols., 1998) y de un peso molecular entre 200 y 300 daltons (UEDA y cols., 1997); no obstante se sabe que se trata de un portador bastante inespecífico.

1.3.3 Promoción de la absorción intestinal

El epitelio intestinal es una de las principales barreras para la absorción o ingreso en el organismo de nutrientes y xenobióticos. Las principales alternativas para incrementar la absorción de moléculas con una limitada permeabilidad intestinal son: transformación en un profármaco de naturaleza más lipófila que la molécula nativa, modulación de su estructura para convertirlo en sustrato de algún transportador y/o la coadministración junto a promotores de su absorción.

El empleo de promotores de absorción, en el caso de compuestos que se absorben por difusión pasiva, no es novedoso en el ámbito biofarmacéutico y tecnológico. Son muy diversas las sustancias que pueden emplearse como promotores de la absorción (DE BOER, 1994). Los principales tipos de sustancias empleadas como tales son: tensioactivos, ácidos grasos, glicerol de cadena media, detergentes esteroideos, acilcarnitina y alcanoilcolinas, **a**-aminoácidos N-acetilados, quitosanos y otros polímeros mucoadhesivos (AUNGST, 2000). En los últimos años se están estudiando compuestos con capacidad para promover la absorción de moléculas con una baja permeabilidad intestinal que actúan principalmente regulando de un modo reversible el paso a través de las uniones intercelulares. Cabe destacar moléculas como la toxina de la Zonula occludens (Zot), proteína de 45 kDa procedente de la cubierta celular de la bacteria *Vibrio cholerae* (FASANO y cols., 1997; COX y cols., 2002), la toxina ΔG , la cual se trata de un fragmento de menor tamaño (12 kDa) procedente de Zot (DI PIERRO y cols.,

44 Antecedentes

2001; SALAMA y cols., 2003) o moléculas dadoras de óxido nítrico como el NOC5 y el NOC12 (YAMAMOTO y cols., 2001).

Dos de estas sustancias, el Polisorbato 80 y el Caprato sódico, han centrado nuestra atención por su demostrada capacidad para incrementar la absorción intestinal de diversos compuestos por distintos mecanismos y porque no causan efectos tóxicos a nivel de la membrana intestinal a la concentración efectiva. (SAWADA y cols., 1991; PEREZ-BUENDIA y cols., 1993). A continuación se describen de forma somera los principales efectos del polisorbato 80 y el caprato sódico en la absorción intestinal de distintos compuestos.

A) Polisorbato 80

En general, se considera que los tensiactivos no iónicos incrementan mayoritariamente la permeabilidad de compuestos a través de la vía transcelular (BERMEJO y cols., 1991; ANDERBERG y cols., 1992). Los efectos del Polisorbato 80 (tensiactivo no iónico) sobre la absorción intestinal de distintas sustancias han sido extensamente analizados por distintos autores. Estos efectos son complejos y claramente dependientes de las concentraciones empleadas. Su uso como promotor para la absorción de sustancias de moderado a bajo peso molecular y moderada a elevada hidrofilia, radica en su capacidad para incrementar la polaridad de la membrana absorbente (BERMEJO y cols., 1991; ANDERBERG y cols., 1992). Recientemente, Rege y cols. (2002) han puesto en evidencia que el polisorbato 80 también es capaz de inhibir el transportador de péptidos en cultivos de células Caco-2.

Ensayos realizados, *in situ*, en colon de rata han demostrado que tensiactivos naturales como el taurocolato sódico, al igual que tensiactivos sintéticos como el polisorbato 80 son capaces de incrementar de un modo significativo el valor de k_a de las moléculas más hidrofílicas de una serie homóloga (BERMEJO y cols., 1991). Así pues, aquellas sustancias que por su moderada o elevada hidrofilia difundan lentamente a través de la membrana absorbente, podrían ver incrementada su velocidad de absorción (GARRIGUES y cols., 1992; FABRA-CAMPOS y cols., 1994) en presencia de un tensiactivo como el polisorbato 80. Este podría ser el caso del acamprosatato.

B) Caprato sódico

El caprato sódico es un ácido graso de cadena media (C10) que también se ha estudiado ampliamente debido a sus efectos promotores de la absorción intestinal de diversos compuestos (SAWADA y cols., 1998; LINDMARK y cols., 1997). El caprato sódico es capaz de incrementar, de un modo significativo, la permeabilidad efectiva (P_{ef}) del manitol, la vasopresina, y diversos polietilenglicoles (PM=238-502 daltons) determinada en monocapas de células Caco-2. En concreto, el caprato sódico 13 mM fue capaz de incrementar unas seis veces valor de la P_{ef} del manitol en sus condiciones de ensayo (LINDMARK y cols., 1997; LINDMARK y cols., 1998).

Del mismo modo, los ensayos realizados por Tomita y cols. (1988) empleando como sustrato experimental unos sacos intestinales obtenidos a partir del duodeno de rata, demostraron que la presencia del caprato sódico era capaz de incrementar la constante de velocidad de absorción (k_a) del cefmetazol unas 6 veces respecto a su valor intrínseco.

Según algunos autores, el caprato sódico actúa fundamentalmente incrementando la absorción por la ruta paracelular (LO y HUANG, 2000). Se piensa que su acción sobre la estructura de las uniones estrechas consiste en producir una deformación estructural en éstas a modo de dilataciones, siendo el tamaño y el número de dilataciones dependientes del tiempo de exposición de las células al caprato sódico (ANDERBERG y cols., 1993). Recientemente, Watson y cols. (2001) han demostrado que este ácido graso no ejerce efecto sobre el diámetro del poro intercelular, sino que incrementa la permeabilidad, posiblemente aumentando el número de poros funcionales. Aunque estos fenómenos se han detectado en cultivos celulares, es previsible que éstos también se produzcan *in vivo*.

Aunque las propiedades promotoras del polisorbato 80 y el caprato sódico se han demostrado extensamente en estudios *in vitro* e *in situ* (BERMEJO y cols., 1991; ANDERBERG y cols., 1992 y 1993; SAKAI y cols., 1997; LINDMARK y cols., 1998), son escasos los estudios en los que se demuestre su eficacia *in vivo*. Según Chao y cols., (1999) el caprato sódico es capaz de incrementar la absorción intestinal de un decapeptido *in vitro* e *in vivo*, sin embargo, los resultados obtenidos por Lennernäs y cols. (2002) muestran que el C10 tiene un efecto limitado, determinado *in vivo*, en la promoción de moléculas a través de la membrana rectal en humanos. Este último grupo

46 *Antecedentes*

investigador concluye que los estudios *in vivo* son necesarios para validar los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* e *in situ*. Además, los ensayos *in vivo* también serán necesarios para determinar la dosis efectiva de promotor que se debería adicionar a futuras formulaciones.

Por tanto, teniendo en cuenta las características físico-químicas del acamprosato se seleccionaron dos moléculas que probablemente fueran capaces de incrementar la permeabilidad intestinal del fármaco. Además, el empleo de estas sustancias puede ser una herramienta válida para identificar la principal ruta difusional empleada por el compuesto para su absorción (transcelular o paracelular) (KNIPPT y cols., 1997).

1.4 OBJETIVOS

La presente Memoria se enmarca dentro de un proyecto de investigación titulado: "Optimización de la farmacoterapia de la dependencia alcohólica con acamprosato: estudio de los mecanismos de absorción y eliminación del fármaco. Estrategias para la mejora de las pautas posológicas". Los objetivos perseguidos con la realización de los experimentos presentados en la presente Memoria fueron los siguientes:

1. Caracterizar la farmacocinética del acamprosato tras su administración intravenosa en forma de *bolus* en la rata. En concreto, el primer objetivo era establecer con claridad:
 - 1.1. La existencia, o no, de linealidad en la disposición del fármaco
 - 1.2. Las vías de eliminación del fármaco
2. Caracterizar los mecanismos involucrados en la excreción renal del acamprosato
3. Establecer los mecanismos y rutas que participan en la absorción oral del fármaco
4. Iniciar los estudios sobre la promoción de la absorción intestinal del acamprosato

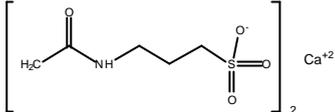
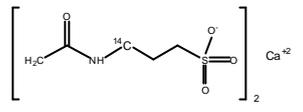
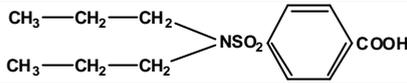
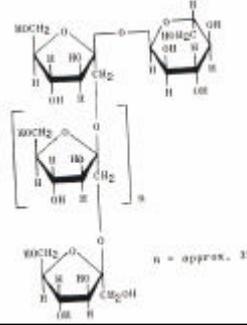
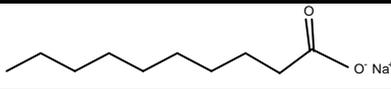
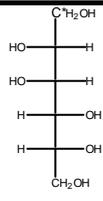
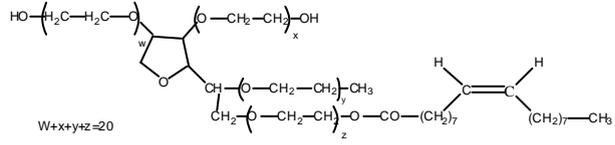
2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 COMPUESTOS ENSAYADOS

El fármaco objeto de estudio de la presente Memoria es el acamprosato o bis-acetilhomotaurinato cálcico. Adicionalmente, para el desarrollo de los distintos estudios incluidos en este trabajo, se han empleado otras sustancias relacionadas a continuación, cuyas estructuras químicas y pesos moleculares aparecen detallados en el *Cuadro 2.1*:

- **Acamprosato**, en su forma cristalina, concretamente como sal cálcica, cedido gratuitamente por *Laboratorios Lipha*[®] S.A. (Lyon).

- **¹⁴C-Acamprosato**, en su forma cristalina (sal cálcica), cedido gratuitamente por *Laboratorios Lipha S.A.* (Lyon). El producto suministrado presenta una actividad total de 1 mCi, y una actividad específica de 90.0 mCi/mmol. El ¹⁴C-acamprosato cuenta en su estructura con el isótopo ¹⁴C en dos de los carbonos de su molécula tal y como se muestra en el *Cuadro 2.1*
- **Inulina**, polisacárido de P.M. ~ 5000 g/mol, formado básicamente por unidades de fructosa que, dadas sus peculiares características de eliminación, se puede utilizar para la evaluación fiable de la función renal y, en concreto, de la velocidad de filtración glomerular. La sustancia ha sido suministrada por *Merck*[®].
- **¹⁴C-Manitol**, suministrado por *NEN Life Science Products (Perkin-Elmer)*[®]. Se adquirieron 0.5 µCi del producto, el cual presenta una actividad específica de 45 mCi/mmol. Cuenta en su estructura con el isótopo ¹⁴C en uno de los carbonos de su molécula como se aprecia en el *Cuadro 2.1*.
- **Probenecid**, en su forma cristalina. Su denominación química es ácido p-(dipropilsulfamoil) benzoico. Suministrado por *Sigma[®] Chemical Co.* (St. Louis).
- **Caprato sódico**, en su forma cristalina. Su denominación química es ácido n-decanoico (riqueza 99-100%). Suministrado por *Sigma[®] Chemical Co.* (St. Louis).
- **Polisorbato 80**, tensiactivo no iónico en su forma líquida. Su denominación química es polioxietilen (20)-sorbitan-monoleato. Suministrado por *Sigma[®] Chemical Co.* (St. Louis).

Compuesto (DCI)	Estructura	PM (g/mol)
Acamprosato		403,39
¹⁴ C-acamprosato		403,39
Probenecid		285,4
Inulina		≅ 5000
Caprato sódico		194,2
¹⁴ C-manitol		182,2
Polisorbato 80		1282

Cuadro 2.1 Denominación común internacional (DCI), estructura química y pesos moleculares de las sustancias empleadas para la realización de la presente Memoria.

2.2 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

El animal de experimentación empleado para la realización de este trabajo ha sido la rata albina macho de raza Wistar. En los ensayos de absorción intestinal *in situ* e *in vivo*, se emplearon animales de peso comprendido entre 220-280 g. Las ratas de peso comprendido entre 280-320 gramos se utilizaron para aquellos ensayos en que se tuvo que canular la vena yugular del animal.

Previamente a la administración del fármaco, todos los animales se mantuvieron en ayunas durante un periodo aproximado de 18-24 horas, en el que se dispusieron en jaulas con doble fondo, a fin de evitar la coprofagia, y con acceso libre al agua de bebida.

Todos los animales se criaron en el estabulario de la Facultad de Farmacia de Valencia, y se mantuvieron con una dieta equilibrada (dieta sólida estándar) en perfectas condiciones higiénicas y climáticas:

- ✓ Temperatura: 23 ± 1 °C
- ✓ Humedad: 60 %
- ✓ Ciclos de luz y oscuridad: 12-12 horas (Conexión de 8:00 a 20:00)

2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ELIMINACIÓN

El estudio de los mecanismos implicados en la eliminación del acamprosato se ha abordado a través de cuatro tipos de experimentos, los cuales se han realizado en el siguiente orden cronológico:

- Cálculo de la fracción inalterada de acamprosato en orina tras administración intravenosa rápida.
- Determinación de las curvas de nivel plasmático tras la administración intravenosa rápida de tres dosis de acamprosato.
- Estimación de los aclaramientos total y renal de acamprosato en condiciones de estado estacionario a tres velocidades de perfusión diferentes.
- Administración conjunta de un conocido inhibidor de la secreción tubular activa como el probenecid (10 y 20 mg) y acamprosato.

2.3.1 DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN INALTERADA DE ACAMPROSATO EN ORINA TRAS ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA RÁPIDA

2.3.1.1 Soluciones de trabajo

A) Solución de acamprosato

Para la determinación de la fracción inalterada de fármaco en orina tras administración intravenosa rápida, se empleó una disolución de 44 mg/ml de

acamprosato. Esta disolución se preparó con solución salina isotónica.

Puesto que a todos los animales se les administró 0.5 ml, la dosis ensayada fue de **22 mg** de **acamprosato**.

B) Solución de inulina

Se preparó una disolución de inulina, de concentración 20 mg/ml, en agua bidestilada. El volumen que se administró a cada animal siempre fue de 0.5 ml, por tanto la dosis administrada de inulina siempre fue de **10 mg**.

C) Reactivo de antrona

El reactivo de antrona está constituido por una disolución de antrona, al 2%, en ácido sulfúrico del 70%. Esta solución es muy sensible a la luz, por lo que se almacenó en un frasco topacio, renovándose cada 2-3 semanas.

2.3.1.2 Métodos quirúrgicos

Para la realización de este conjunto de experimentos se sometió al animal de experimentación a una doble intervención quirúrgica. En primer lugar, se le implantó una cánula en la vejiga urinaria, lo que permite su lavado directo y, por tanto, la recogida de la orina que contiene a tiempos preestablecidos. En segundo lugar, y manteniendo al animal anestesiado, se le implantó una cánula en la vena yugular derecha.

En el *Epígrafe 2.3.1.2.1* se describen tanto los procedimientos seguidos para la fabricación de la cánula que se implanta en la vejiga urinaria como la técnica quirúrgica para su implantación.

La elaboración del material empleado para la implantación de la cánula en la vena yugular y posterior administración de preparados y toma de muestras, así como los procedimientos quirúrgicos se describen en el *Epígrafe 2.3.1.2.2*.

2.3.1.2.1 Implantación de la cánula en la vejiga urinaria

1) *Cánula de implantación en vejiga urinaria*

La cánula urinaria se prepara a partir de un fragmento de tubo de polietileno rígido de 1.5 cm de longitud, 0.5 mm de diámetro interno y 1 mm de diámetro externo. En dicho fragmento se depositan 2 gotas de polietileno fundido por calor en uno de sus extremos y el otro extremo se corta a modo de bisel. La cánula se completa adaptando al extremo biselado un fragmento de tubo de silicona, de unos 18 cm de longitud, con un hilo de seda adherido con silicona a 1 cm del punto de conexión con el tubo de polietileno. El conjunto se esteriliza en autoclave antes de su utilización.

2) *Aguja de exteriorización*

Esta aguja se utiliza para conducir la cánula por debajo de la piel de la rata hasta el punto deseado para, atravesando la piel, sacarla al exterior.

Esta aguja debe reunir dos condiciones: ser robusta para atravesar la piel del animal y acoplar con el diámetro interno de la cánula. Para ello, se introduce, a presión, una aguja de 0.75 mm de diámetro (20G) dentro de otra de 1.15 mm de diámetro.

3) *Obturador*

El obturador se utiliza como tapón de la cánula por su extremo externo.

Se prepara a partir de tubo de polietileno de 0.5 mm de diámetro interno y 1 mm de diámetro externo. En el que un extremo se obtiene cortando el tubo en bisel y el otro tras aplicación de una fuente de calor (llama) y posterior prensado para así cerrar la luz del tubo.

4) *Tubo puente*

Se trata de un tubo que se conecta a modo de prolongación, a la cánula implantada en la vena yugular de la rata con lo cual se facilita el acceso al torrente sanguíneo permitiendo el libre movimiento del animal en el interior de la jaula donde se encuentra alojado.

Se prepara a partir de un tubo de silicona de 12-15 cm de longitud, 0.5 mm de diámetro interno y 1 mm de diámetro externo. A continuación se fija un hilo a unos 3 cm de uno de los extremos con ayuda de goma adhesiva de silicona. Este hilo podrá sujetarse, mediante una pinza fijada a un pie metálico, y de este modo se puede elevar a la altura deseada sobre la rata.

La conexión entre la cánula y el tubo puente se efectúa mediante un fragmento de tubo de polietileno de 0.5 mm de diámetro interno y 1 mm de diámetro externo, en el que un extremo está cortado en forma de bisel.

5) *Implantación de la cánula en la vejiga urinaria*

El proceso comienza con la anestesia del animal, la cual se consigue introduciéndolo en el interior de una pequeña campana de gases donde se ha vertido un pequeño volumen de éter dietílico.

Una vez anestesiado el animal, se coloca en el tablero de operaciones en posición de decúbito supino y se le fijan las extremidades, con cinta adhesiva, al tablero.

La anestesia se mantiene durante toda la operación mediante una torunda de algodón empapada con éter dietílico y depositada en el fondo de un vaso de precipitados pequeño, cuya boca se sitúa en las inmediaciones de las fosas nasales de la rata.

A continuación se realiza una incisión longitudinal de 1 cm en la zona baja del abdomen con ayuda de unas tijeras de punta roma y unas pinzas de diente de ratón, se separándose las capas subcutáneas y musculares hasta dejar al descubierto la vejiga. Seguidamente, se efectúa un pequeño corte en la vejiga y se introduce el extremo del

fragmento de polietileno de la cánula en el orificio practicado. La cánula se fija en la vejiga con un hilo, anudando fuertemente para evitar fugas de líquido por el orificio. A continuación se fija el tubo de silicona al músculo recto abdominal y se exterioriza el extremo libre por el cuello del animal. Tras la exteriorización de la cánula se taponan el extremo libre de la misma con un obturador. El proceso concluye con la irrigación de la herida con povidona yodada al 10% y la sutura de la capa muscular y la subcutánea. La correcta sutura y desinfección de la herida son de gran importancia en este tipo de intervención ya que de no ser así, se corre un elevado riesgo de que se infecte la herida.

2.3.1.2.2 Implantación de la cánula en la vena yugular

1) Cánula de implantación en vena yugular

Las cánulas se preparan a partir de un tubo de silicona de 12 cm de longitud. A unos 4 centímetros de uno de sus extremos se adhiere un hilo de seda trenzada de calibre 4/0 USP, de aproximadamente 20 cm de longitud, con ayuda de adhesivo de silicona.

En el momento de utilizar la cánula, el extremo corto de la misma se recorta a 34 mm, medidos desde el punto donde comienza la goma adhesiva.

Las cánulas se esterilizan en el autoclave antes de su implantación.

2) Aguja de implantación

Se obtuvo a partir de un catéter Abbocath-T (20 G X 32 mm), recortando la aguja y su correspondiente funda de plástico.

La funda de plástico queda recubriendo la aguja, la cual tendrá el mismo diámetro externo que la cánula. Esto evitará discontinuidades que dificulten la implantación.

3) *Implantación de cánula en vena yugular*

La técnica de canulación permanente de la vena yugular de la rata ha sido desarrollada por nuestro grupo de investigación, siguiendo alguna de las directrices reseñadas en la bibliografía (WAELEDELE y STOCLET, 1973; HARMS y OJEDA, 1974; UPTON, 1975; MIGDALOFF, 1976; BONNET y cols., 1978; JOHANNESSEN, 1982; BAKAR y NIAZI, 1983).

El proceso de canulación comienza con la anestesia del animal, introduciéndolo en el interior de una pequeña campana de gases donde se ha vertido un pequeño volumen de éter dietílico.

Una vez anestesiado el animal, se coloca en el tablero de operaciones en posición de decúbito supino y se le fijan las extremidades, con cinta adhesiva, al tablero.

La anestesia se mantiene durante toda la operación mediante una torunda de algodón empapada con éter dietílico y depositada en el fondo de un vaso de precipitados pequeño, cuya boca se sitúa en las inmediaciones de las fosas nasales de la rata.

Posteriormente se localiza la zona media clavicular y con la ayuda de unas pinzas de diente de ratón y unas tijeras de punta roma se practica la incisión, de forma longitudinal, de la piel del animal. A continuación, se separan las capas superiores de tejido subcutáneo con la ayuda de unas tijeras de punta fina y unas pinzas de diente de ratón de menor tamaño a las anteriormente utilizadas, hasta dejar al descubierto aproximadamente 1 cm de la vena.

Al extremo largo de la cánula previamente fabricada se conecta una jeringuilla que contiene suero fisiológico heparinizado y atemperado a 37°C. Se comprueba que la cánula funciona correctamente y se deja llena de suero. Al extremo corto se le conecta la aguja de implantación.

Posteriormente, se introduce cuidadosamente la punta de la aguja de implantación en la parte alta de la vena, avanzando aproximadamente 5 mm por el interior de la misma, en dirección hacia el corazón, hasta que se saca de nuevo al exterior. Lentamente, se tira

de la aguja al tiempo que se gira sobre su eje hasta que el extremo de la cánula queda fuera de la vena. En este momento, se desconecta la aguja de implantación, y con la ayuda de unas pinzas de punta fina, se hace retroceder la cánula hasta que el extremo vuelva a situarse en la luz del vaso. Para comprobar que la cánula se encuentra en el interior de la vena se succiona suavemente con el émbolo de la jeringuilla, observándose en tal caso que la sangre fluye por el interior de la cánula hasta llegar a la jeringa. Se hace avanzar la cánula por el interior del vaso, hasta el punto de unión con el hilo de seda. En este momento, el extremo de la cánula introducido se encuentra en el atrio de la aurícula derecha de la rata. A continuación se fija la cánula al músculo adyacente a la zona de implantación mediante el hilo de seda que lleva unido.

Tras comprobar que el nudo para fijar la cánula no la estrangula y funciona perfectamente, se sustituye la jeringa por la aguja de exteriorización, la cual se hace pasar entre la piel y el tejido subcutáneo hasta la zona dorsal del cuello donde se extrae el extremo largo de la cánula al exterior. A continuación se desconecta la aguja de exteriorización y se tapona con un obturador.

Finalmente, la herida practicada se desinfecta con povidona yodada al 10% y se sutura con ayuda de una aguja convencional e hilo de seda.

El tiempo habitual que se requiere para completar el proceso de canulación es inferior a 30 minutos. La *Figura 2.1* muestra, de forma esquemática, este proceso.

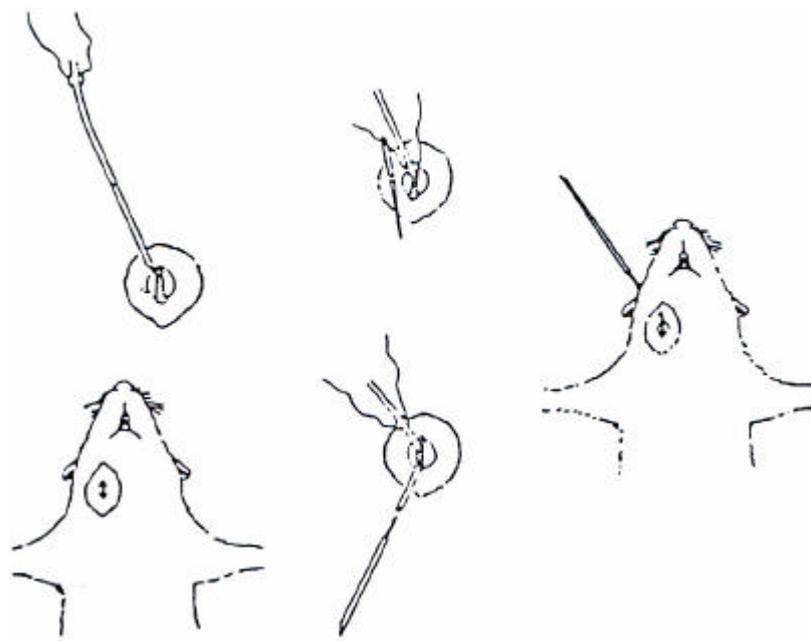


Figura 2.1 Representación esquemática de los principales pasos seguidos durante la canulación de la vena yugular de la rata.

2.3.1.3 Protocolo experimental

La administración siempre se realizó durante las 12-18 horas siguientes a la intervención quirúrgica.

En el momento de la administración, la rata se encontraba completamente despierta, con libertad de movimientos dentro de la jaula, y con acceso libre al agua de bebida. Puesto que no se ensayaron diferentes dosis de fármaco, el único grupo experimental fue denominado **grupo A-1**.

En todas las experiencias la administración fue intravenosa y se realizó mediante inyección rápida siguiendo el protocolo que a continuación se detalla:

1º) 0.5 ml de solución de inulina 20 mg/ml

2º) 0.5 ml de solución de acamprosato (44 mg/ml)

3º) 0.5 ml de suero fisiológico heparinizado atemperado a 37 °C

El cronómetro se puso en marcha inmediatamente después de administrar la disolución de acamprosato.

Todos los experimentos se realizaron en jaulas metabólicas, lo cual permitió recoger la orina de los animales tratados, correspondiente a los periodos 0-3 y 3-6 horas postadministración. Se forzó la micción del animal para la recogida de las muestras de orina en los intervalos de tiempo indicados. Para ello se inyectaron en la vejiga, lentamente, 3 ml de suero fisiológico. La jaula se lavó con agua bidestilada con el fin de arrastrar posibles restos de orina hasta el recipiente de recogida. En este proceso de lavado, se utilizó el mínimo volumen de agua con el fin de evitar una mayor dilución de las muestras y la consiguiente pérdida de sensibilidad analítica.

2.3.1.4 Tratamiento analítico y valoración de las muestras

Para la determinación de la fracción de acamprosato excretada de forma inalterada en la orina de los animales tratados se cuantificó tanto el acamprosato presente en las muestras urinarias recogidas como la fracción de inulina. En estos experimentos la valoración del contenido de inulina se emplea para evaluar la bondad del proceso de recogida y finalmente corregir los valores de fracción de acamprosato presente en la orina.

En el *Epígrafe 2.3.1.4.1* se describen, en detalle, todos los aspectos relacionados con la valoración del acamprosato. Los matices correspondientes a la cuantificación de inulina se resumen en el *Epígrafe 2.3.1.4.2*.

2.3.1.4.1 Valoración de acamprosato

La técnica analítica empleada para la valoración de los niveles de acamprosato excretados de forma inalterada en la orina tras su administración intravenosa, se realizó mediante cromatografía líquido-líquido de alta eficacia (HPLC) y detección espectrofotométrica.

El sistema cromatográfico utilizado está constituido por los siguientes elementos:

- Bomba isocrática "Waters 515 HPLC Pump"
- Inyector "Rheodyne" de volumen de inyección variable
- Espectrofotómetro UV-Visible "Waters 486"
- Registrador-Integrador "Waters 743 Data Module"

Como fase estacionaria se empleó un sistema de fase inversa constituido por una columna Novapak C-18 de "Waters", de 150 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno y rellena de sustrato pelicular silíceo con grupos de 18 átomos de carbono, cuyo tamaño de partícula es de 4 μm .

La fase móvil se preparó a partir de una solución tampón de **acetato sódico** 0.1 mM de pH= 4.5, **bromuro de tetradeciltrimetil amonio** (BTDTA) 40 mM y **metanol** en la proporción de 90/6/4. Posteriormente dicha fase se filtró a través de filtros de nylon "Osmonics" (Minnetonka, Minnesota) de 0.45 μm de diámetro de poro, con ayuda de un dispositivo de filtración por vacío, con objeto de desgasificar y eliminar las partículas sólidas presentes en la misma.

El flujo de elución de la fase móvil siempre fue de 1 ml/min, soportando el sistema una presión máxima de 2300 psi. El volumen de muestra inyectado fue de 200 μl y se detectó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 214 nm.

2.3.1.4.1.1 Evaluación de la técnica analítica: exactitud y precisión

Para comprobar la linealidad del método analítico se prepararon seis soluciones patrón de acamprosato a las siguientes concentraciones: 1000, 800, 600, 400, 100 y 50 µg/ml. Los patrones se prepararon por triplicado. Los resultados obtenidos después de la valoración de estos patrones mostraron una excelente linealidad en función de la concentración de acamprosato.

Para la evaluación de la exactitud y la reproducibilidad del método analítico, se prepararon 3 rectas de calibración con cinco patrones distintos de acamprosato en solución acuosa en cada una de ellas (800, 600, 400, 200 y 100 µg/ml). Cada patrón se valoró por triplicado como si se tratase de una muestra de concentración desconocida. Los valores de concentración de acamprosato se calcularon interpolando los valores de área obtenidos en las correspondientes rectas de calibración. Se promediaron los valores de concentración calculados para cada patrón y se determinó el coeficiente de variación. La desviación del valor medio respecto del teórico es indicativa de la exactitud, mientras que el coeficiente de variación lo es de la precisión.

2.3.1.4.2 Valoración de inulina

La única vía de eliminación de la inulina es la filtración glomerular (GUYTON y HALL, 1999). Por tanto, la determinación de la fracción de inulina presente en las muestras de orina, permitirá detectar y cuantificar las pérdidas ocurridas durante la recogida muestral y en última instancia corregir el porcentaje de acamprosato excretado a través de la orina.

Para la determinación de la inulina en las muestras de orina, se utilizó un procedimiento espectrofotométrico basado en la medición del color que aparece en las muestras tras reaccionar el polisacárido con antrona en medio ácido (GLOFF y BENET, 1988).

Se tomaron 0.1 ml de las muestras de orina, previamente diluidas con volumen adecuado de agua bidestilada, y se adicionaron directamente sobre 0.9 ml del reactivo de antrona. La mezcla se mantuvo en baño de agua atemperado a 37°C y en agitación

durante 1 hora. Posteriormente se procedió a la lectura de la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro "Hitachi" modelo U-2000.

Puesto que el plasma de animales no tratados desarrolló color tras reaccionar con la antrona, se hizo necesaria la utilización de un blanco constituido por dicho fluido, extraído justo antes de la administración de la inulina (tiempo 0 min).

La determinación de la concentración de inulina en las muestras de orina se realizó mediante la interpolación del valor de absorbancia obtenido para cada muestra en las rectas de calibración preparadas según se describe a continuación.

2.3.1.4.2.1 Rectas de calibración. Evaluación de la linealidad del método analítico.

El método analítico empleado para la cuantificación de inulina en orina fue validado por nuestro grupo investigador con anterioridad (GRANERO y cols., 1993). Para determinar las concentraciones de inulina en las muestras problema, se prepararon 3 rectas de calibración con cinco patrones de inulina preparados en agua, a las concentraciones de 25, 50, 75, 100 y 150 $\mu\text{g/ml}$, según el método descrito anteriormente.

2.3.1.5 Cálculos farmacocinéticos

El principal objetivo de este experimento fue determinar la fracción de acamprosato que se eliminaba de forma inalterada a través de la orina. Para el cálculo de este valor se empleó la siguiente ecuación:

$$F_{Acamprosato} (\%) = \frac{U_t^{t'} \cdot 10000}{D_{Acamprosato} \cdot I_{Inulina}} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

donde $F_{Acamprosato}$ representa la fracción de dosis de acamprosato excretado de forma inalterada en la orina del animal, expresada en porcentaje, $U_t^{t'}$ representa la cantidad de acamprosato excretada en la orina correspondiente al periodo t-t', $D_{Acamprosato}$ la dosis de acamprosato administrada e $I_{Inulina}$ el porcentaje de inulina recogida en la muestra urinaria correspondiente al periodo t-t'.

2.3.2 CURVAS DE NIVEL PLASMÁTICO TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA RÁPIDA DE TRES DOSIS DE ACAMPROSATO

2.3.2.1 *Soluciones de trabajo*

A) *Soluciones de acamprosato*

Para el estudio de la farmacocinética del acamprosato se utilizaron tres soluciones, de concentración 5.6 mg/ml, 22 mg/ml y 44 mg/ml, para todos los experimentos. Todas las disoluciones se prepararon con solución salina isotónica.

El volumen que se administró a cada animal siempre fue de 0.5 ml, por tanto las dosis ensayadas fueron **2.8, 11 y 22 mg** de acamprosato.

B) *Disoluciones de ¹⁴C-acamprosato*

Con el fin de facilitar el trabajo, y para realizar una manipulación mucho más segura del producto radiactivo se prepararon dos disoluciones ("disolución madre" y "disolución I") previas a la dosis:

- **"Disolución madre"**: Se preparó disolviendo todo el polvo disponible (1000 μ Ci) en 500 μ l de agua bidestilada. Por tanto la actividad de esta solución fue de 2000 μ Ci/ml, y la concentración de ¹⁴C-acamprosato de 22 mM.
- **"Disolución I"**: Se preparó mezclando 50 μ l de "disolución madre" con 950 μ l de agua bidestilada. Su actividad fue de 100 μ Ci/ml y su concentración de 1.1 mM.

- **Dosis:** La preparación de la dosis se realizó del siguiente modo: se diluyeron 75 μl de "disolución I" en 300 μl de agua bidestilada, siendo su actividad de 20 $\mu\text{Ci/ml}$. El volumen administrado fue de 0.25 ml, que contenía un total de 5 μCi .

C) Suero fisiológico heparinizado

El suero fisiológico heparinizado se utilizó con dos finalidades: para arrastrar las disoluciones inyectadas a través de la cánula y asegurar así la correcta administración de los preparados y, para eliminar la sangre que quedaba ocupando la cánula una vez tomada la muestra sanguínea. La fórmula del suero fisiológico heparinizado utilizado es:

- NaCl..... 9 g/1000 ml
- Heparina 20 UI/ ml

2.3.2.2 Métodos quirúrgicos

Los animales utilizados en este experimento fueron canulados de modo permanente en la vena yugular derecha.

Tanto la fabricación del material empleado para la implantación de la cánula en la vena yugular como los procedimientos quirúrgicos coinciden con los descritos previamente en el *Epígrafe 2.3.1.2.2* .

2.3.2.3 Protocolo experimental

Los animales pertenecientes a este conjunto de experimentos se distribuyeron en 3 grupos, de 6 animales cada uno, en función de la dosis administrada de acamprosato.

El ensayo se diseñó de manera que los animales fueron asignados de un modo totalmente aleatorio a alguno de los siguientes grupos experimentales:

- * **Grupo B-1:** 5 μCi de ^{14}C -acamprosato + 2.8 mg de acamprosato.
- * **Grupo B-2:** 5 μCi de ^{14}C -acamprosato + 11 mg de acamprosato.
- * **Grupo B-3:** 5 μCi de ^{14}C -acamprosato + 22 mg de acamprosato.

La administración siempre se realizó durante las 12-18 horas siguientes a la canulación. Para facilitar la administración de los preparados así como la toma de muestras se acopla a la cánula implantada, el tubo puente, el cual permite que en el momento de la administración, la rata se encuentre completamente despierta, con libertad de movimientos dentro de la jaula, y con acceso libre al agua de bebida.

Para la realización de los experimentos se emplearon jaulas metabólicas de la marca "Charles Rives Laboratorios" modelo E5MCCAG903.

En todas las experiencias la administración fue intravenosa y se realizó mediante inyección rápida en este orden:

- 1º) 0.25 ml de solución de ^{14}C -acamprosato 20 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$.
- 2º) 0.5 ml de solución de acamprosato (5.6, 22 ó 44 mg/ml).
- 3º) 0.5 ml de suero fisiológico heparinizado atemperado a 37 °C .

consumiendo todo este proceso de administración un tiempo inferior a 30 segundos en todos los casos. El cronómetro se puso en marcha inmediatamente después de administrar la disolución de acamprosato.

La recogida de muestras, tanto plasmáticas como urinarias se realizó del siguiente modo:

a) Muestras plasmáticas

Las muestras de sangre se obtuvieron en todos los grupos experimentales a los siguientes tiempos tras la administración del acamprosato: 2, 5, 10, 15, 20, 40, 60 y 80 minutos.

Aproximadamente 20 segundos antes del tiempo correspondiente a cada muestra, se succionó, con ayuda de una jeringuilla a la que se acopló una aguja de punta roma, el suero fisiológico heparinizado que se encuentra relleno en el tubo puente y la cánula. Con esta operación se consiguió que la muestra sanguínea tomada no quedara diluida por el suero fisiológico contenido en dichos tubos, y también permitió desechar la primera fracción de sangre, garantizando así que la muestra fuera lo más representativa posible.

A continuación, y coincidiendo con el tiempo de muestreo, se tomó un volumen de sangre de 0.35 ml aproximadamente, con una jeringuilla de toma de muestra que previamente había sido heparinizada para evitar la coagulación de la sangre.

Tras la toma de muestra, se inyectó con una nueva jeringa un volumen de suero fisiológico heparinizado igual al volumen de sangre extraída (0.35 ml) con el fin de dejar limpia la cánula y el tubo puente de sangre, y reponer la volemia del animal.

La muestra de sangre tomada se depositó en un tubo tipo "Eppendorf" de 1.5 ml, y se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 8 minutos. Con una nueva jeringuilla se recuperó el plasma sobrenadante y se depositó dentro de otro tubo tipo "Eppendorf" nuevo.

b) Muestras de orina

Se recogió la orina de los animales tratados, correspondiente al período 0-24 horas postadministración. Las jaulas se lavaron con agua bidestilada con el fin de arrastrar posibles restos de orina hasta el recipiente de recogida. Se utilizó un volumen de agua en cantidad suficiente para enrasar el recipiente graduado correspondiente (70 ml).

2.3.2.4 Tratamiento analítico y valoración de las muestras

Para la cuantificación de los niveles plasmáticos de acamprosato, se utilizó la medida de la radiactividad mediante un contador de centelleo en fase líquida. Se trata de una técnica muy sensible y adecuada para la cuantificación de emisiones tipo β como ocurre en el presente caso.

Para la determinación del contenido de ^{14}C -acamprosato en las muestras de orina, también se empleó el contaje de centelleo en fase líquida como técnica de valoración.

Como equipo de valoración se utilizó un contador de centelleo en fase líquida modelo MICROBETA[®] TRILUX de WALLAC. El contador está conectado a un ordenador personal PC PENTIUM 75, desde el cual se programa y selecciona la información que se quiere obtener acerca de la valoración.

Como líquido de centelleo se empleó un "cóctel" de alta seguridad para muestras acuosas y no acuosas: Optiphase "Hi Safe"[®] (Wallac Scintillation Products). No está sometido a la reglamentación de líquidos inflamables y es biodegradable.

Para el análisis de las muestras recogidas, éstas se prepararon siguiendo el siguiente protocolo:

a) *Muestras de plasma:*

La manipulación de las muestras de sangre se realizó tal como se describe en el *Epígrafe 2.3.2.3*. Una vez extraído el plasma y depositado en un tubo tipo "Eppendorf", la muestra se traspasó a unos viales que posteriormente se introdujeron en el contador de centelleo para su cuantificación.

Todos los viales contuvieron 3 ml de líquido de centelleo y 100 μl de plasma. Los viales así preparados, se sometieron a una ligera agitación manual, concluida la cual se procedió a la lectura.

b) *Muestras de orina:*

Se adicionaron 100 μl de la orina diluida, a 3 ml de líquido de centelleo. Los viales así preparados, se sometieron a una ligera agitación manual antes de su lectura.

2.3.2.4.1 Cálculo de las concentraciones de acamprosato

Para poder valorar la concentración de fármaco en plasma en todas las experiencias realizadas se asumió que la proporción entre acamprosato y ^{14}C -acamprosato no variaba a lo largo de los ensayos.

De este modo las Cpm registradas en cada muestra se transformaron en unidades de concentración mediante el uso de la proporción existente entre el acamprosato estable y las Cpm de ^{14}C -acamprosato en la dosis administrada.

2.3.2.4.2 Evaluación de la técnica analítica: exactitud y precisión

La validación del método de valoración, se prepararon una serie de disoluciones patrón tanto en agua como en plasma según se describe a continuación.

Se prepararon 5 disoluciones acuosas de ^{14}C -acamprosato, cuyas actividades teóricas fueron: 2000, 1600, 1000, 200 y 20 nCi/ml.

Los patrones de ^{14}C -acamprosato en agua, se prepararon tras realizar la dilución 1/10 de las anteriores soluciones acuosas. Puesto que se cuantificó una alícuota de 100 μl de cada uno de ellos, la actividad teórica total de los patrones de ^{14}C -acamprosato en agua fue: 20, 16, 10, 2 y 0.2 nCi.

La preparación de los patrones en plasma se realizó a partir de plasma recién obtenido de rata. Se utilizó plasma fresco con el fin de detectar posibles precipitaciones de las proteínas plasmáticas al entrar en contacto con el líquido de centelleo. La preparación de los patrones de ^{14}C -acamprosato plasma se realizó según refleja el *Cuadro 2.2*.

PATRÓN (nCi/ml)	Modo preparación	Volumen leído	A _T (nCi)
200	100 µl disolución acuosa 2000 nCi/ml + 900 µl plasma fresco	100 µl	20
160	100 µl disolución acuosa 1600 nCi/ml + 900 µl plasma fresco	100 µl	16
100	100 µl disolución acuosa 1000 nCi/ml + 900 µl plasma fresco	100 µl	10
20	100 µl disolución acuosa 200 nCi/ml + 900 µl plasma fresco	100 µl	2
2	100 µl disolución acuosa 20 nCi/ml + 900 µl plasma fresco	100 µl	0.2

Cuadro 2.2 Resumen de la composición de cada uno de las disoluciones patrón. En la última columna se indica la actividad teórica (A_T), expresada en nanocurios, presente en cada uno de las soluciones patrón empleadas.

Para la evaluación de la exactitud y la reproducibilidad del método analítico utilizado, se prepararon 3 rectas de calibración con cinco patrones distintos de ¹⁴C-acamprosato en plasma y de ¹⁴C-acamprosato en agua. Cada patrón se valoró por triplicado como si se tratase de una muestra de actividad desconocida. Los valores de actividad calculados para cada patrón se obtuvieron interpolando en las rectas de calibración preparadas. Se promediaron los valores de actividad calculados para cada patrón y se determinó el coeficiente de variación. La desviación del valor medio respecto del teórico es indicativa de la exactitud, mientras que el coeficiente de variación lo es de la precisión.

2.3.2.5 Métodos farmacocinéticos

Es importante indicar que en el esquema del modelo bicompartimental (*Figura 2.2*), la constante de velocidad de eliminación, k_{10} , siempre parte del compartimiento central puesto que los órganos eliminadores por anatomía, riñón e hígado, se consideran pertenecientes a dicho compartimiento por el elevado flujo sanguíneo que reciben (CALPENA y ESCRIBANO, 1997).

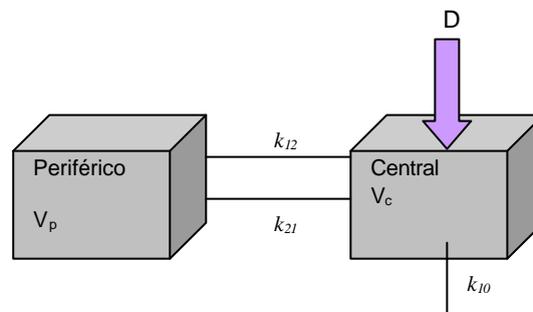


Figura 2.2 Esquema del modelo bicompartimental

La expresión matemática que describe la evolución temporal de la concentración plasmática del fármaco en el compartimiento central (C) es la siguiente:

$$C = A_0 \cdot e^{-\alpha t} + B_0 \cdot e^{-\beta t} \quad (\alpha > \beta) \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde α y β son unas constantes híbridas, cuyo valor aparece en el ajustado de la ecuación matemática a las concentraciones experimentales. A_0 y B_0 son los correspondientes coeficientes de la ecuación exponencial.

La *Ecuación 2.2* se ajustó a los valores experimentales de concentración plasmática-tiempo obtenidos para cada animal. El valor de los parámetros de la ecuación (A_0 , B_0 , α y β), se obtuvo por regresión no lineal por mínimos cuadrados, utilizando como factor

de ponderación el inverso de la concentración plasmática experimental al cuadrado (WAGNER, 1993).

La concentración plasmática inicial (C_0), y el valor de las microconstantes o constantes verdaderas se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

$$C_0 = A_0 + B_0 \quad \text{Ecuación 2.3}$$

$$k_{12} = \mathbf{a} + \mathbf{b} - k_{21} - k_{10} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

$$k_{21} = \frac{(A_0 \cdot \mathbf{b} + B_0 \cdot \mathbf{a})}{A_0 + B_0} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

$$k_{10} = \frac{\mathbf{a} \cdot \mathbf{b}}{k_{21}} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

También se calculó la semivida biológica en la última fase exponencial de las curvas, fase \mathbf{b} , del siguiente modo:

$$t_{1/2} = \frac{\text{Ln } 2}{\mathbf{b}} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

El volumen de distribución en el estado estacionario ($Vd_{(ss)}$), se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$Vd_{(ss)} = V_c \cdot \left(1 + \frac{k_{12}}{k_{21}} \right) \quad \text{Ecuación 2.8}$$

El aclaramiento plasmático total, Cl_t , se calculó mediante la Ecuación 2.9.

$$Cl_t = \frac{\text{Dosis}}{AUC_0^\infty} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

siendo AUC_0^∞ el área bajo la curva de niveles plasmáticos de fármaco, calculada desde tiempo 0 hasta tiempo infinito. Para el cálculo del valor de AUC_0^∞ , se empleó el método de los trapecios para determinar el valor de AUC_0^{80} combinado con el valor de AUC_{80}^∞ . El valor de AUC_{80}^∞ se estimó a través del cociente C_{80}/b , donde C_{80} corresponde al valor teórico de concentración de fármaco a tiempo 80 min (WAGNER, 1993).

El principal parámetro derivado del tratamiento no compartimental de las curvas de nivel plasmático es, tal vez, el tiempo medio de residencia, MRT , que se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC_0^\infty} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

en la que AUC_0^∞ es el área bajo la curva definida por los valores de concentración (C) frente al tiempo (T), desde tiempo cero hasta infinito. $AUMC$ es el área bajo la curva definida por los valores del producto concentración por tiempo (C·T) frente al tiempo (T).

2.3.3 ESTIMACIÓN DE LOS ACLARAMIENTOS TOTAL Y RENAL DEL ACAMPROSATO EN ESTADO ESTACIONARIO

2.3.3.1 Soluciones de trabajo

A) Disoluciones de acamprosato

Para el estudio del aclaramiento total y renal del acamprosato en condiciones de estado estacionario se utilizaron tres disoluciones, de concentración 0.16 mg/ml, 7.95 mg/ml y 159 mg/ml. Todas las disoluciones se prepararon con solución salina isotónica.

B) Solución de inulina

Antes de comenzar cada experimento, se preparó una solución de inulina 16.6 mg/ml, en un matraz aforado de 5 ml, con agua bidestilada.

C) Soluciones de perfusión

Cada solución de perfusión se preparó el mismo día de su administración de acuerdo con la siguiente composición:

Solución de acamprosato 0.16, 7.95 ó 159 mg/ml	1 ml
Solución de inulina 16.6 mg/ml	3 ml
<i>Disolución I</i> de ¹⁴ C-acamprosato (100 µCi/ml)	75 µl
Solución salina isotónica	c.s.p 5 ml

Estas soluciones fueron administradas mediante perfusión endovenosa a una velocidad constante de 1 ml/h. Por tanto, el fármaco en estudio se perfundió a tres velocidades diferentes: 2.65, 132.5 y 2650 µg/min.

D) Reactivo de antrona

El reactivo de antrona se preparó y se renovó según se describe en el *Epígrafe* 2.3.1.1.

2.3.3.2 Métodos quirúrgicos

Para la estimación del aclaramiento total y renal del acamprosato en estado estacionario, se sometió al animal a una intervención quirúrgica en la que se le canularon la vejiga urinaria y ambas venas yugulares. Los procedimientos quirúrgicos se encuentran perfectamente detallados en los *Epígrafes* 2.3.1.2.1 y 2.3.1.2.2 respectivamente.

2.3.3.3 Protocolo experimental

Los animales pertenecientes a este conjunto de experimentos se distribuyeron en 3 grupos, de 6 animales cada uno, en función de la velocidad de perfusión de acamprosato ensayada.

Los animales fueron asignados de un modo totalmente aleatorio a alguno de los siguientes grupos experimentales:

- * **Grupo C-1:** acamprosato 2.65 µg/min + ¹⁴C-acamprosato 1.5 µCi/h + inulina
10 mg/h
- * **Grupo C-2:** acamprosato 132.5 µg/min + ¹⁴C-acamprosato 1.5 µCi/h + inulina
10 mg/h
- * **Grupo C-3:** acamprosato 530.0 µg/min + ¹⁴C-acamprosato 1.5 µCi/h + inulina
10 mg/h

En todos estos ensayos, los animales se canularon el día anterior al de la administración, permaneciendo en ayunas con agua "ad libitum" durante, aproximadamente, 18-24 horas.

En el momento de la administración, la rata se encontraba completamente despierta, con libertad de movimientos dentro de la jaula. En todas las experiencias la administración de las soluciones de ensayo se efectuó siempre a través de la cánula implantada en la vena yugular izquierda, mediante perfusión endovenosa a velocidad constante. Se utilizó para ello una bomba de perfusión "Harvard" modelo 2400-001 programada para conseguir un flujo de perfusión de 1 ml/h, que se mantuvo durante las 3 horas que duró el ensayo. Antes de comenzar con la perfusión endovenosa se administró una dosis intravenosa rápida de 0.3 μ Ci de 14 C-acamprosato con la finalidad de reducir el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario.

El cronómetro se puso en marcha inmediatamente después de comenzar la perfusión endovenosa.

La recogida de muestras se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo de trabajo:

a) Muestras plasmáticas

La toma de muestras sanguíneas (0.35 ml) se realizó a través de la cánula implantada en la vena yugular derecha del animal a los siguientes tiempos: 0, 130, 150 y 170 minutos.

El procedimiento empleado en la recogida de muestras sanguíneas coincide con el descrito en el *Epígrafe 2.3.2.3*. Finalmente, las muestras de sangre tomadas se centrifugaron a 8000 r.p.m. durante 8 minutos, y con una nueva jeringuilla se recuperó el plasma sobrenadante.

b) Muestras de orina

La recogida de la orina se realizó durante los siguientes intervalos de tiempo: 120-140, 140-160 y 160-180 min. Estas muestras de orina se recogieron mediante el lavado de la vejiga urinaria del animal con suero fisiológico estéril (5 ml). Posteriormente, la jaula se lavó con el volumen suficiente de agua bidestilada con el fin de arrastrar posibles restos de orina hasta el recipiente de recogida.

2.3.3.4 Tratamiento analítico y valoración de las muestras

La determinación del aclaramiento total (Cl_t) y aclaramiento renal (Cl_r) del acamprosato en condiciones de estado estacionario, obligó a realizar cuatro determinaciones analíticas:

- Determinación de ^{14}C -acamprosato en plasma.
- Determinación de ^{14}C -acamprosato en orina.
- Determinación de inulina en plasma.
- Determinación de inulina en orina.

Adicionalmente, y con la finalidad de confirmar que las cuentas por minuto (Cpm) determinadas en las muestras de orina correspondían a la molécula intacta de ^{14}C -acamprosato se realizó un análisis adicional. En concreto, todas las muestras urinarias se inyectaron en el sistema cromatográfico descrito en el Epígrafe 2.3.1.4, y con ayuda de un colector de muestras modelo "Gilson FC-2038" se recogió la fracción correspondiente al pico cromatográfico del acamprosato. Finalmente, se determinó el contenido radiactivo en las fracciones así recogidas, con el fin de confirmar si el acamprosato se había eliminado de forma inalterada a través de la orina.

2.3.3.4.1 Valoración de ^{14}C -acamprosato

Para la cuantificación de los niveles de ^{14}C -acamprosato, tanto en las muestras plasmáticas como en las urinarias, se utilizó la medida de la radiactividad mediante un contador de centelleo en fase líquida.

El procedimiento que se ha seguido para la manipulación y preparación de las muestras es el siguiente: una vez extraído el plasma y depositado en un tubo tipo "Eppendorf", se tomaron 150 μl del mismo y se adicionaron a 3 ml de líquido de centelleo en los viales adecuados. Todos los viales se sometieron a una ligera agitación manual, concluida la cual se colocaron en unas gradillas especiales que adaptan perfectamente en el contador de centelleo.

En cuanto a las muestras de orina, se adicionaron 150 μl de la orina diluida, a 3 ml de líquido de centelleo. Los viales así preparados, se sometieron a una ligera agitación manual antes de su lectura.

Todos los detalles correspondientes al equipo de valoración, líquido de centelleo, soluciones patrón empleadas y validación de la técnica analítica se han descrito anteriormente en el *Epígrafe 2.3.2.4*.

2.3.3.4.2 Valoración de inulina

Para la determinación de la inulina presente en las muestras plasmáticas y urinarias, se empleó el mismo procedimiento espectrofotométrico descrito en el *Epígrafe 2.3.1.4* de la presente Memoria. Adicionalmente, todos los detalles correspondientes al equipo de valoración empleado, tratamiento de las muestras, exactitud y precisión de la técnica analítica, y la solución patrón empleada coinciden con los descritos en el *Epígrafe* citado anteriormente.

2.3.3.5 Cálculo de los aclaramientos renal, total y velocidad de filtración glomerular (GFR)

Los valores de aclaramiento total se calcularon mediante la siguiente expresión:

$$Cl_t = \frac{K_0}{C_{ss}} \quad \text{Ecuación 2.11}$$

en la que K_0 representa la velocidad de perfusión de la sustancia ensayada, expresada en $\mu\text{g}/\text{min}$, y C_{ss} su concentración plasmática, expresada en $\mu\text{g}/\text{ml}$, en condiciones de estado estacionario.

Los valores de aclaramiento renal se calcularon a partir de la ecuación siguiente:

$$Cl_r = \frac{Q_{ur}}{C_{ss}} \quad \text{Ecuación 2.12}$$

en la que Q_{ur} es la velocidad de excreción urinaria corregida (en función de la cantidad de inulina recogida en la orina en ese mismo intervalo), expresada en $\mu\text{g}/\text{min}$, y C_{ss} la concentración plasmática en estado estacionario, expresada en $\mu\text{g}/\text{ml}$.

La corrección permite evitar los errores debidos a las deficiencias en la recogida de la orina de las ratas durante los ensayos (posibles fugas en la cánula o deficiente lavado de las paredes de la jaulas metabólicas).

La inulina se elimina exclusivamente por vía renal mediante filtración glomerular. Por tanto, el aclaramiento total de inulina es indicativo del valor de la velocidad de filtración glomerular (*GFR*) en los animales tratados. La ecuación empleada para el cálculo de la *GFR* fue:

$$GFR = \frac{K_0(\text{inulina})}{C_{ss}(\text{inulina})} \qquad \text{Ecuación 2.13}$$

en la cual, $K_0(\text{inulina})$ representa la velocidad de perfusión de la inulina, expresada en $\mu\text{g}/\text{min}$, y $C_{ss}(\text{inulina})$ su concentración plasmática, expresada en $\mu\text{g}/\text{ml}$, en condiciones de estado estacionario.

2.3.4 EFECTOS DEL PROBENECID SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DEL ACAMPROSATO

2.3.4.1 Soluciones de trabajo

A) Disolución de acamprosato

La interacción entre el acamprosato y el probenecid se estudió con una única dosis de acamprosato: **2.8 mg**. Para ello se preparó una disolución de concentración 5.6 mg/ml en solución salina isotónica, de la cual se administró a cada animal un volumen de 0.5 ml.

B) Disolución de ¹⁴C-acamprosato

Se prepararon dos disoluciones previas ("disolución madre" y "disolución I") a la "dosis", del mismo modo al descrito en el *Epígrafe* 2.3.2.1.

La dosis se preparó diluyendo 75 µl de la "disolución I" en 300 µl de agua bidestilada. Finalmente se administró a cada animal un volumen de 0.25 ml de esta solución (20 µCi/ml), que contenía un total de **5 µCi**.

C) Disoluciones de probenecid

La interacción entre acamprosato y probenecid se estudió con dos dosis diferentes de probenecid: **10 y 20 mg**.

El probenecid se preparó en disolución acuosa a las concentraciones de 10 y 20 mg/ml. En su preparación se usó una disolución de NaOH 1M con el fin de facilitar el proceso de disolución.

D) Suero fisiológico heparinizado

El suero fisiológico heparinizado (20 UI/ml) se utilizó con dos finalidades: para arrastrar las disoluciones inyectadas a través de la cánula y asegurar así la correcta administración de los preparados, y para eliminar la sangre que quedaba ocupando la cánula una vez tomada la muestra sanguínea.

2.3.4.2 Técnica quirúrgica

Para la realización de este conjunto de experimentos se canuló la vena yugular derecha de la rata según se describe en el *Epígrafe 2.3.1.2.2*.

2.3.4.3 Protocolo experimental

Los animales pertenecientes a este grupo de experimentos se distribuyeron en 2 grupos, de 6 animales cada uno, en función de la dosis administrada de probenecid.

El ensayo se diseñó de manera que los animales fueron asignados de un modo totalmente aleatorio a alguno de los siguientes grupos experimentales:

- * **Grupo D-1:** 10 mg de probenecid + 5 μ Ci de 14 C-acamprosato + 2.8 mg de acamprosato.
- * **Grupo D-2:** 20 mg de probenecid + 5 μ Ci de 14 C-acamprosato + 2.8 mg de acamprosato.

La administración siempre se realizó durante las 12-18 horas siguientes a la canulación.

En el momento de la administración el animal se encontraba completamente despierto, con libertad de movimientos dentro de la jaula y con acceso libre al agua de bebida.

En todos los ensayos se administró mediante inyección intravenosa rápida **10 ó 20** mg de probenecid, 10 minutos antes de la administración del acamprosato. Posteriormente se procedió a la inyección del fármaco siguiendo el siguiente protocolo:

- 1º) 0.25 ml de solución de ¹⁴C-acamprosato 20 µCi/ml.
- 2º) 0.5 ml de solución de acamprosato (5.6, mg/ml).
- 3º) 0.5 ml de suero fisiológico heparinizado atemperado a 37⁰C.

Se tomaron muestras de sangre y de orina siguiendo el mismo protocolo de recogida descrito para los experimentos de obtención de la Curvas de nivel plasmático tras la administración intravenosa rápida de tres dosis de acamprosato (ver *Epígrafe 2.3.2.3*)

2.3.4.4 Tratamiento analítico y valoración de las muestras

Para la cuantificación de los niveles de acamprosato, plasmáticos y en la orina, se empleó la medida de la radiactividad mediante un contador de centelleo en fase líquida. Los detalles correspondientes a la valoración analítica tales como el equipo empleado, las rectas de calibración usadas, la preparación de las muestras y/o la precisión y exactitud de la técnica analítica coinciden con los descritos en el apartado 2.3.2.4 de la presente Memoria.

2.4 ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DEL ACAMPROSATO

2.4.1 ADMINISTRACIÓN POR VÍA ORAL DE ACAMPROSATO. CÁLCULO DE BIODISPONIBILIDAD EN MAGNITUD

2.4.1.1 *Soluciones de trabajo*

A) *Soluciones de acamprosato*

Para el estudio de la farmacocinética del acamprosato se utilizaron dos soluciones, de concentración 5.6 mg/ml y 44 mg/ml. Ambas soluciones se prepararon con agua bidestilada.

El volumen que se adicionó para la preparación de las soluciones de administración oral a cada animal siempre fue de 0.5 ml, por tanto las dosis ensayadas fueron **2.8 y 22 mg** de acamprosato.

B) *Disolución de ¹⁴C-acamprosato*

Para la elaboración de las soluciones de administración oral, se empleó la denominada, en *Epígrafes* anteriores, "**Disolución I**" que contiene 100 µCi/ml de ¹⁴C-acamprosato

C) *Solución de administración oral*

El volumen de las soluciones de administración oral siempre fue de 2 ml. Para su elaboración se siguió el protocolo descrito a continuación:

Dosis 2.8 mg acamprosato	Dosis 22 mg acamprosato
Solución 5.6 mg/ml acamprosato.....500 µl	Solución 44 mg/ml acamprosato.....500 µl
Disolución I (100 µCi/ml ¹⁴ C-acamprosato).....50 µl	Disolución I (100 µCi/ml ¹⁴ C-acamprosato).....50 µl
Agua bidestilada.....1450 µl	Agua bidestilada.....1450 µl

Cuadro 2.3 Esquema de preparación de las distintas soluciones orales de acamprosato (2.8 y 22 mg) ensayadas.

D) Suero fisiológico heparinizado

El suero fisiológico heparinizado (20 UI/ml) se empleó con la finalidad de eliminar la sangre que quedaba ocupando la cánula una vez tomada la muestra sanguínea.

2.4.1.2 Técnica quirúrgica

La técnica quirúrgica empleada para el estudio de la farmacocinética del acamprosato en la rata tras su administración por vía oral ha sido la canulación permanente de la vena yugular de la rata (ver *Epígrafe 2.3.1.1.2*).

2.4.1.3 Protocolo experimental

Los animales pertenecientes a este bloque de experimentos se distribuyeron, de un modo totalmente aleatorio en 2 grupos de 6 animales cada uno en función de la dosis administrada de acamprosato

La denominación de los grupos ensayados fue:

- * **Grupo E-1:** Dosis 2.8 mg de acamprosato + 5 μCi ^{14}C -acamprosato
- * **Grupo E-2:** Dosis 22 mg de acamprosato + 5 μCi ^{14}C -acamprosato

En el momento de la administración (18-24 horas post-canulación), la rata se encontraba completamente despierta, con libertad de movimientos dentro de la jaula, y con acceso libre al agua de bebida.

La administración se realizó por vía oral mediante una sonda gástrica adaptada a una jeringuilla de vidrio. Para facilitar la introducción de la sonda a través de la boca de la rata, se le induce una anestesia ligera, introduciéndola en el interior de una pequeña campana de gases donde se ha vertido un pequeño volumen de éter dietílico. En concreto, el animal se mantiene en la campana de gases hasta que pierde el reflejo postural. Se debe evitar que la rata alcance un estado de anestesia profunda, ya que ello puede influir en los resultados del ensayo (TORRES-MOLINA y cols., 1996). A continuación se retira el animal de la campana, se coloca en posición de decúbito supino y se le administra la solución oral a ensayar (en nuestro caso siempre fueron 2 ml), preparada como se ha indicado en el apartado 2.4.1.1.

Cuando la sonda penetra por el esófago, no ofrece ninguna resistencia mientras que, si se desvía por la tráquea la introducción completa de la sonda se ve impedida. Es importante asegurarse de que la sonda ha sido introducida correctamente por el esófago antes de vaciar el contenido de la jeringuilla; de otro modo, se corre el riesgo de provocar la muerte del animal por asfixia. A continuación se incorpora al animal, y se le administra la dosis cuidando de que no exista ninguna pérdida de la misma por regurgitación. Acto seguido, se pone en marcha el cronómetro.

La toma de muestras se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

a) Muestras plasmáticas

Las muestras de sangre se obtuvieron en todos los grupos experimentales a los siguientes tiempos tras la administración del acamprosato: 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 y 100 minutos.

El procedimiento empleado para la toma de las muestras sanguíneas, así como su procesamiento posterior para obtener el plasma coincide con el descrito en el *Epígrafe 2.3.2.3.*

b) Muestras de orina

Todos los experimentos se realizaron en jaulas metabólicas, lo cual permitió recoger la orina de los animales tratados, correspondiente al período 0-24 y 24-48 horas postadministración. La jaula se lavó con el volumen adecuado de agua bidestilada con el fin de arrastrar posibles restos de orina hasta el recipiente de recogida.

c) Muestras de heces

Adicionalmente, el empleo de jaulas metabólicas permitió recoger las heces de los animales tratados, correspondiente al período 0-24 y 24-48 horas post-administración. Posteriormente se utilizó el volumen adecuado de agua bidestilada para extraer y analizar el contenido de ^{14}C -acamprosato en las heces recogidas.

2.4.1.4 Tratamiento analítico y valoración de muestras

Para la cuantificación de los niveles plasmáticos de ^{14}C -acamprosato, se utilizó la medida de la radiactividad mediante un contador de centelleo en fase líquida. Paralelamente, también se determinó el contenido de ^{14}C -acamprosato en las muestras de orina y heces, recogidas durante los periodos 0-24 y 24-48 horas postadministración, empleando la misma técnica analítica.

A) Muestras de plasma:

En general, el procedimiento seguido para la preparación de las muestras de plasma coincide con el descrito en el *Epígrafe 2.3.2.4*, con la única particularidad de que todos los viales contuvieron 150 μl de plasma. Se cuantificó un mayor volumen de muestra, en comparación con las experiencias tras administración intravenosa, debido a la limitada biodisponibilidad oral en magnitud que presenta el acamprosato (*FOURTILLAN, 1990; *SCOTT, 1991). Adicionalmente se incrementó el tiempo de contaje (10 min) de cada vial, con la finalidad de minimizar el coeficiente de variación registrado para los tres ciclos del contaje (siempre <5%). Todos los viales contuvieron 150 μl de plasma y 3 ml de líquido de centelleo.

Los viales así preparados, se sometieron a una ligera agitación manual, concluida la cual se procedió a la lectura.

B) Muestras de orina:

Se adicionaron 100 μl de la orina diluida, a 3 ml de líquido de centelleo. Los viales así preparados, se sometieron a una ligera agitación manual antes de su lectura.

C) *Muestras de heces:*

Las heces recogidas correspondientes al período 0-24 horas se sometieron a varios procesos de extracción sucesivos, para cuantificar la fracción de ^{14}C -acamprosato no absorbido. Para ello, una vez dispersadas en un volumen adecuado de agua bidestilada, se sometieron a una centrifugación de 3500 r.p.m. durante 10 minutos. A continuación se decantó el líquido sobrenadante, y se redispersaron con agua bidestilada fresca. El proceso se repitió en 6 ocasiones. Finalmente, se prepararon los viales para su cuantificación con 200 μl del agua procedente de cada uno de los lavados realizados y 3 ml de líquido de centelleo.

Las heces recogidas correspondientes al período 24-48 horas se procesaron del mismo modo pero el proceso de lavado se repitió en 3 ocasiones.

El equipo analítico, el líquido de centelleo así como las disoluciones patrón empleadas coinciden con el descrito en el *Epígrafe 2.3.2.4.*

2.4.1.5 Cálculos farmacocinéticos

2.4.1.5.1 Cálculo de los parámetros farmacocinéticos tras administración oral

Una vez valoradas todas las muestras plasmáticas y urinarias de los dos grupos experimentales de ensayo, se procedió a su tratamiento farmacocinético. El modelo cinético que mejor ajustó a los datos experimentales obtenidos fue el monocompartimental tras administración extravasal e incorporación de orden uno.

El esquema representativo de este modelo se muestra en la *Figura 2.3*.

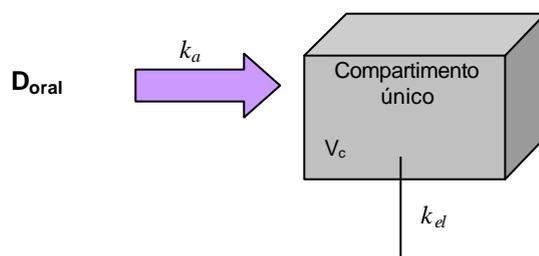


Figura 2.3 Modelo monocompartimental con incorporación de orden uno

La ecuación simplificada representativa de la evolución de las concentraciones plasmáticas en función del tiempo, es la siguiente (WAGNER, 1993; GIBALDI y PERRIER, 1982):

$$C = P_1 \cdot e^{-I_1 \cdot t} + P_2 \cdot e^{-I_2 \cdot t} \quad \text{Ecuación 2.14}$$

Los cuatro parámetros que definen esta ecuación se obtuvieron mediante regresión no lineal de las concentraciones plasmáticas obtenidas experimentalmente frente a sus correspondientes tiempos de muestreo. Se trata de un proceso biexponencial formado por la diferencia entre la exponencial correspondiente al proceso de eliminación y la representativa de la absorción o viceversa, por tanto, a tenor de como se ha expresado la *Ecuación 2.14* una de estas dos exponenciales adquirirá signo negativo al realizar los ajustados.

Por último, el área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC_0^∞) se obtuvo de igual modo al utilizado que en el caso de las curvas intravenosas (método de los trapecios).

2.4.1.5.2 Determinación de la biodisponibilidad en magnitud

Uno de los métodos que se emplea para el cálculo de la biodisponibilidad en magnitud tras la administración extravasal de una dosis única de fármaco, es la cuantificación de la fracción de dosis inalterada excretada en la orina de los animales tratados (WAGNER, 1993). Este método es válido siempre que se demuestre que la única vía implicada en la eliminación del fármaco es la renal.

2.4.2 ESTUDIO TOPOGRÁFICO DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE ACAMPROSATO. PERFUSIÓN *IN SITU*

2.4.2.1 Soluciones de trabajo

A) Solución anestésica

Para alcanzar el grado de anestesia general, necesario para llevar a cabo la intervención quirúrgica que se requiere para realizar los ensayos de perfusión *in situ* se utilizó una solución al 6% (p/v) de hidrato de cloral en agua bidestilada. Esta solución se conserva en nevera a una temperatura entre 2 y 8°C, en cuyo caso tiene un periodo aproximado de validez de 4 semanas. Se administra vía intraperitoneal a una dosis de 0.65 ml por cada 100 g de peso corporal del animal. La solución debe atemperarse a 37°C antes de su inyección.

B) Líquido de lavado

Es una solución isotónica de iones fisiológicos que sirve para arrastrar los residuos que puedan quedar en el intestino después del periodo de ayuno y acondicionar la mucosa intestinal antes de los ensayos de absorción. Además, también es la solución base para la preparación de las soluciones de perfusión para los ensayos *in situ*.

Se trata de una solución de suero fisiológico regulado a pH 7.6 mediante una solución de tampón fosfatos según Sørensen, a razón de 10 ml de tampón por litro de solución. La composición cuantitativa de la solución es:

✓ NaCl		9.00 g
✓ NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 1/15M		1.30 ml
✓ Na ₂ HPO ₄ 1/15M		8.70 ml
✓ H ₂ O bidestilada	c.s.p.	1000 ml

El pH final de la solución fue comprobado antes de su perfusión y, cuando fue necesario, se ajustó con NaOH 1N o con HCl 1N hasta conseguir un pH de 7.60 ± 0.02 .

C) Solución de perfusión

Con el fin de determinar si existe en el intestino delgado de la rata una zona de absorción preferente para la absorción del acamprosato, se perfundió una solución del fármaco en tres zonas o tramos diferenciados (tramo proximal, medio y distal) del mismo. La dosis de acamprosato ensayada en estos experimentos fue de 2.8 mg. Independientemente del tramo estudiado, el volumen perfundido siempre fue de 5 ml por lo tanto, la concentración de fármaco ensayada siempre fue 1.38 mM. Esta *solución de perfusión* se preparó utilizando como vehículo el *líquido de lavado* descrito en el *Epígrafe 2.4.2.1*. Adicionalmente, esta solución se marcó radiactivamente con ¹⁴C-acamprosato a razón de 1 µCi/ml.

2.4.2.2 Técnica quirúrgica

La técnica de perfusión *in situ* empleada en estos ensayos ha sido la propuesta por Doluisio y colaboradores en 1969, adaptada a nuestras condiciones de trabajo según se describe a continuación.

En primer lugar, el animal se somete a un periodo de ayuno de unas 18-24 horas, durante el cual tiene libre acceso al agua de bebida para evitar su deshidratación. Durante este tiempo el animal se encuentra en una jaula de doble fondo para evitar la coprofagia. Este periodo de ayuno es conveniente con el fin de evitar la presencia de quimo abundante en el intestino, lo cual facilita el acondicionamiento del intestino para el ensayo de absorción.

Transcurrido este tiempo, el animal se anestesia por inyección intraperitoneal del volumen requerido de la solución de hidrato de cloral (3.9 mg/100 g peso) preparada tal y como se describe en el *Epígrafe 2.4.2.1*.

Transcurridos aproximadamente 4-5 minutos de la inyección de la solución anestésica, la rata alcanza la anestesia profunda, que se manifiesta por la pérdida del reflejo palpebral. A partir de este momento, el animal ya puede ser intervenido.

Para realizar la intervención, el animal se coloca en posición de decúbito supino sobre un tablero quirúrgico, y se sujeta con cinta adhesiva por las extremidades. Seguidamente, se procede a la abertura de la cavidad abdominal, practicando un corte longitudinal en la piel, desde dos centímetros por encima del poro genital hasta un centímetro del apéndice xifoides. Para ello se sujeta la piel con unas pinzas en forma de diente de ratón y la incisión se realiza con unas tijeras de punta roma, con el fin de evitar cualquier daño en la musculatura subyacente. Después se separan los rectos abdominales cortando por la línea alba para disminuir la magnitud de la hemorragia.

Una vez abierta la cavidad abdominal, se localiza el duodeno, en el que desemboca el conducto biliar, que transporta la bilis desde el hígado (siempre que se trabaje en el tramo inicial del intestino delgado, este conducto debe ligarse con un hilo de seda para evitar el paso de la secreción biliar al lumen intestinal, y la posible aparición de un ciclo enterohepático).

El intestino delgado de la rata Wistar tiene una longitud aproximada de 1 m, por lo tanto para abordar el estudio topográfico de la absorción intestinal del acamprosato, se ha dividido en tres tramos de 33 cm de longitud. En función de su mayor proximidad al estómago se han denominado: tramo proximal, medio y distal. Una vez localizado el intestino delgado del animal se cánula, de forma totalmente aleatoria, uno de los tramos

en estudio.

Se procede en primer lugar a la canulación del extremo inicial. Para ello se practica un pequeño corte en bisel en el intestino procurando dañar lo menos posible los vasos sanguíneos que irrigan la zona. Mediante unas pinzas de punta fina que se introducen en el pequeño corte, se aumenta la abertura, y de esta manera se facilita la introducción del extremo de una cánula de vidrio acodada. La cánula posee en ese extremo una pequeña escotadura, que permite fijarla al intestino mediante un hilo de seda. En el otro lado de la cánula se conecta, mediante un tubo de polietileno, una llave de tres pasos tipo "Stopcock". La llave se encaja a rosca con una jeringa "Multifit" de 5 ml de capacidad y se sujeta mediante una pinza a un soporte vertical. La posición final de la cánula debe respetar la disposición anatómica del intestino. Posteriormente, se localiza el extremo final del tramo intestinal seleccionado y se practica un corte en bisel, al igual que en el extremo inicial.

Para que el ensayo de absorción sea reproducible, la mucosa intestinal debe quedar totalmente libre de quimo y de otras sustancias que pudieran interferir en el proceso de absorción, como las sales biliares, que actúan como tensioactivos. Con esta finalidad, se procede a lavar el intestino con ayuda de la jeringa conectada a la cánula localizada en el extremo inicial, haciendo pasar la solución de lavado descrita en el *Epígrafe 2.4.2.1*, previamente atemperada a 37°C. Adicionalmente esta solución acondiciona la mucosa intestinal y restaura el pH de la zona. La solución de lavado intestinal se recoge, a su salida por la incisión realizada en el extremo final, en una placa *Petri*.

Mediante el bombeo de aire desde la jeringa inicial se eliminan los restos de la solución de lavado. Seguidamente se conecta una segunda cánula en el extremo final y se adapta una llave de tres pasos con su jeringa, de igual forma que en el caso anterior, sujetando también el conjunto mediante una pinza a un soporte vertical. El montaje experimental se representa en la *Figura 2.4*.

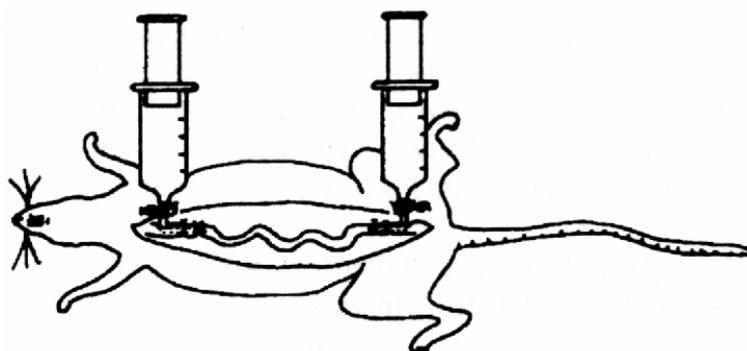


Figura 2.4 Esquema del montaje experimental.

Para prevenir la desecación de la cavidad abdominal se introduce en ella un pequeño volumen de suero fisiológico atemperado a 37°C y se cubre con una torunda de algodón empapada del mismo líquido y a igual temperatura. Este proceso se repite durante el ensayo para mantener un adecuado grado de hidratación y la temperatura fisiológica.

Después de haber realizado los pasos anteriores, la preparación *in situ* queda dispuesta para el ensayo de absorción.

2.4.2.3 Protocolo experimental

Para el desarrollo de estos experimentos se emplearon un total de 36 animales, los cuales se distribuyeron en 3 grupos, en función del tramo intestinal donde se perfundió el fármaco.

El ensayo se diseñó de manera que los animales fueron asignados de un modo totalmente aleatorio a alguno de los siguientes grupos experimentales:

- * **Grupo F-1**: Tramo proximal del intestino delgado (33 cm) (n=12)
- * **Grupo F-2**: Tramo medio del intestino delgado (33 cm) (n=12)
- * **Grupo F-3**: Tramo distal del intestino delgado (33 cm) (n=12)

La solución a ensayar se perfunde de la siguiente manera: en la jeringa conectada en el extremo inicial se introduce la solución de perfusión, previamente atemperada a 37°C, manteniendo la llave de tres pasos en posición intestino-exterior. El volumen perfundido siempre será 5 ml.

A continuación, la llave conectada en el extremo final se coloca en posición intestino-exterior y la llave inicial, en posición jeringa-intestino. Se presiona ligeramente el émbolo de la jeringa inicial, la introduciendo en el intestino la solución a perfundir. De este modo, el aire contenido en el intestino es desplazado hacia el exterior y reemplazado por la solución sin provocar una distensión excesiva de la pared intestinal. Cuando se ha introducido toda la solución, las dos llaves se colocan en posición jeringa-exterior y se pone en marcha el cronómetro. Así, el intestino se ha convertido en un compartimento estanco, ocupado por la solución perfundida.

La toma de muestras se efectuó cada 5 minutos, alternativamente por cada una de las jeringas, empezando por la jeringa conectada en el tramo final. Se recogieron un total de seis muestras según el siguiente esquema de muestreo: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos.

Para extraer la muestra se toma aire con la jeringa opuesta a la de muestreo. Las dos llaves se colocan en posición jeringa-intestino, y a medida que se introduce aire por un extremo, la solución asciende por la jeringa de muestreo prácticamente en su totalidad. Es conveniente presionar la torunda de algodón, colocada sobre el abdomen, para facilitar la salida del líquido remanente en el intestino, y para evitar que la solución descienda al intestino durante la toma de muestra.

El volumen de muestra extraído siempre fue de 250 µl, el cual se depositó en tubos tipo "Eppendorf" para su posterior valoración. El tiempo empleado en la toma de muestra nunca superó los 30 segundos.

A continuación, la llave contraria a la jeringa de toma de muestra se coloca en posición intestino-exterior para facilitar la salida del aire desplazado al introducir de nuevo la solución ensayada; a la vez, en esta llave, se coloca un tubo de centrifuga para recoger el volumen de solución que pudiera perderse durante este proceso. Finalmente, se colocan las llaves en posición jeringa- exterior, convirtiendo de nuevo el intestino en un compartimento estanco.

Después de tomar la última muestra, se extrae todo el líquido remanente del intestino.

Tras obtener todo el líquido remanente, se mide el volumen y el pH final de la solución. La medida del pH sirve como control del procedimiento, ya que variaciones importantes de los valores fisiológicos son indicativas de procesos anormales (podrían modificar el grado de ionización de las sustancias y, con ella, su absorción). La medida del volumen permite calcular, como se muestra más tarde, la reabsorción de líquido de perfusión.

Finalizado el ensayo, el animal se sacrificó mediante una dislocación cervical.

2.4.2.4 Tratamiento analítico y valoración de las muestras

Para la cuantificación de la concentración de ^{14}C -acamprosato remanente en el lumen intestinal, se utilizó la medida de la radiactividad en las muestras mediante un contador de centelleo en fase líquida. Tal y como se ha descrito en *Epígrafes* anteriores, se trata de una técnica muy sensible y es una de las más adecuadas para la detección y cuantificación de la radiactividad de tipo β , que es la que emite el isótopo radiactivo de ^{14}C .

El equipo de valoración y el líquido de centelleo empleados coinciden con los descritos en *el Epígrafe 2.3.2.4*. Sin embargo, existen aspectos diferenciales en cuanto al cálculo de las concentraciones de acamprosato, las rectas de calibración empleadas para evaluar la precisión y exactitud del método analítico y la preparación de las muestras para su valoración.

2.4.2.4.1 Cálculo de las concentraciones remanentes de acamprosato

En todos los ensayos de determinación de la constante de velocidad de absorción del acamprosato (k_a) tras su perfusión, *in situ*, en el intestino delgado de la rata, se asumió que la proporción entre acamprosato y ^{14}C -acamprosato no variaba a lo largo de los ensayos.

De este modo las Cpm registradas se transformaron en unidades de concentración mediante el uso de la proporcionalidad existente entre el acamprosato estable y las Cpm de ^{14}C -acamprosato en la solución perfundida.

2.4.2.4.2 Evaluación de la técnica analítica: exactitud y precisión

Para el cálculo de la exactitud y precisión del método de valoración, se prepararon una serie de disoluciones patrón de ^{14}C -acamprosato en líquido de lavado (L.L.) según se describe a continuación.

Se prepararon 5 disoluciones acuosas de ^{14}C -acamprosato, cuyas actividades teóricas (A_T) fueron: 500, 300, 200, 100 y 50 nCi/ml. La preparación de los patrones de ^{14}C -acamprosato en líquido de lavado se realizó según se resume en el *Cuadro 2.4*. Las muestras patrón se procesaron igual que las muestras intestinales y posteriormente se midieron las Cpm en el contador de centelleo.

PATRÓN (nCi/ml)	Modo preparación	Volumen leído	A _T (nCi)
50	100 µl disolución acuosa 500 nCi/ml + 900 µl L.L.	200 µl	10
30	100 µl disolución acuosa 300 nCi/ml + 900 µl L.L.	200 µl	6
20	100 µl disolución acuosa 200 nCi/ml + 900 µl L.L.	200 µl	4
10	100 µl disolución acuosa 100 nCi/ml + 900 µl L.L.	200 µl	2
5	100 µl disolución acuosa 50 nCi/ml + 900 µl L.L.	200 µl	1

Cuadro 2.4: Esquema de preparación de la recta de calibración empleada para la cuantificación de ¹⁴C-acamprosato en líquido de lavado (L.L).

Para la evaluación de la exactitud y precisión del método analítico utilizado, se prepararon 3 rectas de calibración con cinco patrones distintos de ¹⁴C-acamprosato en líquido de lavado. Cada patrón se valoró por triplicado como si se tratase de una muestra de actividad desconocida. Los valores de actividad calculados para cada patrón se obtuvieron interpolando en las rectas de calibración preparadas. Se promediaron los valores de actividad calculados para cada patrón y se determinó el coeficiente de variación. La desviación del valor medio respecto del teórico es indicativa de la exactitud, mientras que el coeficiente de variación lo es de la precisión.

2.4.2.4.3 Preparación de las muestras

Las muestras intestinales presentan generalmente tras su obtención, restos de mucosa intestinal. Por ese motivo, antes de su cuantificación se procedió a la centrifugación de las mismas a 3000 r.p.m. durante 5 minutos. De este modo, se obtuvo un sobrenadante limpio que se sometió a valoración. Las muestras a valorar se prepararon en viales de plástico adecuados y se situaron en unas gradillas especiales, que encajan perfectamente en la cámara receptora del contador, desde las cuales se

midió la actividad de cada muestra. Para ello, se depositaron 200µl de muestra en viales que contenían 3 ml de líquido de centelleo. Tras su homogeneización, se realizaron tres lecturas sucesivas de todas las muestras, de diez minutos de duración por cada una de las muestras analizadas, obteniéndose las cuentas por minuto (Cpm) promedio.

2.4.2.5 Determinación de la constante aparente de velocidad de absorción

2.4.2.5.1 Cálculo de la velocidad de reabsorción de agua

Como se ha indicado anteriormente, existe un proceso de reabsorción de agua simultáneo al proceso de absorción de la sustancia ensayada (DOLUISIO y cols., 1969; GABUS-SANNIÉ y BURI, 1987). Este proceso puede falsear por exceso el valor de las concentraciones remanentes, sobre todo en las últimas muestras (25 y 30 min.), por lo que se deben corregir las concentraciones obtenidas experimentalmente en los ensayos de absorción.

Se ha demostrado que los volúmenes remanentes a los distintos tiempos se ajustan a una cinética de orden cero (MARTÍN-VILLODRE y cols., 1986; GABUS-SANNIÉ y BURI, 1987), cuya ecuación representativa en forma diferencial es la siguiente:

$$\frac{dV}{dt} = -k_0 \quad \text{Ecuación 2.15}$$

La forma integrada de la ecuación anterior es:

$$V_t = V_0 - k_0 \cdot t \quad \text{Ecuación 2.16}$$

en la que V_t es el volumen remanente en el lumen intestinal a cada tiempo t , V_0 representa el volumen remanente a tiempo cero y k_0 representa la constante de velocidad de reabsorción.

104 Materiales y métodos

Para el cálculo de k_0 se necesitan los volúmenes obtenidos a tiempo cero y 30 min. En los estudios realizados en los distintos tramos del intestino delgado, el volumen remanente a tiempo cero se ha calculado mediante ensayos de reabsorción de agua adicionales. En estos ensayos el animal se prepara exactamente igual que para los ensayos de absorción. Posteriormente se perfunden 5 ml de la solución de ensayo e inmediatamente después de perfundir la solución de trabajo se mide el volumen. El volumen remanente a los 30 min se ha caracterizado de forma individualizada, determinando el volumen de líquido remanente tras la realización del ensayo de absorción en cada animal. Para determinar este volumen es necesario considerar el volumen de las muestras extraídas.

La obtención del líquido remanente, al final del ensayo de absorción, se ha realizado de la siguiente manera:

En primer lugar, se desconecta la cánula de la jeringa conectada en el extremo final y se introduce en un tubo de centrifuga de unos 30 ml de capacidad. A continuación, con la jeringa inicial se bombea aire de modo que éste desplace el líquido remanente, que se recoge en el tubo de centrifuga por el otro extremo.

Seguidamente, se separa el asa intestinal con unas tijeras, cortando el mesenterio. Una vez aislado el intestino y con la ayuda de un algodón húmedo, se presiona de principio a fin, asegurando que el intestino quede completamente vacío.

El líquido recogido se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 5 minutos para separar las partículas sólidas (restos de quimo y mucosa). Finalmente, se mide el volumen del líquido sobrenadante.

Mediante regresión lineal de los volúmenes obtenidos a tiempo cero y 30 minutos se calculan los parámetros de la cinética (k_0 y V_0). Una vez conocidos dichos parámetros se pueden corregir los valores experimentales de las concentraciones de soluto en las muestras a los distintos tiempos, según la ecuación:

$$A = E \cdot \frac{V_t}{V_0} \qquad \text{Ecuación 2.17}$$

en la que A corresponde a la concentración de soluto corregida para cada tiempo, E es la concentración obtenida experimentalmente, V_t es el volumen remanente teórico para cada tiempo de muestreo y V_0 es el volumen remanente teórico a tiempo cero.

Los valores de las concentraciones corregidas a cada tiempo de muestreo son las que posteriormente se utilizan para el cálculo de las constantes de velocidad de absorción en cada ensayo.

2.4.2.5.2 Cálculo de la constante aparente de velocidad de absorción

Se utiliza un modelo cinético de dos compartimentos. El compartimento A corresponde al lugar donde se produce el proceso de absorción (intestino) y el compartimento C es el representativo del organismo. El fármaco sale del compartimento A, según un proceso de orden uno regido por la constante k_a (constante aparente de velocidad de absorción), objeto de nuestro estudio. El modelo se esquematiza en la *Figura 2.5*.

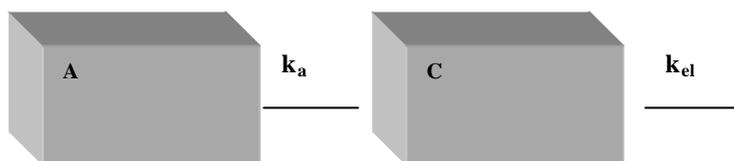


Figura 2.5

El proceso de absorción del compuesto ensayado se ajusta, pues, a una cinética aparente de primer orden, cuya expresión matemática es la siguiente:

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A \quad \text{Ecuación 2.18}$$

en la que dA/dt representa la disminución de la concentración de fármaco en el lugar de absorción en función del tiempo, o velocidad de desaparición, y A , la concentración remanente en dicho lugar. La forma integrada de esta ecuación es:

$$A = A_0 \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad \text{Ecuación 2.19}$$

en la que A es la concentración remanente de compuesto en el lugar de absorción a los tiempos de muestreo t , A_0 es la concentración inicial (a tiempo cero), y k_a es la constante aparente de velocidad de absorción. El valor que se obtiene de A_0 es normalmente inferior a la concentración inicial de la solución de perfusión debido a la adsorción del compuesto al epitelio y a la dilución de la solución perfundida por los restos de líquido de lavado que no han podido ser eliminados completamente tras el acondicionamiento del intestino. Estos hechos no restan validez a la constante, ya que se

puede determinar con absoluta fiabilidad gracias a la rapidez con la que se alcanza el equilibrio en el proceso de adsorción, habitualmente inferior a cinco minutos (DOLUISIO y cols., 1969; LEVINE y cols., 1980).

Por regresión no lineal de las concentraciones remanentes (A) a cada tiempo de muestreo se obtiene la k_a del compuesto ensayado.

Algunos autores prefieren utilizar el coeficiente de permeabilidad efectiva en lugar de la constante de velocidad de absorción para cuantificar el proceso de absorción en modelos animales *in situ* (AMIDON y cols., 1988; HAN y cols., 1998). Consideran que permite una mejor comparación entre resultados obtenidos en distintos lugares de absorción, ya que, a diferencia de k_a , no engloba la superficie útil de absorción, que varía en las distintas zonas del tracto gastrointestinal que se ensayan, ni tampoco el volumen de disolución perfundida en el ensayo (V_0). La relación entre k_a y P_{ef} se muestra en la siguiente ecuación:

$$k_a = \frac{P_{ef} \cdot S}{V} \quad \text{Ecuación 2.20}$$

Cuando se administra un volumen determinado de disolución (V), éste se dispone como un cilindro que se adapta al intestino, ocupando una longitud del mismo (L) de forma que si se desarrollan las expresiones geométricas de ambas magnitudes se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$S = 2 \cdot p \cdot r \cdot L \quad \text{Ecuación 2.21}$$

$$V = p \cdot r^2 \cdot L \quad \text{Ecuación 2.22}$$

de forma que al realizar el cociente S/V se obtiene que:

$$\frac{S}{V} = \frac{2 \cdot \mathbf{p} \cdot r \cdot L}{\mathbf{p} \cdot r^2 \cdot L} = \frac{2}{r}$$

Ecuación 2.23

Es decir, que si el radio del intestino delgado no cambia, la fracción S/V permanece constante tanto si se ocupa mucho como poco volumen del tramo intestinal. Como consecuencia, al sustituir en la *Ecuación 2.20*, se obtiene que:

$$k_a = \frac{P_{ef} \cdot S}{V} = \frac{2 \cdot P_{ef}}{r}$$

Ecuación 2.24

2.4.3 ENSAYOS DE PROMOCIÓN DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE ACAMPROSATO

2.4.3.1 Ensayos *In situ*

2.4.3.1.1 Soluciones de trabajo

A) Solución anestésica y solución de lavado

Se administraron 0.65 ml por cada 100 g de peso corporal del animal de una solución de hidrato de cloral en agua bidestilada (6% (p/v)) por vía intraperitoneal (ver *Epígrafe* 2.4.2.1).

La finalidad con la que se emplea la solución de lavado en estos ensayos, así como su composición cuantitativa y el procedimiento seguido para su preparación se describen en el *Epígrafe* 2.4.2.1.

B) Soluciones de perfusión

Para la realización de los ensayos se utilizaron las siguientes soluciones:

Con el fin de estudiar la influencia del polisorbato 80 y del caprato sódico en la absorción intestinal del acamprosato, se ensayaron varias soluciones:

- *B.1) Soluciones control*: Se prepararon distintas soluciones control en función del promotor ensayado:
 - Estudio con polisorbato 80: Solución de acamprosato 1.38 mM en líquido de lavado y marcado con ¹⁴C-acamprosato 0.02 μCi/ml (*solución control A*).

- Estudio con caprato sódico: Solución 0.22 μM (0.02 $\mu\text{Ci/ml}$) de ^{14}C -acamprosato preparada en líquido de lavado (*solución control B*).

- *B.2) Soluciones de polisorbato 80*: Se prepararon tres soluciones de *polisorbato 80* a las concentraciones de 5 mg/ml (<CMC), 20 mg/ml (CMC) y 800 mg/ml (>CMC) en líquido de lavado. En todas ellas se adicionó acamprosato a la concentración de 1.38 mM y ^{14}C -acamprosato (0.02 $\mu\text{Ci/ml}$).
- *B.3) Soluciones de caprato sódico*: Se prepararon dos disoluciones que contenían 13 mM (CMC) y 16 mM (>CMC) de caprato sódico en solución de lavado. Una característica del caprato sódico a tener en cuenta a la hora de preparar estas disoluciones es que precipita en presencia de calcio (ANDERBERG y cols., 1993). Puesto que el acamprosato se encuentra formulado como sal cálcica, todas las soluciones empleadas para el estudio del efecto del caprato sódico en la absorción intestinal del acamprosato se prepararon con la mínima cantidad de fármaco. Por ello, aunque todas las soluciones ensayadas contenían ^{14}C -acamprosato (0.02 $\mu\text{Ci/ml}$), en ninguna de ellas se adicionó el fármaco en su forma no marcada. También se preparó una disolución de caprato sódico, de concentración 16 mM, pero sin ^{14}C -acamprosato, con objeto de realizar una perfusión previa al ensayo en algunos grupos experimentales.

2.4.3.1.2 Técnica quirúrgica

Se empleó la técnica propuesta por Doluisio y colaboradores en 1969, adaptada a nuestras condiciones de trabajo. Todos los ensayos se realizaron en el tramo medio (33 cm) del intestino delgado de la rata. La descripción detallada de la técnica quirúrgica empleada coincide con la descrita en el *Epígrafe 2.4.2.2*.

2.4.3.1.3 Protocolo experimental

En todo este conjunto de experiencias, siempre se perfundieron en el tramo medio del intestino delgado de la rata, 5 ml de la solución a ensayar. Los tiempos de recogida de muestra fueron 2, 5, 10, 15, 20, 25, y 30 minutos.

El procedimiento seguido para la perfusión y recogida de muestras, así como cualquier otro aspecto metodológico coinciden con los descritos en el *Epígrafe 2.4.2.3*.

Los distintos grupos experimentales, ensayados en los estudios de promoción de la absorción intestinal, son los que se describen a continuación:

I) Experimentos con Polisorbato 80:

Se establecieron cuatro grupos de ensayo a los que se perfundió la disolución control (grupo G-0) y las distintas disoluciones de Polisorbato 80. Los distintos grupos de ensayo fueron:

- * **Grupo G-0:** acamprosato 1.38 mM+ ^{14}C -acamprosato 0.22 μM (n=4)
- * **Grupo G-1:** acamprosato 1.38 mM+ ^{14}C -acamprosato 0.22 μM + Polisorbato 80 (5mg/l) (n=6)
- * **Grupo G-2:** acamprosato 1.38 mM+ ^{14}C -acamprosato 0.22 μM + Polisorbato 80 (20mg/l) (n=6)
- * **Grupo G-3:** acamprosato 1.38 mM+ ^{14}C -acamprosato 0.22 μM + Polisorbato 80 (800mg/l) (n=6)

La asignación de los animales a los grupos experimentales fue completamente aleatoria.

II) Experimentos con caprato sódico:

II.1) Influencia de la concentración del caprato sódico:

Para analizar los efectos del caprato sódico sobre la absorción intestinal del acamprosato, se establecieron tres grupos de ensayo a los que se perfundió la disolución control (grupo H-0) y las distintas disoluciones de caprato sódico. Los distintos grupos de ensayo fueron:

- * **Grupo H-0:** ^{14}C -acamprosato 0.22 μM (n=10)
- * **Grupo H-1:** ^{14}C -acamprosato 0.22 μM + Caprato sódico 13 mM (n=10)
- * **Grupo H-2:** ^{14}C -acamprosato 0.22 μM + Caprato sódico 16 mM (n=10)

La asignación de los animales a los grupos experimentales fue completamente aleatoria.

II.2) Influencia de la exposición previa al caprato sódico:

Con el fin de estudiar los efectos de la exposición previa de caprato sódico 16 mM sobre la absorción intestinal del acamprosato, se planificaron una serie de experiencias adicionales en las que, previamente a la realización del ensayo de absorción propiamente dicho, se perfundieron durante un tiempo total de 40 minutos distintas disoluciones. A esta fase se le denominó "fase de pre-exposición". Transcurrido ese periodo de tiempo, se vació el contenido intestinal y se continuó el experimento tal y como se ha descrito con anterioridad. En estos experimentos se utilizaron dos grupos control (**grupo I-0** y **I-00**) y uno experimental (**grupo I-1**).

En el siguiente *Cuadro*, se resumen los aspectos más relevantes del diseño experimental utilizado en estos experimentos:

Grupo	n	Pre-exposición (40 min)	Ensayo de absorción
I-0	10	Solución de lavado	¹⁴ C-acamprosato 0.22 μM
I-00	10	Solución de lavado	¹⁴ C-acamprosato 0.22 μM + Caprato sódico 16 mM
I-1	10	Caprato sódico 16 mM	¹⁴ C-acamprosato 0.22 μM + Caprato sódico 16 mM

Cuadro 2.5 Diseño experimental empleado en los ensayos correspondientes al estudio de la influencia de una exposición previa (40 min) del caprato sódico en la absorción intestinal del acamprosato.

La asignación de los animales a los distintos grupos fue completamente aleatoria.

2.4.3.1.4 Tratamiento analítico y valoración de las muestras

La cuantificación de la concentración de ¹⁴C-acamprosato en las muestras intestinales recogidas, se realizó mediante la medida de la radiactividad con ayuda de un contador de centelleo en fase líquida. Todos los aspectos concernientes a la valoración analítica coinciden con los descritos en el *Epígrafe* 2.4.2.4.

En los ensayos con polisorbato 80 se asumió que la proporción entre acamprosato y ¹⁴C-acamprosato no variaba a lo largo de los ensayos. De este modo las Cpm registradas se transformaron en unidades de concentración mediante el uso de la proporcionalidad existente entre el acamprosato estable y las Cpm de ¹⁴C-acamprosato en la dosis administrada.

Sin embargo, diversos autores indican que la presencia de iones calcio en el medio induce la precipitación del caprato sódico (ANDERBERG y cols., 1993) en forma de caprato cálcico, impidiendo así el estudio de sus posibles acciones promotoras. En consecuencia, todos los ensayos en los que se estudió la influencia de la presencia del caprato sódico en la absorción del acamprosato se realizaron con la única presencia del acamprosato marcado radiactivamente. En estos casos, la transformación de las Cpm registradas en unidades de concentración se realizó empleando el valor de la actividad específica del producto radiactivo (90 mCi/mmol).

2.4.3.1.5 Determinación de la constante aparente de velocidad de absorción (k_a)

Para la cuantificación del efecto promotor de las diferentes sustancias ensayadas, se calculó la k_a en presencia y ausencia de cada una de ellas. El fundamento teórico, así como el procedimiento para su cálculo se han descrito en el *Epígrafe 2.4.2.5* de la presente memoria. De la misma manera, también se han realizado los ensayos correspondientes para la cuantificación del proceso de reabsorción de agua.

2.4.3.2 Ensayos *In vivo*: administración oral

2.4.3.2.1 Soluciones de trabajo

Con el fin de estudiar la influencia del caprato sódico en la absorción intestinal del acamprosato, tras una administración oral en animales conscientes, se emplearon las siguientes disoluciones:

- A) *Disolución control*: Se preparó adicionando ^{14}C -acamprosato a la concentración de 2.75 μM (0.25 $\mu\text{Ci/ml}$) en agua bidestilada.
- B) *Disoluciones de caprato sódico*: Se prepararon tres disoluciones que contenían 13 mM (CMC), 16 mM (>CMC) y 50 mM de caprato sódico en agua bidestilada. Debido a que el caprato sódico precipita en presencia de calcio (ANDERBERG y

cols., 1993) y que el acamprosato se encuentra formulado en forma de sal cálcica, se tuvo la precaución de que la concentración de trabajo del fármaco no fuera elevada. A todas las soluciones se les adicionó la cantidad necesaria de ^{14}C -acamprosato para que la concentración de fármaco fuese 0.25 $\mu\text{Ci/ml}$ (2.75 μM)

2.4.3.2.2 Técnica quirúrgica

El objetivo de estos experimentos fue determinar, *in vivo*, la eficacia del caprato sódico para incrementar la biodisponibilidad en magnitud del acamprosato tras su administración por vía oral. Para ello se cuantificó la fracción de dosis excretada en la orina de los animales tratados. Por tanto, en este conjunto de ensayos, no fue necesaria la realización de ninguna intervención quirúrgica.

Los animales se sometieron a un período de ayuno durante las 18-24 horas previas a la administración. Durante este tiempo los animales se mantuvieron en jaulas de doble fondo, para evitar la coprofagia, y con libre acceso al agua de bebida.

2.4.3.2.3 Protocolo experimental

Los animales pertenecientes a este conjunto de ensayos se distribuyeron en 4 grupos en función de la dosis administrada de caprato sódico.

El ensayo se diseñó de manera que los animales se asignaron de un modo totalmente aleatorio a alguno de los siguientes grupos experimentales:

- * **Grupo J-0:** ^{14}C -acamprosato 2.75 μM (n=12)
- * **Grupo J-1:** ^{14}C -acamprosato 2.75 μM + Caprato sódico 13 mM (n=8)
- * **Grupo J-2:** ^{14}C -acamprosato 2.75 μM + Caprato sódico 16 mM (n=8)
- * **Grupo J-3:** ^{14}C -acamprosato 2.75 μM + Caprato sódico 50 mM (n=8)

En todos los ensayos, el volumen de la solución administrada siempre fue de 2 ml. El procedimiento detallado seguido para la administración de los preparados coincide con el descrito en el apartado 2.4.1.3.

Los ensayos se realizaron siempre en jaulas metabólicas, lo cual permitió recoger la orina de los animales tratados correspondiente al período 0-24 horas postadministración. La jaula se lavó con el volumen adecuado de agua bidestilada con el fin de arrastrar posibles restos de orina hasta el recipiente de recogida.

Aunque el empleo de las jaulas metabólicas también permitió recoger las heces de los animales tratados, en este conjunto de experimentos no fueron procesadas para su análisis.

2.4.3.2.4 Tratamiento analítico y valoración de las muestras

Para la determinación del contenido de ^{14}C -acamprosato en las muestras de orina recogidas durante los períodos 0-24 y 24-48 horas postadministración se empleó un contador de centelleo en fase líquida. Los aspectos correspondientes al equipo de valoración, líquido de centelleo y precisión y exactitud del método analítico coinciden con los descritos en el *Epígrafe 2.3.2.4*.

2.4.3.2.5 Cálculos farmacocinéticos. Cálculo de la biodisponibilidad en magnitud

Para evaluar el efecto del caprato sódico en la absorción intestinal del acamprosato cuando se administran conjuntamente, por vía oral en el animal consciente, se cuantificó la fracción de dosis de fármaco que apareció inalterada excretada en la orina de los animales tratados.

2.4.3.3 Ensayos *In vitro*. Cultivos celulares

Para el desarrollo de estos ensayos se empleó la línea celular Caco-2 obtenida a partir de la *American Type Culture Collection, Rockville, MD* y mantenida en nuestro laboratorio en las condiciones que a continuación se detallan.

2.4.3.3.1 Soluciones de trabajo

Para la realización de la presente Memoria se han empleado distintos tipos de soluciones tanto para mantener las líneas celulares como para el tratamiento de los insertos. A continuación se han agrupado de acuerdo con su funcionalidad.

A) Medio de Cultivo

El medio de cultivo es una solución estéril compuesta por distintas sales, nutrientes y antibióticos en la que las células crecen y se dividen de una manera óptima. Una vez preparado el medio de cultivo, se debe guardar a una temperatura de 4°C. Está compuesto por las siguientes soluciones:

Penicilina-Estreptomicina	5 ml
MEM suplemento de aminoácidos no esenciales	5 ml
L-Glutamina	5 ml
Suero bovino fetal	50 ml
DMEM (Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium)	450 ml

La composición de cada una de estas soluciones se detalla a continuación:

- **Penicilina-Estreptomicina.** Solución estéril que se adiciona al medio de cultivo para evitar la proliferación bacteriana. Fue suministrada por *Gibco*[®] (Lenexa, KS) y su composición se detalla a continuación:

Penicilina G (sal sódica)	10000 unidades/ml
Estreptomicina (sulfato)	10000 µg/ml

- **Solución de aminoácidos no esenciales.** Se preparó disolviendo todos los componentes en agua bidestilada y posteriormente se procedió a la esterilización por filtración. Todos los aminoácidos fueron suministrados por *Sigma*[®] *Chemical Co.* (St. Louis).

L-Alanina	0.89 g/l
L-Asparragina	1.321 g/l
Ácido L-Aspártico	1.33 g/l
Ácido L-Glutámico	1.47 g/l
L-Glicina	0.75 g/l
L-Prolina	1.15 g/l
L-Serina	1.05 g/l

- **L- Glutamina 200 mM.** Se preparó una solución de 29.22 g de L-Glutamina por litro de agua bidestilada y posteriormente se esterilizó por filtración. Esta disolución se adiciona al medio de cultivo como complemento nutritivo, ya que se trata de un aminoácido esencial. Fue suministrado por *Sigma*[®] *Chemical Co.* (St. Louis).
- **Suero bovino fetal (FBS).** Suplemento proteico estéril del medio de cultivo. Suministrado por *Sigma*[®] *Chemical Co.* (St. Louis).

- **DMEM.** Se prepara con agua bidestilada a partir de los siguientes reactivos y posteriormente se esteriliza por filtración.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium Powder	13.4 g/l
NaHCO ₃	3.7 g/l
HEPES	1.3 g/l
Glucosa	3.5 g/l

El pH de esta solución se ajustó a 7.4 con NaOH o HCl. Posteriormente se esterilizó por filtración y se guardó a una temperatura de 4 °C.

B) Pase de células

Consiste en la dilución y transvase de las células a otro frasco una vez que el cultivo esté llegando a la confluencia. Para ello se necesitan dos soluciones de trabajo: PBS-EDTA y tripsina-EDTA.

- **Solución de PBS-EDTA.** Se utilizó para lavar la monocapa de células en el frasco, eliminando las posibles enzimas que podrían interactuar con la tripsina. Esta solución está constituida por una mezcla de:

D-PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline)	9.7 g/l
EDTA-Na ₂	0.365 g/l

- **Solución de tripsina-EDTA,** fue suministrada por *Gibco*[®] (Lenexa, KS), se comercializa en solución estéril. Contiene 0.5% de tripsina y 0.2% de EDTA-Na₄ (en solución salina sin Ca⁺² ni Mg⁺²). De esta solución se realizó una dilución 1/5 con PBS-EDTA previamente filtrado. La solución resultante se utilizó para separar las células de los frascos.

C) Soluciones para adecuación a los ensayos de permeabilidad

Para realizar el ensayo de permeabilidad, se debe eliminar cualquier resto de medio de cultivo en la monocapa que pueda interferir con las muestras. Para ello se utilizó las soluciones de HBSS. Posteriormente se adicionó la solución del compuesto a ensayar.

- **Solución de HBSS sin HEPES.** Se utilizó para los primeros lavados de la monocapa celular. Su composición es la siguiente:

HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, powder)	9.8 g
NaHCO ₃	0.58 g
Glucosa	3.5 g
Agua	c.s.p. 1 l

Estos reactivos se disolvieron en agua bidestilada y se guardó a una temperatura de 4 °C.

- **Solución de HBSS con HEPES.** Solución empleada para el último lavado de la monocapa celular y para adicionarla en el compartimento receptor. Adicionalmente, el volumen extraído de la cámara receptora a lo largo del ensayo se repone con esta misma solución. El pH de esta solución se ajusta a 7.4. Está constituida por:

HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, powder)	9.80 g
HEPES	5.96 g
NaHCO ₃	0.37 g
Glucosa	3.50 g
Agua	c.s.p. 1 l

Estos reactivos se disolvieron en agua bidestilada. Posteriormente se ajustó su pH a 7.4 y se guardó a una temperatura de 4 °C.

D) Soluciones a ensayar

Todas ellas se prepararon en solución de HBSS (libre $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$) con HEPES que constituye la solución base para la preparación de las soluciones de fármaco a estudiar. El pH de esta solución es de 7.4. Esta solución se adquirió directamente a través de *Biochrom AG*[®] (Berlín). Su composición cuantitativa equivale a la de solución de HBSS con HEPES, con la excepción de incluir HBSS/CMF (Hanks' Balanced Salt Solution calcium-magnesium free, powder) en lugar de HBSS.

2.4.3.3.2 Mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares se han mantenido en una estufa de incubación con una temperatura de 37°C, 5% de CO_2 y una humedad relativa del 90%. Estas condiciones son las adecuadas para su crecimiento. Cada dos días fue renovado el medio de cultivo. Para ello, es necesario llevar a cabo todas las manipulaciones en una cámara de flujo laminar vertical de seguridad biológica. El medio de cultivo se aspira con ayuda de una bomba de vacío y se sustituye por medio nuevo, atemperado a 37°C.

2.4.3.3.2.1 Crecimiento en frascos

Las células crecen en frascos de plástico estériles (*Figura 2.6*), formándose una monocapa celular que queda adherida a la base de dichos frascos. Para que se produzca un correcto crecimiento hay que controlar dos aspectos: El cambio de medio debe realizarse con frecuencia, ya que las células producen metabolitos, y éstos pueden alterar su pH. También se debe revisar todos los días la densidad de crecimiento, ya que una vez formada la monocapa, las células deben cambiarse a un nuevo frasco para facilitar su crecimiento.

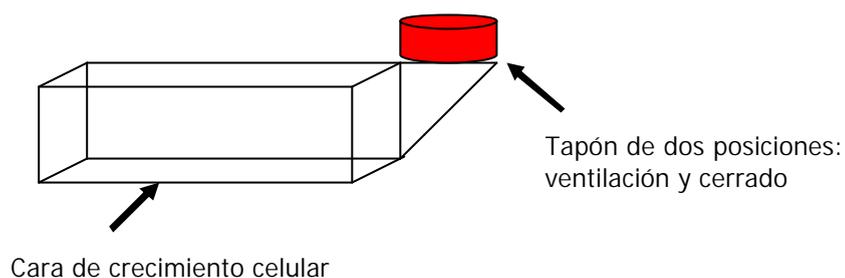


Figura 2.6. Esquema de los frascos de plástico.

El cambio de medio fue realizado en días alternos descansando los fines de semana. El procedimiento de trabajo es el siguiente: el frasco (*Figura 2.6*), que se encuentra en la estufa de incubación con el tapón abierto para que las células estén en contacto con la atmósfera enriquecida con CO_2 , se extrae de la estufa de incubación, cerrando previamente el tapón. Antes de introducirlo en la cámara de flujo laminar se pulveriza con alcohol al 70%. La botella de medio de cultivo atemperado, también se pulveriza con este alcohol y se introduce en la cámara.

Una vez se ha secado el alcohol, se abren parcialmente ambos tapones. Se sujeta el frasco en posición inclinada favoreciendo que el medio de cultivo quede en la pared opuesta al crecimiento celular, y con la ayuda de una pipeta *Pasteur* previamente conectada a una bomba de vacío, se aspira el medio de cultivo remanente en el frasco. A continuación, con una pipeta estéril acoplada a un pipeteador automático, se deposita en el frasco la cantidad adecuada de medio de cultivo procurando no tocar las paredes. El frasco se saca de la cámara con el tapón cerrado, se vuelve a pulverizar con alcohol al 70% y se introduce en la estufa, donde nuevamente se abre el tapón hasta su posición de ventilación.

2.4.3.3.2.2 Dilución celular y cambio a un nuevo frasco

La velocidad de crecimiento de este tipo de cultivos es muy rápida, de forma que cuando la monocapa alcanza una confluencia adecuada, ocupando toda la superficie disponible en los frascos, hay que separar las células de la base del frasco y cambiarlas a un nuevo frasco, realizando una dilución de la densidad celular.

Para ello, se trabaja en la campana de flujo laminar y se toman las mismas precauciones que se han mencionado en el *Epígrafe* anterior.

Primero se aspira el medio de cultivo existente en el frasco y seguidamente se realiza un lavado de la monocapa celular con el volumen adecuado de PBS-EDTA previamente atemperado. Esta solución contiene los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} que se encargan de eliminar de la monocapa celular cualquier traza de suero existente, lo que podría disminuir la acción de la tripsina. En estas condiciones, el frasco se vuelve a introducir en la estufa de incubación durante 10 minutos.

A continuación, el frasco se lleva a la cámara de flujo laminar, y se aspira el PBS-EDTA, que se sustituye por el volumen adecuado de una solución de tripsina-EDTA (*Cuadro 2.6*) (1/5 del volumen de medio de cultivo que luego se adiciona). El frasco se vuelve a introducir en la estufa durante unos 10 minutos. La eficacia de la tripsina para separar las células de la base del frasco está determinada por la concentración de tripsina utilizada, el tipo de cultivo celular y la presencia de suero o de otros factores de crecimiento.

Transcurrido este tiempo, se adiciona el volumen correspondiente de medio de cultivo para conseguir una dilución 1/5 de la tripsina, de manera que ésta quede inactivada. La suspensión celular resultante se agita con ayuda de una pipeta para, así, separar los grupos de células. Dependiendo de la dilución celular que se desee realizar (normalmente 1/5) se toma un volumen adecuado de dicha suspensión celular que se dispone en un nuevo frasco al que se añade la cantidad correspondiente de medio de cultivo atemperado.

Al día siguiente, se debe cambiar el medio de cultivo del nuevo frasco para eliminar las células que hayan muerto durante este proceso y los restos de tripsina que pudieran quedar.

En el *Cuadro 2.6* se indican los volúmenes de las distintas disoluciones utilizadas.

Frascos de 75 cm ²	
PBS- EDTA	12 ml
Tripsina-EDTA	2.5 ml
Medio de cultivo	10 ml
- Suspensión celular	2.5 ml
<i>Dilución celular 1/5</i>	
- Medio de cultivo en el nuevo frasco	10 ml

Cuadro 2.6 Volúmenes de las distintas soluciones utilizadas.

2.4.3.3.2.3 Congelación

El proceso de congelación permite conservar las células de forma indefinida inmersas en nitrógeno líquido. Sin embargo, durante el mismo las células se ven sometidas a una serie de fenómenos adversos, tales como la formación de cristales de hielo, cambios de pH por la cristalización diferencial de los componentes de los sistemas tamponadores, desnaturalización de proteínas, así como deshidratación osmótica por la concentración de electrolitos en el medio extracelular, que podrían dañar la integridad celular. Con el fin de evitar estos inconvenientes se utiliza una solución constituida por medio de cultivo y por dimetilsulfóxido (DMSO) (1/10). Este agente aumenta la permeabilidad de las membranas, disminuye el punto de congelación y enlentece la velocidad de este proceso

(KRUSE y PATTERSON, 1973; JAKOBY y PASTAN, 1979; FRESHNEY, 1986), sin embargo puede resultar tóxico para las células.

Con el fin de controlar la velocidad de congelación y que se produzca a 1°C/minuto se utiliza un contenedor específico de criopreservación que contiene una disolución de isopropanol. Este recipiente tiene una serie de hendiduras donde se colocan los crioviales de congelación.

Para realizar el proceso de congelación se procede a despegar las células del frasco tal y como se ha descrito en el *Epígrafe* anterior. Una vez se obtiene la suspensión celular, ésta se trasvasa a un tubo de centrifuga estéril de 15 ml, y se centrifuga durante 4 minutos a 3000 r.p.m. El sobrenadante se elimina por aspiración, y al precipitado de células resultante se le añaden 4.5 ml de medio de cultivo atemperado. Con ayuda de una pipeta se homogeniza la suspensión. Finalmente se añaden 0.5 ml de DMSO y se vuelve a homogenizar.

Rápidamente se toma una alícuota de 1 ml de la suspensión y se deposita en cada criovial, introduciéndose estos en el recipiente con isopropanol. Este recipiente se somete a congelación a -20°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, el recipiente se introduce en un congelador de -80°C, donde permanece entre 24 y 48 horas. Por último, los crioviales se introducen individualmente en un tanque de nitrógeno líquido.

2.4.3.3.2.4 Descongelación

El proceso de descongelación debe ser muy rápido para procurar que las células estén el menor tiempo posible en contacto con el DMSO, ya que, como se ha mencionado, este agente resulta tóxico para las células.

Una vez extraído el criovial del tanque de nitrógeno, se introduce rápidamente en un baño a 37°C para acelerar su descongelación. Cuando el criovial se ha descongelado, se introduce en la cámara de flujo laminar y, con ayuda de una pipeta, su contenido se trasvasa a un tubo de centrifuga estéril de 15 ml. Se añaden 510 ml de medio atemperado, diluyendo así el DMSO. Después se centrifuga durante 4 minutos a 3000 r.p.m. El sobrenadante se aspira y el sedimento celular se redisuelve en 5 ml de medio

atemperado para evitar que las células queden agrupadas. Esta suspensión celular se introduce en un frasco de 25 cm³ donde se distribuye por toda la superficie. En estas condiciones las células se dejan en la estufa de incubación y en los días siguientes se observa si su crecimiento es adecuado.

2.4.3.3 Ensayo de permeabilidad

Para poder llevar a cabo los ensayos de permeabilidad es necesario obtener una monocapa celular sobre unas membranas filtrantes de policarbonato de 3 µm de tamaño de poro y 4.2 cm² de superficie. Estas membranas se encuentran acopladas a unos insertos de plástico, que se colocan en el interior de los pocillos de unas placas de plástico, de tal forma que el interior del inserto simula la zona luminal o apical, y el pocillo en el que se coloca, la zona basolateral. El esquema del montaje se muestra en la *Figura 2.7*.

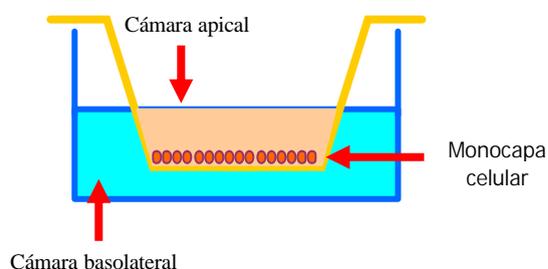


Figura 2.7 Esquema del montaje experimental

2.4.3.3.3.1 Preparación de las membranas

El procedimiento seguido para la siembra de la suspensión celular en las membranas de policarbonato fue la siguiente: en el interior de la cámara de flujo laminar y con ayuda de unas pinzas metálicas, se extraen los insertos de su recipiente estéril y se colocan en los pocillos. Seguidamente, se añaden 3 ml de solución DMEM en la cámara basolateral y 2 ml en la cámara apical. Se cierra el plato y se deja en la estufa 24 horas.

Al día siguiente el plato se introduce en la cámara, y con ayuda de una pipeta Pasteur se aspira el líquido remanente de ambas cámaras. A continuación, se añaden 3 ml de medio de cultivo en la cámara basolateral, y 2 ml en la cámara apical. El plato se vuelve a introducir en la estufa, donde permanecerá sin tratamiento adicional alguno, hasta el día del sembrado. Al día siguiente se procedió al sembrado celular.

2.4.3.3.3.2 Sembrado celular y crecimiento

Se procede de manera similar a la descrita en el *Epígrafe* 2.4.3.3.2. Partiendo del cultivo celular que existe en un frasco, una vez obtenida la suspensión celular, ésta se coloca en un tubo de centrifuga estéril, se centrifuga 3 minutos a 3000 r.p.m. y se elimina el sobrenadante. Esta operación se repite de nuevo para asegurar que no quedan trazas de tripsina.

Una vez se ha aspirado el sobrenadante se adicionan unos 20 ml de medio de cultivo atemperado y, con ayuda de una pipeta, se separan las células. Seguidamente, con una pipeta Pasteur se toman unas gotas de la suspensión celular y, por capilaridad, se introducen entre un hemocitómetro y un cubreobjetos. Para poder realizar el recuento celular, el hemocitómetro se coloca en un microscopio, donde se obtiene una imagen similar a la del esquema de la *Figura* 2.8.

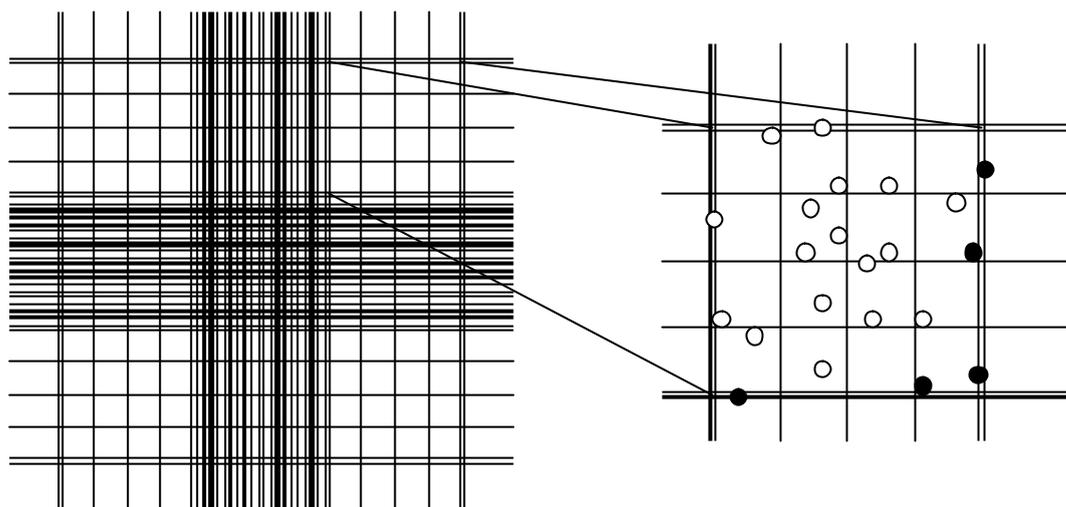


Figura 2 8 Esquema del hemocitómetro

Se seleccionan al azar 3 de los 4 cuadros de las esquinas y se procede a realizar el recuento celular según el siguiente criterio: se cuentan todas las células que se encuentran en el interior de los cuadros sin superponerse a las líneas que delimitan sus lados, y las células superpuestas en dos de estos lados de cada cuadro, por ejemplo los lados superior e izquierdo. Cada uno de estos cuadros equivale a 1 μ l de líquido, de forma que se realiza la media del número de células contadas en los tres cuadros y así se obtiene la concentración de células por microlitro.

Para realizar el sembrado en los insertos, se debe emplear una concentración celular de 25 células/ μ l. Esta concentración permite obtener una monocapa celular con una confluencia adecuada y con el desarrollo de todas las proteínas transportadoras características de este cultivo a los 19-21 días después de realizar la siembra (HU y cols., 1994a; 1994b).

De modo que si la concentración obtenida en el recuento es mayor de 25 células/ μl , se debe realizar una dilución según los siguientes cálculos:

$$V_{cel} = \frac{25}{x} \cdot z$$

Ecuación 2.25

$$V_{mc} = z - V_{cel}$$

Ecuación 2.26

en la que V_{cel} es el volumen de la suspensión celular madre; x , la concentración celular de dicha suspensión celular madre (media de los recuadros contados); z el volumen final de la suspensión (aproximadamente de unos 15 ml por plato); y V_{mc} corresponde al volumen de medio de cultivo atemperado necesario para realizar la dilución celular.

Si la concentración celular obtenida en el recuento es menor de la que se desea conseguir, se procede a despegar más células de otro frasco, se mezclan con la suspensión celular previamente obtenida y se realiza un nuevo recuento.

Una vez obtenida la suspensión celular a sembrar, se saca el plato de la estufa y se aspira el líquido remanente de ambas cámaras. A continuación se añaden 3 ml de medio de cultivo atemperado en la cámara basolateral, y en la cámara apical 2 ml de la suspensión celular de concentración 25 células/ μl . Se cierra el plato y se deja en la estufa de incubación.

Al día siguiente al sembrado debe cambiarse el medio de cultivo del plato para eliminar las células que hayan podido morir durante este proceso. A partir de este momento, el medio de cultivo se cambia en días alternos.

El cambio de medio se realiza en la cámara de flujo laminar. Con ayuda de una pipeta Pasteur se aspira el medio de cultivo remanente en ambas cámaras, y se sustituye por medio nuevo atemperado.

2.4.3.3.3.3 Ensayo de permeabilidad

El día previo al de la realización del ensayo se cambió el medio de cultivo del plato para eliminar restos del metabolismo celular y demás contaminantes que pudieran existir. Este ensayo debe realizarse entre los días 19 y 21 a partir del sembrado, ambos incluidos, ya que si se realiza antes del día 19, se considera que la monocapa no ha alcanzado la confluencia adecuada; y después del día 21, se manifiestan fenómenos de envejecimiento celular y en el inserto no existe espacio suficiente para un correcto desarrollo de las células.

El experimento se llevó a cabo fuera de la cámara de flujo, ya que una vez acabado éste, las células se desechan, de manera que no son necesarias medidas de seguridad para evitar una posible contaminación.

2.4.3.3.3.4 Comprobación de la monocapa

La integridad de la monocapa celular se estudió con un micropolímetro (Millicell-ERS[®]). Para ello, se comparó la medida de la resistencia eléctrica de cada inserto con la resistencia eléctrica de un inserto sin crecimiento celular alguno (HUNTER y cols., 1991).

Antes de proceder a la determinación de la resistencia eléctrica, las células se lavan dos veces con una solución atemperada de HBSS sin HEPES, y una tercera vez con una solución de HBSS con HEPES. La medida de la resistencia eléctrica se realiza con este último tampón.

En otro plato se coloca un inserto sin crecimiento, que se utiliza como blanco y en el que sólo se adiciona la solución atemperada de HBSS con HEPES. Para ajustar el micropolímetro, los electrodos se colocan: uno en la cámara apical y el otro en la cámara

basolateral y se ajusta el voltaje a cero. A continuación, se mide la resistencia de este inserto en tres puntos diferentes (Figura 2.9). Posteriormente, se mide la resistencia en todos los insertos sembrados en los tres puntos. Esta resistencia tiene que ser, como mínimo, 100 unidades mayor que la resistencia obtenida para el blanco, para poder considerar que la monocapa está íntegra (NALDA-MOLINA, 2003).

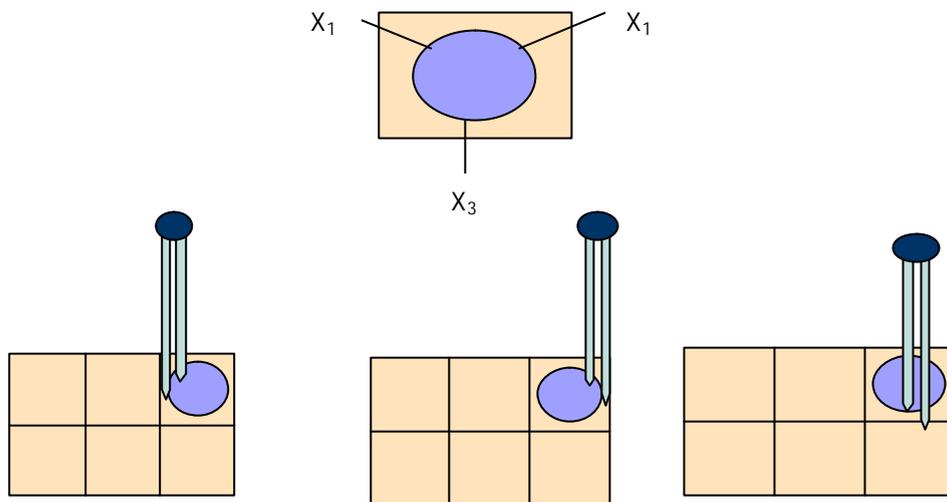


Figura 2.9 Esquema de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER).

Tras comprobar la integridad de la monocapa, el plato con los insertos sembrados se introduce durante una hora en la estufa de incubación, con el fin de que las células eliminen cualquier residuo de suero y iones para que éstos no interfieran en el ensayo.

2.4.3.3.4 Protocolo experimental

Para analizar los efectos del caprato sódico sobre la permeabilidad del ^{14}C -acamprosato y el ^{14}C -manitol a través de una monocapa de células Caco-2, se establecieron los grupos de ensayo que se resumen en el siguiente *Cuadro*:

Grupo	n	Sentido	Pre-exposición (40min)	Perfusato (150 min)
K-0	4	AP-BL	-	^{14}C -manitol 8.2 μM
K-1	4	AP-BL	-	^{14}C -manitol 8.2 μM + Caprato sódico 13 mM
K-2	4	AP-BL	-	^{14}C -manitol 8.2 μM + Caprato sódico 16 mM
K-3	4	AP-BL	C-10 16 mM	^{14}C -manitol 8.2 μM + Caprato sódico 16 mM
L-0	6	AP-BL	-	^{14}C -acamprosato 4.9 μM
L-00	4	BL-AP	-	^{14}C -acamprosato 4.9 μM
L-1	5	AP-BL	-	^{14}C -acamprosato 4.9 μM + Caprato sódico 13mM
L-2	4	AP-BL	-	^{14}C -acamprosato 4.9 μM + Caprato sódico 16mM
L-3	4	AP-BL	C-10 16 mM	^{14}C -acamprosato 4.9 μM + Caprato sódico 16mM

Cuadro 2.7 Diseño experimental empleado en los ensayos correspondientes al estudio de la promoción de la permeabilidad del ^{14}C -acamprosato y ^{14}C -manitol sobre una monocapa de células Caco-2.

En todos los experimentos se utilizaron platos de 6 pocillos. La cámara en la que se introduce el fármaco actúa como compartimento dador, y la cámara en la que únicamente se adiciona la solución de HBSS, actúa como compartimento receptor. En todos los ensayos se administra 2 ml de la solución de fármaco en el compartimento dador y 3 ml de la solución de HBSS con HEPES en la cámara basolateral.

El plato se introduce en un incubador con sistema de giro circular a 50 r.p.m., y una temperatura de 37°C, que permite simular las condiciones fisiológicas tanto de motilidad como de temperatura.

A tiempo cero se toma una muestra de los compartimentos dadores para conocer su concentración inicial. Las siguientes tomas de muestras se realizan en el compartimento receptor, reponiendo el volumen de muestra tomado por el mismo volumen de la solución de HBSS con HEPES. Cada una de las muestras se depositó en tubo tipo Eppendorf. En todos los ensayos, el volumen de las muestras recogidas fue de 200 μ l y los tiempos de toma de muestra fueron: 0, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos.

2.4.3.3.5 Tratamiento analítico y valoración de las muestras

Para la cuantificación de los niveles de ^{14}C -acamprosato y ^{14}C -manitol en HBSS, se empleó la medida de la radiactividad mediante un contador de centelleo en fase líquida. El equipo de valoración y el líquido de centelleo empleado coinciden con los descritos en el *Epígrafe 2.3.2.4*. Las rectas de calibración preparadas para la cuantificación de ambos analitos, así como la preparación de las muestras se describen en detalle en los siguientes *Epígrafes*.

2.4.3.3.5.1 Rectas de calibración. Evaluación de la precisión y exactitud del método analítico

Para el cálculo de la exactitud y precisión del método de valoración, se prepararon una serie de disoluciones patrón de ^{14}C -acamprosato y ^{14}C -manitol en HBSS tal y como se resumen en el *Cuadro 2.8*.

¹⁴ C-acamprosato			¹⁴ C-manitol		
Conc. (nCi/ml)	Vol. leído (μ l)	A _T (nCi)	Conc. (nCi/ml)	Vol. leído (μ l)	A _T (nCi)
44	150	6.60	4.40	150	0.666
22	150	3.30	2.20	150	0.330
4.4	150	0.66	1.10	150	0.65
2.2	150	0.33	0.44	150	0.066
1.1	150	0.16	0.22	150	0.033
			0.11	150	0.015

Cuadro 2.8 Resumen de la composición de cada uno de las disoluciones patrón de ¹⁴C-acamprosato y ¹⁴C-manitol preparados en HBSS. Se indica la actividad de cada uno de los patrones preparados, expresada en nCi/ml, el volumen de solución patrón que se cuantificó, expresado en μ l, y en la última columna se indica la actividad teórica (A_T), expresada en nanocuries, presente en cada uno de las soluciones patrón.

Para la evaluación de la exactitud y la precisión del método analítico utilizado, se prepararon 3 rectas de calibración con cinco y seis patrones distintos de ¹⁴C-acamprosato y de ¹⁴C-manitol en HBSS, respectivamente. Cada patrón se valoró por triplicado como si se tratase de una muestra de actividad desconocida. Los valores de actividad calculados para cada patrón se obtuvieron interpolando en las rectas de calibración preparadas. Se promediaron los valores de actividad calculados para cada patrón y se determinó el coeficiente de variación. La desviación del valor medio respecto del teórico es indicativa de la exactitud, mientras que el coeficiente de variación lo es de la precisión.

2.4.3.3.5.2 Preparación de las muestras

Todas las muestras se traspasaron a unos viales de centelleo para su cuantificación.

Todos los viales contenían 3 ml de líquido de centelleo y 150 μ l de las muestras recogidas.

Los viales así preparados, se sometieron a una ligera agitación manual, concluida la cual se procedió a su lectura. En todas las cuantificaciones realizadas cada vial se valoró por triplicado.

2.4.3.3.6 Cálculo del coeficiente de permeabilidad

La valoración de las muestras obtenidas a lo largo del ensayo permitió construir representaciones de la cantidad acumulada de fármaco en el compartimento receptor frente al tiempo. La pendiente de la recta obtenida al representar las cantidades acumuladas en el compartimento receptor frente al tiempo, permite conocer la permeabilidad efectiva de este modelo *in vitro*, ya que:

$$P_{ef} = \frac{b}{S \cdot A} \quad \text{Ecuación 2.27}$$

en la que b es la pendiente de la recta, S la superficie ocupada por la monocapa celular, y A la concentración de fármaco en el compartimento dador.

El coeficiente de permeabilidad puede determinarse en ambos sentidos, de manera que se obtiene la permeabilidad en el sentido apical-basolateral (P_{ab}), y la permeabilidad en el sentido contrario (P_{ba}). El cociente entre ambas permeabilidades (r) proporciona información sobre el mecanismo de transporte implicado en el proceso:

$$r = \frac{P_{ba}}{P_{ab}} \quad \text{Ecuación 2.28}$$

- Si $r \approx 1$, $P_{ba} \cong P_{ab}$, se considera que el fármaco se transporta únicamente por difusión pasiva.

- Si $r > 1$, $P_{ba} > P_{ab}$, el fármaco atraviesa la membrana a mayor velocidad en el sentido basolateral-apical que en el sentido opuesto. Si se supone que el recorrido difusional es el mismo, puede deducirse la existencia de un transportador que funciona con o sin aporte energético y que actúa en sentido basolateral-apical.
- Si $r < 1$, $P_{ba} < P_{ab}$, se puede suponer la existencia de un transportador en el sentido apical-basolateral.

El cálculo de la desviación estándar del cociente P_{ba}/P_{ab} se ha llevado a cabo mediante el método Delta (TANNER, 1992). La ecuación aplicada es la siguiente:

$$d.e. = \sqrt{I \cdot \left(\frac{\overline{P_{ba}}}{\overline{P_{ab}}} \right)^2} \quad \text{Ecuación 2.29}$$

en la que $\overline{P_{ba}}$ y $\overline{P_{ab}}$ son los valores medios de permeabilidad en el sentido basolateral-apical y apical-basolateral, respectivamente, y I se calcula mediante la Ecuación 2.30.

$$I = \left(\frac{d.e.\overline{P_{ba}}}{\overline{P_{ba}}} \right)^2 + \left(\frac{d.e.\overline{P_{ab}}}{\overline{P_{ab}}} \right)^2 \quad \text{Ecuación 2.30}$$

en la que $d.e.\overline{P_{ba}}$ y $d.e.\overline{P_{ab}}$ son las desviaciones estándar de las permeabilidades basolateral-apical y apical-basolateral media, respectivamente.

2.5 MÉTODOS MATEMÁTICOS Y ESTADÍSTICOS

2.5.1 Programas utilizados en el análisis de regresión

Para determinar los parámetros de las rectas de calibración, de las cinéticas de reabsorción de agua y los coeficientes de permeabilidad efectivos (P_{ef}) en los ensayos *in vitro*, se ha empleado el análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados (SAUNDERS y TRAPP, 1994). El programa informático utilizado es el SPSS 10.0. Este mismo programa informático se ha utilizado para realizar la prueba de normalidad de *Kolmogorov-Smirnov* y las pruebas paramétricas de comparación de medias descritas en el *Epígrafe 2.5.4*.

Para ajustar las ecuaciones representativas de los modelos farmacocinéticos a los pares de valores concentración plasmática-tiempo tras la administración intravenosa rápida u oral, se ha utilizado un programa informático de regresión no lineal, *Sigmaplot 4.0*. La reducción al mínimo de la suma de cuadrados de los residuales, se realiza utilizando el algoritmo de *Marquadt-Levenberg*. Los ajustados se han llevado a cabo utilizando como factor de ponderación $w_i = 1/Y^2$, expresión en la que Y representa los valores experimentales de concentración plasmática. Adicionalmente y con ayuda de este mismo programa se han determinado los parámetros de las cinéticas de absorción del acamprosato en los ensayos *in situ* para las distintas condiciones de ensayo.

2.5.2 Criterios de calidad de los ajustados

Como criterios de bondad de los ajustados se emplearon los parámetros que se describen a continuación:

A) Coeficiente de determinación (r^2)

El criterio estadístico establecido para determinar la bondad de los ajustados lineales es el coeficiente de determinación, r^2 .

Para los ajustados no lineales se ha utilizado el coeficiente de determinación de la correlación lineal entre los valores teóricos predichos por el modelo y los observados experimentalmente.

En ambos casos, cuanto más se aproxima el valor de r^2 a la unidad tanto más fiable es el resultado (BALANT y GARRET, 1983).

B) *Error estándar de los parámetros*

Mediante los programas de ajuste de datos antes mencionados se obtienen los parámetros de las ecuaciones utilizadas, acompañados de sus errores estándar.

C) *Suma de cuadrados*

La suma de cuadrados (SC) se utiliza para juzgar la calidad de los ajustados no lineales. Este parámetro estadístico equivale al sumatorio de los cuadrados de las diferencias entre los valores experimentales y los valores predichos por la ecuación obtenida tras el ajustado.

$$SC = \sum w_i \cdot (y_i - \bar{y}_i)^2 \qquad \text{Ecuación 2.31}$$

en la que w_i representa el factor de ponderación empleado, y_i representa los valores experimentales e \bar{y}_i los valores predichos por el modelo.

D) *Coefficiente de variación de los parámetros*

El coeficiente de variación (*CV*) de un parámetro es la desviación estándar (*d.e.*), expresada como porcentaje respecto al valor medio del parámetro estudiado (\bar{x}), como se describe a continuación:

$$CV(\%) = \frac{d.e.}{\bar{x}} \cdot 100$$

Ecuación 2.32

2.5.3 Criterios de selección de modelo

Para la selección del modelo farmacocinético que mejor describe la evolución temporal de los pares de valores concentración plasmática-tiempo, se han empleado los criterios que se indican a continuación:

1) *Ensayo AIC*

El criterio de información de Akaike (AKAIKE, 1986) se basa en el cálculo del parámetro *AIC* a partir de la expresión siguiente:

$$AIC = N \cdot \ln sc + 2p$$

Ecuación 2.33

En esta ecuación, *N* es el número de pares de valores (número de datos experimentales), *p* el número de parámetros del modelo evaluado y *sc* la suma de cuadrados. Un menor valor de *AIC* es indicativo de un mejor ajustado.

En general este criterio favorece al modelo más sencillo que se compara ya que, a mayor complejidad de la ecuación considerada, mayor número de parámetros y por lo tanto, únicamente un valor mucho menor de la suma de cuadrados haría más probable el modelo más complejo.

2) Prueba F de Snedecor

El criterio F de Snedecor se basa en determinar la probabilidad que existe de que la causa de la obtención de mejores resultados con los modelos más complejos sea el azar, es decir, conocer la probabilidad de que la mejora producida en la suma de cuadrados sea debida al azar. Se utiliza para la comparación de dos modelos y se calcula mediante la expresión:

$$F = \frac{SC_1 - SC_2}{SC_2} \cdot \frac{d_2}{d_1 - d_2} \quad \text{Ecuación 2.34}$$

en la que SC_1 corresponde a la suma de cuadrados de los residuales del modelo con menor número de parámetros y d_1 los grados de libertad del mismo, calculados mediante la diferencia entre el número de puntos experimentales y el número de parámetros que definen el modelo. Los valores SC_2 y d_2 son los correspondientes al modelo más complejo.

Para comparar las sumas de cuadrados correspondientes a los ajustados a dos modelos es necesario que el factor de ponderación utilizado en ambos casos sea el mismo.

El valor F obtenido se compara con el valor F crítico para un nivel de significación del 5%. Si el nivel de significación de F es mayor de 0.05 se considera que la diferencia entre el modelo más complejo y el más sencillo no es significativa y se acepta este último (BOXENBAUM y cols., 1974; IMBIMBO y cols., 1991).

2.5.4 Pruebas de comparación de medias

En el presente trabajo se han empleado distintas pruebas paramétricas de comparación de medias de los diferentes grupos de observaciones, fijando un nivel de confianza del 95% de modo que existen diferencias significativas cuando el valor de probabilidad P es menor del 5%.

Las condiciones que deben cumplirse para poder aplicar este tipo de pruebas paramétricas son distribución normal, homogeneidad de varianzas e independencia de las observaciones (SAUNDERS y TRAPP, 1994).

Por tanto, como paso previo al análisis comparativo, se ha realizado un ensayo de homogeneidad de varianzas, mediante la prueba de *Levene*. Si las medias proceden de muestras que siguen la ley normal y se demuestra la condición de homocedasticidad ($P > 0.05$), las pruebas se aplican con todo rigor. En concreto se utilizaron:

- a) Análisis de varianza (*ANOVA*) de una vía: se utilizó para establecer la existencia o no de diferencias significativas entre los distintos grupos de datos, debido a la existencia de un factor de variación.
- b) Pruebas de comparación múltiple: *prueba de Tukey*. Esta prueba permite la comparación entre combinaciones de grupos tras detectarse la existencia de diferencias estadísticamente significativas mediante el análisis de varianza de una vía.

3. RESULTADOS

3.1 EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.1.1 Determinación de acamprosato

En la *Figura 3.1* se representa, a modo de ejemplo, una recta de calibración obtenida tras la valoración mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de distintas soluciones patrón de **acamprosato** en **agua**.

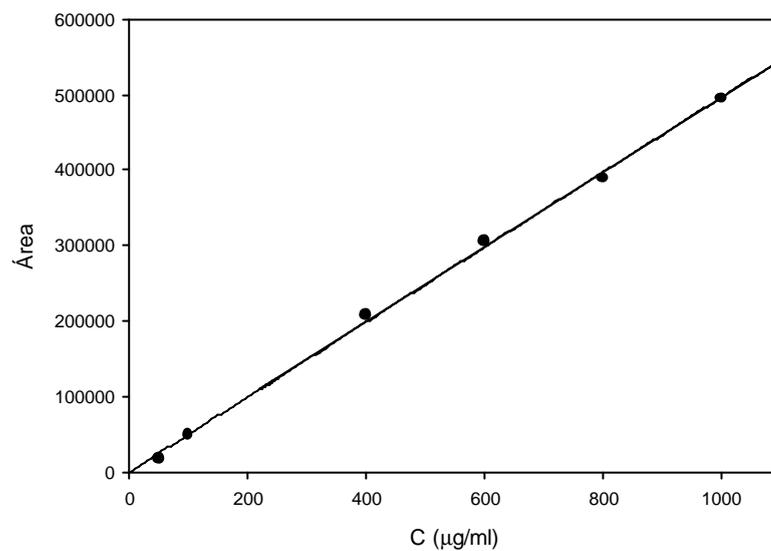


Figura 3.1 Representación gráfica de las áreas obtenidas en la lectura de los patrones preparados, frente a la concentración de **acamprotrato (C)**, expresada en µg/ml, de los diversos patrones preparados en **agua**. La recta trazada se obtuvo por regresión lineal de los puntos experimentales, pudiéndose observar una excelente linealidad del método analítico. La ecuación de ajuste a estos puntos es la siguiente:

$$\text{Área} = 330.5 + 496.3 C \quad (r > 0.999)$$

Los datos de exactitud y precisión intraensayo, obtenidos con las diferentes disoluciones patrón ensayadas quedan reflejadas en el *Cuadro 3.1*.

C_T	C_C	d.e.	C.V. (%)	n	% desviación
100	98.63	3.11	3.16	9	-1.37
200	199.37	4.16	2.09	9	-0.31
400	394.99	24.92	6.31	9	-1.25
600	601.96	25.04	4.16	9	0.33
800	795.89	41.94	5.27	9	-0.51

Cuadro 3.1 Ensayo de exactitud y precisión intraensayo del método de valoración de **acamprosato** en **agua** mediante **HPLC**. En la primera columna se representa la concentración teórica de acamprosato presente en los patrones empleados para llevar a cabo el ensayo (C_T), expresada en $\mu\text{g/ml}$. En la siguiente columna se indican los valores promedios de concentración de acamprosato (C_C), en $\mu\text{g/ml}$, calculados para un número de determinaciones igual a n , siendo d.e. la desviación estándar y C.V. el coeficiente de variación o desviación porcentual. En la última columna, se reseña la diferencia entre la concentración teórica y la concentración calculada de acamprosato en forma de porcentaje (% desviación)

3.1.2 Determinación de ^{14}C -acamprosato

a) Determinación de ^{14}C -acamprosato en plasma

En la *Figura 3.2* se representa, a modo de ejemplo, una recta de calibración obtenida tras la valoración mediante contaje de centelleo en fase líquida de distintas soluciones patrón de ^{14}C -acamprosato en plasma .

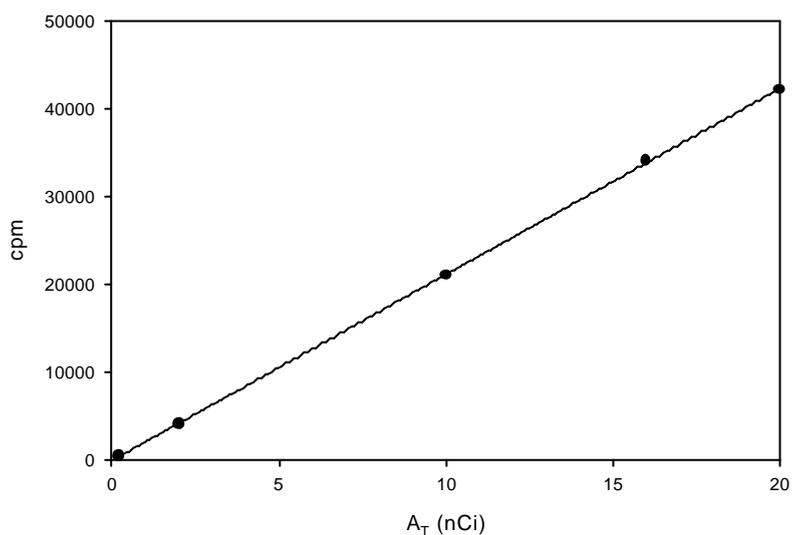


Figura 3.2 Representación gráfica de las Cpm obtenidas en la lectura de las soluciones patrón de ^{14}C -acamprosato preparados en plasma patrones, frente a la actividad teórica (A_T), expresada en nanocurios (nCi) en una de las rectas de calibrado. La recta trazada se obtuvo por regresión lineal de los puntos experimentales, pudiéndose observar la excelente linealidad del método analítico. La ecuación de la recta de regresión es:

$$\text{Cpm} = -67.57 + 2118.14 \cdot A_T \quad (r > 0.999)$$

Los datos de exactitud y precisión intraensayo, obtenidos con las diferentes disoluciones patrón ensayadas quedan reflejados en el *Cuadro 3.2*.

A_T	A_c	d.e.	C.V (%)	n	% desviación
20	19.63	0.54	2.75	9	-1.85
16	15.66	0.90	5.74	9	-2.12
10	9.95	0.42	4.22	9	-0.5
2	1.96	0.14	7.14	9	-2
0.2	0.20	0.006	3.18	9	0

Cuadro 3.2 Ensayo de exactitud y precisión intraensayo del método de valoración de ^{14}C -**acamprosato** en **plasma** por conteo de centelleo en fase líquida. En la columna encabezada por A_T , se representa la actividad teórica de acamprosato presente en los patrones empleados para llevar a cabo el ensayo, expresado en nCi. En la columna correspondiente a A_c , se indican los valores promedios de actividad de acamprosato, en nCi, calculados para un número de determinaciones igual a n , siendo d.e. la desviación estándar y C.V. el coeficiente de variación o desviación porcentual. En la última columna, se reseña la diferencia entre A_T y A_c en forma de porcentaje (% desviación)

b) Determinación de ^{14}C -acamprosato en agua

En la *Figura 3.3* se muestra una de las rectas de calibración obtenida tras la valoración mediante contaje de centelleo en fase líquida de distintas soluciones patrón de ^{14}C -acamprosato en agua

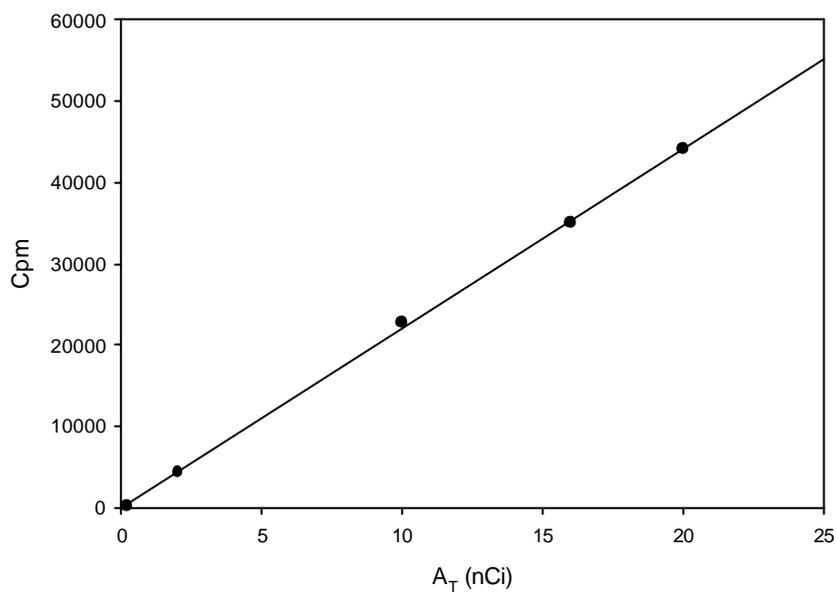


Figura 3.3 Representación gráfica de las Cpm obtenidas en la lectura de los patrones de ^{14}C -acamprosato preparados en agua, frente a la actividad teórica (A_T), expresada en nanocurios, en una de las rectas de calibrado. La recta trazada se obtuvo por regresión lineal de los puntos experimentales, pudiéndose observar la excelente linealidad del método analítico. La ecuación de la recta de regresión es:

$$\text{Cpm} = 59.7 + 2209.5 A_T \quad (r > 0.999)$$

Los datos de exactitud y precisión intraensayo, obtenidos con las diferentes disoluciones patrón ensayadas quedan reflejados en el *Cuadro 3.3*.

A_T	A_c	d.e.	C.V. (%)	n	% desviación
200	197.38	3.07	1.56	9	-1.31
160	154.44	3.98	2.58	9	-3.47
100	101.63	0.98	0.97	9	1.63
20	19.99	0.75	3.77	9	-0.05
2	1.98	0.08	4.19	9	-1.00

Cuadro 3.3 Ensayo de exactitud y precisión intraensayo del método de valoración de ^{14}C -**acamprosato** en **agua** por conteo de centelleo en fase líquida. En la columna encabezada por A_T , se representa la actividad teórica de acamprosato presente en los patrones empleados para llevar a cabo el ensayo, expresado en nCi. En la columna correspondiente a A_c , se indican los valores promedios de actividad de acamprosato, en nCi, calculados para un número de determinaciones igual a n, siendo d.e. la desviación estándar y C.V. el coeficiente de variación o desviación porcentual. En la última columna, se reseña la diferencia entre A_T y A_c en forma de porcentaje (% desviación)

c) Determinación de ^{14}C -acamprosato en líquido de lavado (ensayos in situ)

En la *Figura 3.4* se muestra una de las rectas de calibración obtenida tras la valoración mediante contaje de centelleo en fase líquida de distintas soluciones patrón de ^{14}C -acamprosato preparadas en **líquido de lavado**

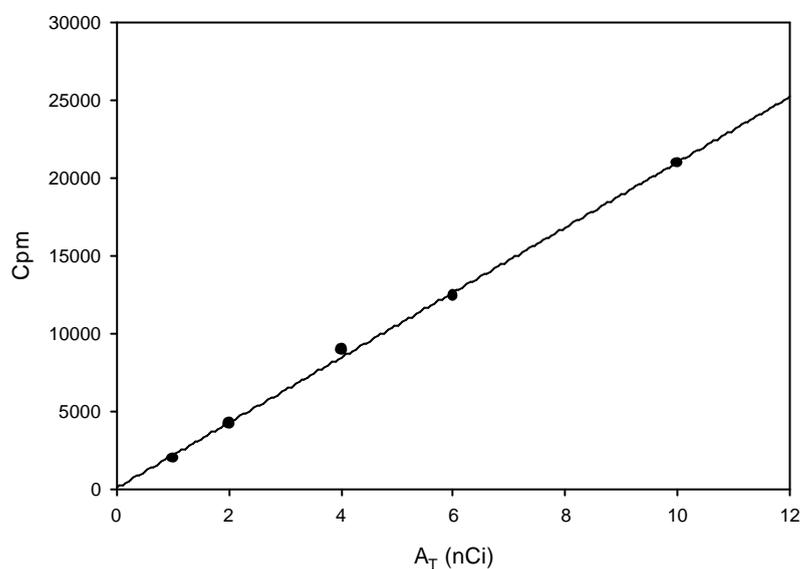


Figura 3.4 Representación gráfica de las Cpm obtenidas en la lectura de los patrones de ^{14}C -acamprosato preparados en **líquido de lavado (L.L.)**, frente a la actividad teórica (A_T), expresada en nanocurios, en una de las rectas de calibrado. La recta trazada se obtuvo por regresión lineal de los puntos experimentales, pudiéndose observar la excelente linealidad del método analítico. La ecuación de la recta de regresión es:

$$\text{Cpm} = 93.7 + 2090.2 \cdot A_T \quad (r > 0.999)$$

Los datos de exactitud y precisión intraensayo, obtenidos con las diferentes disoluciones patrón ensayadas quedan reflejados en el *Cuadro 3.4*.

A_T (nCi)	A_C (nCi)	d.e.	C.V. (%)	n	% desviación
180	182.56	1.79	0.98	9	1.42
160	163.96	6.64	4.05	9	2.47
140	140.10	2.13	1.52	9	0.07
100	101.87	3.30	3.24	9	1.87
60	57.41	3.20	5.58	9	-4.31

Cuadro 3.4 Ensayo de exactitud y precisión intraensayo del método de valoración de ^{14}C -**acamprosato en líquido de lavado (L.L.)** por conteo de centelleo en fase líquida. En la columna encabezada por A_T , se representa la actividad teórica de acamprosato presente en los patrones empleados para llevar a cabo el ensayo, expresado en nCi. En la columna correspondiente a A_C , se indican los valores promedios de actividad de acamprosato, en nCi, calculados para un número de determinaciones igual a n, siendo d.e. la desviación estándar y C.V. el coeficiente de variación o desviación porcentual. En la última columna, se reseña la diferencia entre A_T y A_C en forma de porcentaje (% desviación)

d) Determinación de ^{14}C -acamprosato en HBSS

En la *Figura 3.5* se representa, a modo de ejemplo, una de las rectas de calibración obtenida tras la valoración mediante contaje de centelleo en fase líquida de las distintas soluciones patrón de ^{14}C -acamprosato preparadas en HBSS.

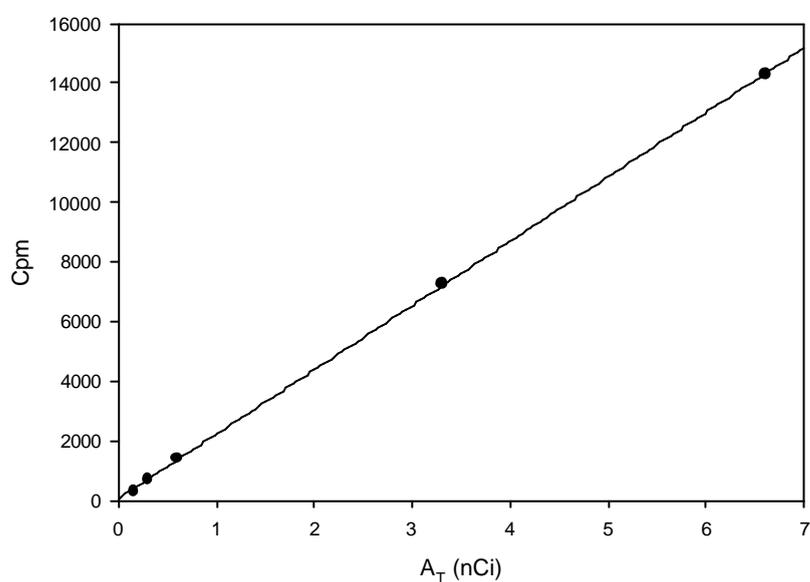


Figura 3.5 Representación gráfica de las Cpm obtenidas en la lectura de los patrones preparados, frente a la actividad teórica (A_T), expresada en nanocurios, de los diversos patrones de ^{14}C -acamprosato preparados en HBSS en una de las rectas de calibrado. La recta trazada se obtuvo por regresión lineal de los puntos experimentales, pudiéndose observar una excelente linealidad de la correlación. La ecuación de la recta de regresión es:

$$\text{Cpm} = 81.1 + 2156 \cdot A_T \quad (r > 0.999)$$

Los datos de exactitud y precisión intraensayo, obtenidos con las diferentes disoluciones patrón ensayadas quedan reflejados en el *Cuadro 3.5*.

A_T	A_C	d.e.	C.V (%)	n	% desviación
6.60	6.49	0.29	4.61	9	-1.66
3.30	3.35	0.10	3.18	9	1.51
0.66	0.70	0.02	2.70	9	6.06
0.33	0.31	0.02	6.31	9	-6.06
0.16	0.16	0.01	7.15	9	0.00

Cuadro 3.5 Ensayo de exactitud y precisión intraensayo del método de valoración de ^{14}C -**acamprosato** en **HBSS** por conteo de centelleo en fase líquida. En la columna encabezada por A_T , se representa la actividad teórica de acamprosato presente en los patrones empleados para llevar a cabo el ensayo, expresado en nCi. En la columna correspondiente a A_C , se indican los valores promedios de actividad de acamprosato, en nCi, calculados para un número de determinaciones igual a n, siendo d.e. la desviación estándar y C.V. el coeficiente de variación o desviación porcentual. En la última columna, se reseña la diferencia entre A_T y A_C en forma de porcentaje (% desviación).

3.1.3 Determinación de inulina

La determinación de inulina tanto en orina como en plasma, es un método validado con anterioridad por nuestro grupo investigador (GRANERO y cols., 1993), por lo cual, no se han realizado los correspondientes ensayos de precisión y exactitud. Sin embargo, se prepararon las correspondientes rectas patrón, tanto en agua como en plasma, para determinar las concentraciones de inulina en las muestras problema.

En las Figuras 3.6 y 3.7 se representan, dos ejemplos correspondientes a dos rectas de calibración obtenidas a partir de la medida de la absorbancia de las distintas soluciones patrón de **inulina** preparadas en **agua** y en **plasma** respectivamente.

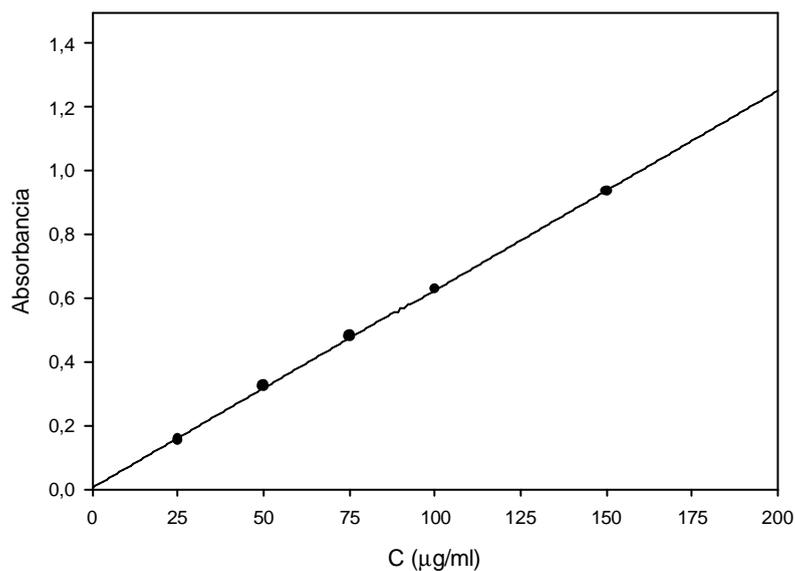


Figura 3.6 Representación gráfica de la absorbancia obtenida, frente a la concentración de inulina (C), expresada en µg/ml, de los diversos patrones de **inulina** preparados en **agua** en una de las rectas de calibrado. La recta trazada se obtuvo por regresión lineal de los puntos experimentales, pudiéndose observar una excelente linealidad del método analítico. La ecuación de la recta de regresión es:

$$\text{Absorbancia} = 0.0065 + 0.0062 \cdot C \quad (r > 0.999)$$

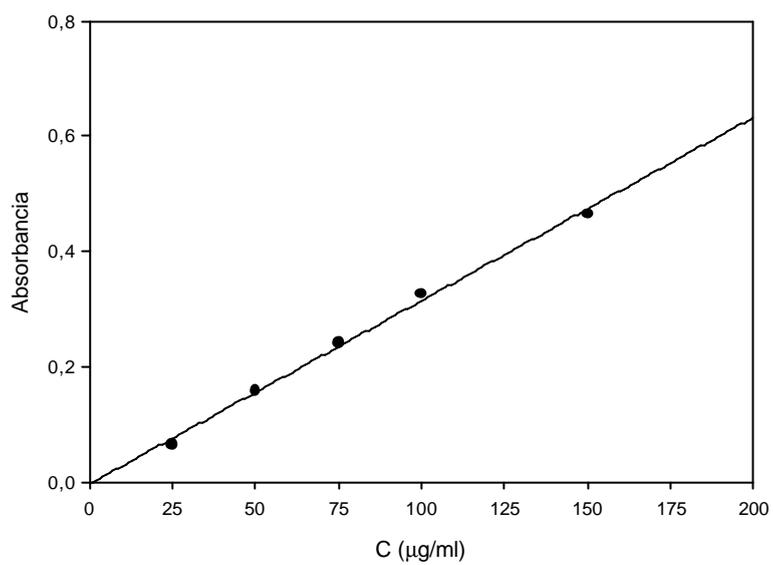


Figura 3.7 Representación gráfica de la absorbancia obtenida, frente a la concentración de inulina (C), expresada en $\mu\text{g/ml}$, de los diversos patrones de **inulina** preparados en **plasma** en una de las rectas de calibrado. La recta trazada se obtuvo por regresión lineal de los puntos experimentales, pudiéndose observar una excelente linealidad del método analítico. La ecuación de la recta de regresión es:

$$\text{Absorbancia} = -0.0027 + 0.0032 \cdot C \quad (r > 0.998)$$

3.1.4 Determinación de ^{14}C -manitol

En la *Figura 3.8* se representa una de las rectas de calibración obtenida mediante contejo de centelleo en fase líquida de las soluciones patrón de ^{14}C -manitol preparadas en HBSS

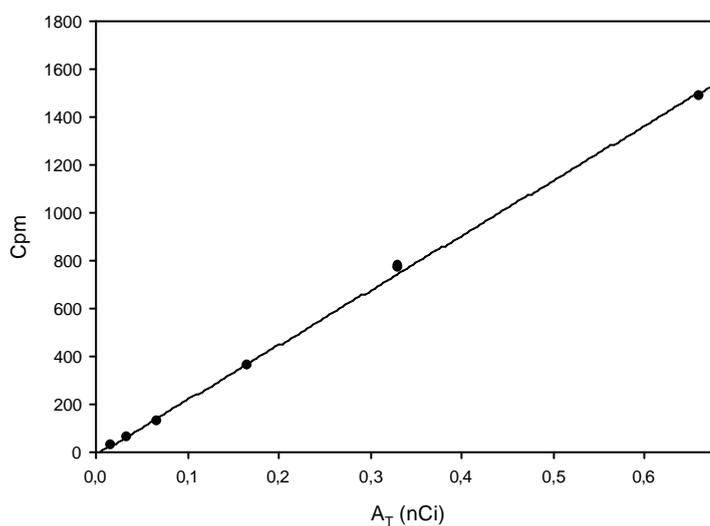


Figura 3.8 Representación gráfica de las Cpm obtenidas en la lectura de los patrones preparados, frente a la actividad teórica (A_T), expresada en nanocuries, de los diversos patrones de ^{14}C -manitol preparados en HBSS en una de las rectas de calibrado. La recta trazada se obtuvo por regresión lineal de los puntos experimentales, pudiéndose observar una excelente linealidad del método analítico. La ecuación de la recta de regresión es:

$$\text{Cpm} = -10.6 + 2293.8 \cdot A_T \quad (r > 0.999)$$

Los datos de exactitud y precisión intraensayo, obtenidos con las diferentes disoluciones patrón ensayadas quedan reflejados en el *Cuadro 3.6*.

A_T	A_C	d.e.	C.V (%)	n	% desviación
0.660	0.643	0.017	2.70	9	-2.57
0.330	0.319	0.015	4.76	9	-3.33
0.165	0.152	0.008	4.99	9	-7.87
0.066	0.069	0.004	5.61	9	4.54
0.033	0.031	0.002	6.72	9	-6.06
0.016	0.017	0.001	5.89	9	6.25

Cuadro 3.6 Ensayo de exactitud y precisión intraensayo del método de valoración de ^{14}C -manitol en HBSS por conteo de centelleo en fase líquida. En la columna encabezada por A_T , se representa la actividad teórica de acamprosato presente en los patrones empleados para llevar a cabo el ensayo, expresada en nCi. En la columna correspondiente a A_C , se indican los valores promedios de actividad de acamprosato, en nCi calculados para un número de determinaciones igual a n, siendo d.e la desviación estándar y C.V. el coeficiente de variación o desviación porcentual. En la última columna, se reseña la diferencia entre A_T y A_C en forma de porcentaje (% desviación).

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ELIMINACIÓN DEL ACAMPROSATO

El estudio de los mecanismos implicados en la eliminación del acamprosato se ha abordado mediante cuatro tipos de experiencias, las cuales se han realizado en el siguiente orden cronológico:

- Determinación de la fracción inalterada de acamprosato en orina tras administración intravenosa rápida.
- Obtención de las curvas de nivel plasmático tras la administración intravenosa rápida de tres dosis de acamprosato.
- Estimación de los aclaramientos total y renal del acamprosato en tres niveles estacionarios diferentes.
- Estudio de los efectos del probenecid sobre la farmacocinética del acamprosato.

3.2.1 Determinación de la fracción inalterada de acamprosato en orina tras administración intravenosa rápida

En el *Cuadro 3.7* se muestran los valores de porcentaje de dosis de acamprosato administrado que se ha eliminado de forma inalterada por vía renal tras la administración intravenosa de 22 mg del fármaco, durante los periodos de recogida establecidos, tal y como se indica en el *Epígrafe 2.3.1.3*. A tenor de los resultados obtenidos se puede observar que la práctica totalidad de la dosis administrada, $95.0 \pm 13.9 \%$, se recogió en la orina de los animales tratados durante las seis primeras horas tras su administración. Adicionalmente, también se puede apreciar la elevada velocidad del proceso de eliminación del acamprosato puesto que durante las 0-3 horas post-administración se recogió el $79.7 \pm 17.1 \%$ de la dosis de fármaco administrada y el $15.3 \pm 5.1 \%$ restante durante las tres horas posteriores.

Parámetro	Rata								Media \pm d.e.
	1	2	3	4	5	6	7	8	
U_0^3 (%)	75.5	59.0	73.1	61.4	87.5	95.3	76.5	109.7	79.7 \pm 17.1
U_3^6 (%)	15.6	22.9	9.7	20.6	11.8	17.2	16.0	8.2	15.3 \pm 5.1
U_0^6 (%)	91.1	81.9	82.8	82.0	99.3	112.5	92.4	118.0	95.0 \pm 13.9

Cuadro 3.7 Porcentajes, individuales y promedios, de dosis de acamprosato excretado de forma inalterada en orina obtenidos experimentalmente tras la administración, por vía **intravenosa**, de una dosis de **22 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del grupo **A-1**. Los periodos de recogida de muestra fueron de 0-3 horas (U_0^3) y 3-6 horas (U_3^6). Los porcentajes de dosis excretada se han corregido en función de la proporción de inulina recogida en cada uno de los intervalos experimentales. Junto a los valores promedio se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

3.2.2 Curvas de nivel plasmático tras la administración intravenosa rápida de tres dosis de acamprosato

3.2.2.1 Niveles plasmáticos

Los niveles plasmáticos de acamprosato obtenidos a los correspondientes tiempos de muestreo, en los animales de los grupos **B-1**, **B-2**, y **B-3** se agrupan en los *Cuadros 3.8* a *3.10*.

Junto con los valores individuales, se relacionan los valores promedio cuya representación gráfica se ilustra en las *Figuras 3.9* a *3.11*.

RATA						
Tiempo	1	2	3	4	5	Media \pm d.e.
2	28.19	23.21	24.26	30.14	33.12	28.08 \pm 3.75
5	18.91	17.23	16.63	21.27	21.17	19.53 \pm 2.27
10	12.63	13.10	14.11	13.58	13.41	13.74 \pm 1.03
15	9.12	8.88	10.18	9.68	9.07	9.77 \pm 1.06
20	6.55	6.47	6.48	6.60	6.41	6.82 \pm 0.79
40	2.29	1.70	1.69	2.52	2.35	2.33 \pm 0.63
60	0.89	0.85	0.70	0.97	0.86	0.91 \pm 0.16
80	0.45	0.45	0.35	0.52	0.47	0.48 \pm 0.10

Cuadro 3.8 Niveles plasmáticos individuales y promedios obtenidos experimentalmente tras la administración, por vía intravenosa, de una dosis de **2.8 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del **grupo B-1**. Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en $\mu\text{g/ml}$.

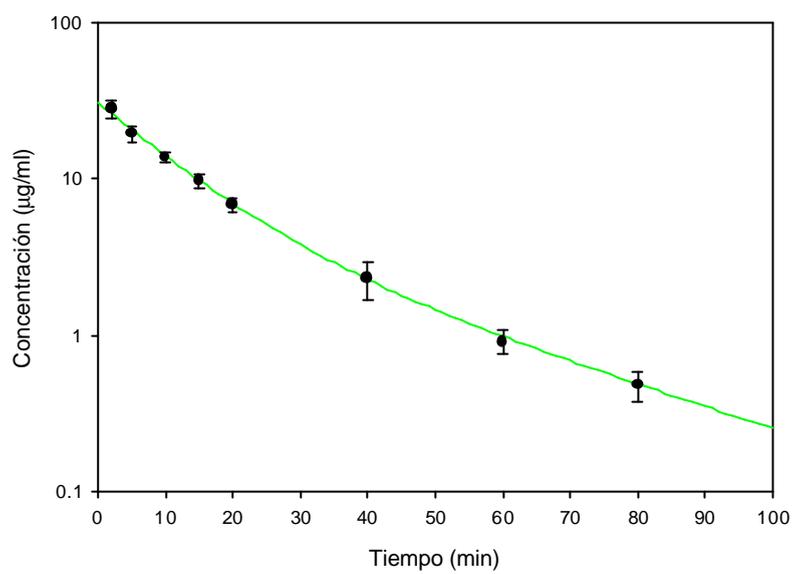


Figura 3.9 Curva de nivel plasmático promedio obtenida tras la administración, **por vía intravenosa**, de una dosis de **2.8 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del grupo **B-1**. En trazo continuo se han representado los niveles teóricos correspondientes al análisis de regresión no lineal de los datos plasmáticos promedio.

RATA							
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media \pm d.e.
2	121.57	109.16	143.07	130.99	123.04	134.03	126.98 \pm 11.72
5	83.54	77.53	94.41	82.98	82.30	100.27	86.84 \pm 8.61
10	57.26	47.18	61.72	63.60	43.75	60.75	55.71 \pm 8.27
15	40.03	33.19	41.72	45.69	33.39	40.85	39.14 \pm 4.93
20	28.26	28.22	29.35	33.71	24.25	27.39	28.53 \pm 3.08
40	9.84	10.07	11.10	10.38	7.88	9.90	9.86 \pm 1.07
60	3.96	4.09	3.84	3.93	3.95	3.63	3.90 \pm 0.15
80	2.17	2.15	1.92	2.12	2.40	2.14	2.15 \pm 0.15

Cuadro 3.9 Niveles plasmáticos individuales y promedios obtenidos experimentalmente tras la administración, por **vía intravenosa**, de una dosis de **11 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del **grupo B-2**. Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en $\mu\text{g/ml}$.

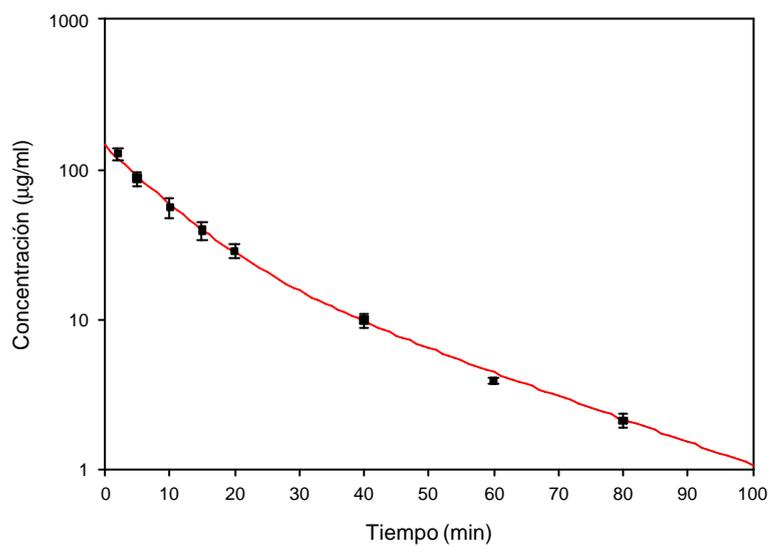


Figura 3.10 Curva de nivel plasmático promedio obtenida tras la administración, por **vía intravenosa**, de una dosis de **11 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del **grupo B-2**. En trazo continuo se ha representado los niveles teóricos obtenidos tras el análisis de regresión no lineal de los datos plasmáticos promedio.

RATA							
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media \pm d.e.
2	252.75	268.37	245.94	219.99	249.89	269.61	251.09 \pm 18.11
5	165.27	174.54	151.02	175.71	188.47	184.69	173.28 \pm 13.62
10	108.70	116.63	94.91	108.27	129.05	123.10	113.44 \pm 12.16
15	78.14	76.50	70.12	80.34	94.70	81.59	80.23 \pm 8.15
20	47.27	56.38	51.91	57.21	64.40	53.32	55.11 \pm 5.85
40	14.44	18.50	15.97	19.12	32.86	20.01	20.15 \pm 6.56
60	6.24	7.42	6.45	6.49	7.92	5.75	6.71 \pm 0.80
80	3.07	4.12	2.97	3.88	4.14	3.12	3.55 \pm 0.55

Cuadro 3.10 Niveles plasmáticos individuales y promedios obtenidos experimentalmente tras la administración, por **vía intravenosa**, de una dosis de **22 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del **grupo B-3**. Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en $\mu\text{g/ml}$.

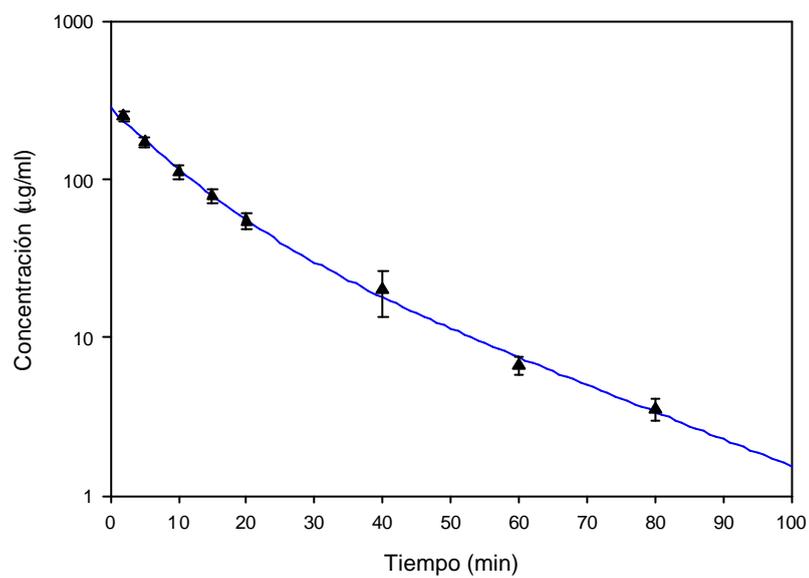


Figura 3.11 Curva de nivel plasmático promedio obtenida tras la administración, por **vía intravenosa**, de una dosis de **22 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del **grupo B-3**. En trazo continuo se han representado los niveles teóricos derivados del ajuste de regresión no lineal de los datos plasmáticos promedio.

168 Resultados

En la *Figura 3.12* (A) se representan las curvas de nivel plasmático promedio correspondientes a las dosis de 2.8, 11 y 22 mg de acamprosato. En el apartado (B) se representan los niveles plasmáticos promedio obtenidos en estos tres grupos experimentales, en la que los valores correspondientes a los **grupos B-2** y **B-3** han sido normalizados para la menor de las dosis ensayadas. Como se puede observar, los niveles plasmáticos normalizados se superponen, hecho que sugiere la existencia de un comportamiento lineal en la farmacocinética del acamprosato en el ámbito de dosis ensayadas.

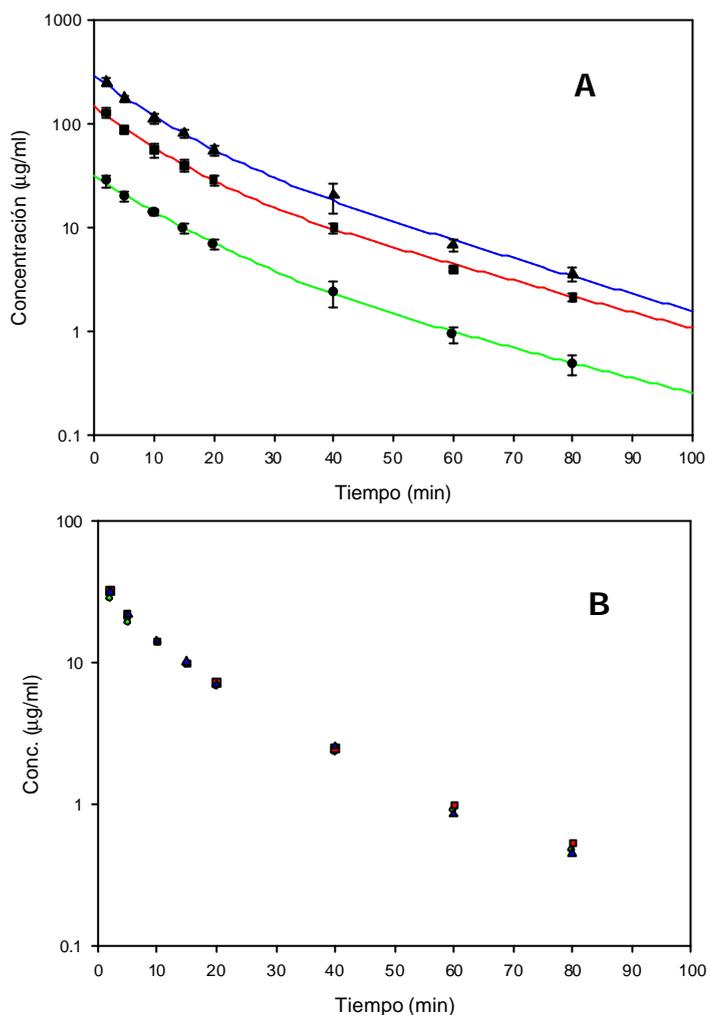


Figura 3.12 (A) Curvas de nivel plasmático promedias obtenidas para los **grupos B-1, B-2 y B-3** tras la administración de una dosis de **2.8** (trazo verde), **11** (trazo rojo) y **22** (trazo azul) **mg de acamprosato** respectivamente. En trazo continuo se han representado los niveles teóricos derivados del ajuste, mediante regresión no lineal, de la ecuación correspondiente al modelo bicompartimental a los datos plasmáticos promedio. **(B)** Representación gráfica de los niveles plasmáticos promedio obtenidos para los **grupos B-1, B-2 y B-3**, donde los valores correspondientes a los **grupos B-2 y B-3** han sido normalizados para la menor de las dosis ensayadas. Los signos y colores asignados a cada grupo experimental coinciden con los empleados en el apartado (A).

3.2.2.2 Elección del modelo farmacocinético

En los Cuadros siguientes (Cuadros 3.11 a 3.13), aparecen a modo de resumen los resultados obtenidos en la fase de selección del modelo farmacocinético para las curvas promedio obtenidas tras la administración intravenosa rápida de **2.8**, **11** y **22** mg de acamprosoato.

Todos los parámetros empleados para la selección del modelo farmacocinético, señalan al modelo bicompartimental como el óptimo para la descripción de los resultados obtenidos.

Grupo B-1 (2.8 mg acamprosoato)								
Modelo	r	s.c.	g.l.	Nº parám.	AIC	F.calc	F.teor	p
Mc	>0.9999	0.2426	6	2	-7.32	35.333	6.16	0.0020
Bc	>0.9999	0.0130	4	4	-26.73			

Cuadro 3.11 Resultado del ajuste de las ecuaciones representativas de los modelos estudiados (- **Mc**- Monocompartimental, -**Bc**- Bicompartimental) a los niveles plasmáticos promedio correspondientes a la administración de **2.8 mg de acamprosoato** por vía intravenosa rápida (**Grupo B-1**). En el Cuadro se indica el coeficiente de correlación obtenido entre los valores de concentración de fármaco experimentales y los predichos por el modelo (r), la suma de cuadrados (s.c.), los grados de libertad (g.l.) y número de parámetros del modelo estudiado (Nº parám.), el valor de AIC, así como los valores de *F de Snedecor* calculada, teórica y su correspondiente valor de probabilidad (p). Como factor de ponderación se ha utilizado siempre el inverso de la concentración plasmática al cuadrado.

Grupo B-2 (11 mg acamprosato)								
Modelo	r	s.c.	g.l.	Nº parám.	AIC	F.calc	F.teor	p
Mc	>0.9999	0.3067	6	2	-5.45	31.52	6.16	0.0025
Bc	>0.9999	0.0183	4	4	-24.02			

Cuadro 3.12 Resultado del ajuste de las ecuaciones representativas de los modelos estudiados (- **Mc**- Monocompartimental, -**Bc**- Bicompartimental) a los niveles plasmáticos promedio correspondientes a la administración de **11 mg de acamprosato** por vía intravenosa rápida (**Grupo B-2**). En el *Cuadro* se indica el coeficiente de correlación obtenido entre los valores de concentración de fármaco experimentales y los predichos por el modelo (*r*), la suma de cuadrados (*s.c.*), los grados de libertad (*g.l.*) y número de parámetros del modelo estudiado (*Nº parám.*), el valor de AIC, así como los valores de *F de Snedecor* calculada, teórica y su correspondiente valor de probabilidad (*p*). Como factor de ponderación se ha utilizado siempre el inverso de la concentración plasmática al cuadrado.

Grupo B-3 (22 mg acamprosato)								
Modelo	r	s.c.	g.l.	Nº parám.	AIC	F.calc	F.teor	p
Mc	>0.9999	0.2625	6	2	-6.69	13.26	6.16	0.0128
Bc	>0.9999	0.0344	4	4	-19.12			

Cuadro 3.13 Resultado del ajuste de las ecuaciones representativas de los modelos estudiados (- **Mc**- Monocompartimental, -**Bc**- Bicompartimental) a los niveles plasmáticos promedio correspondientes a la administración de **22 mg de acamprosato** por vía intravenosa rápida (**Grupo B-3**). En el *Cuadro* se indica el coeficiente de correlación obtenido entre los valores de concentración de fármaco experimentales y los predichos por el modelo (*r*), la suma de cuadrados (*s.c.*), los grados de libertad (*g.l.*) y número de parámetros del modelo estudiado (*Nº parám.*), el valor de AIC, así como los valores de *F de Snedecor* calculada, teórica y su correspondiente valor de probabilidad (*p*). Como factor de ponderación se ha utilizado siempre el inverso de la concentración plasmática al cuadrado.

3.2.2.3 Parámetros farmacocinéticos

En los Cuadros 3.14 a 3.19 se muestran los distintos parámetros farmacocinéticos individuales y promedios obtenidos para el acamprosato en los grupos experimentales **B-1**, **B-2** y **B-3**. Cada valor promedio va acompañado de su correspondiente desviación estándar (d.e.).

Parámetro	RATA					Media ± d.e.
	1	2	3	4	5	
C_0 (µg/ml)	31.75	25.79	35.59	32.19	38.89	32.84 ± 4.88
A_0 (µg/ml)	22.31	19.95	25.98	23.04	28.97	24.05 ± 3.49
a (min ⁻¹)	0.120	0.082	0.126	0.087	0.142	0.111 ± 0.029
B_0 (µg/ml)	9.44	5.84	9.61	9.15	9.92	8.79 ± 1.674
b (min ⁻¹)	0.039	0.033	0.037	0.034	0.039	0.036 ± 0.003
k_{12} (min ⁻¹)	0.0217	0.0095	0.0256	0.0116	0.0306	0.0200 ± 0.0090
k_{21} (min ⁻¹)	0.0630	0.0440	0.0611	0.0490	0.0651	0.0564 ± 0.0093
k_{10} (min ⁻¹)	0.0741	0.0610	0.0764	0.0603	0.0847	0.0713 ± 0.0105

Cuadro 3.14 Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios del acamprosato, calculados a partir de los ajustados del modelo bicompartimental a los valores experimentales expuestos en el Cuadro 3.8, correspondientes a la administración intravenosa rápida de **2.8 mg del fármaco**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

RATA						
Parámetro	1	2	3	4	5	Media \pm d.e.
AUC_0^∞ ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	441.64	401.87	476.04	544.17	475.10	467.76 \pm 52.40
Cl_r (ml/min)	6.34	6.96	5.88	5.14	5.89	6.04 \pm 0.67
$Vd_{(ss)}$ (ml)	118.71	134.74	113.77	108.29	107.84	116.67 \pm 11.04
$t_{1/2}$ (min)	17.77	21.00	18.73	20.38	17.77	19.13 \pm 1.49
MRT (min)	18.72	19.34	19.34	21.04	18.29	19.35 \pm 1.05
U_0^{24} (%)	100.00	88.52	-	85.50	95.38	92.35 \pm 6.56

Cuadro 3.15 Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios del acamprosato, calculados a partir de los valores experimentales expuestos en el *Cuadro 3.8*, correspondiente a la administración **intravenosa** de una dosis de **2.8 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del **grupo B-1**. Junto a los valores promedio se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

RATA							
Parámetro	1	2	3	4	5	6	Media \pm d.e.
C_0 ($\mu\text{g/ml}$)	136.76	134.64	172.09	142.54	144.95	160.71	148.62 \pm 14.72
A_0 ($\mu\text{g/ml}$)	108.80	85.91	115.70	94.63	119.90	133.60	109.76 \pm 17.35
a (min^{-1})	0.103	0.160	0.150	0.112	0.135	0.113	0.129 \pm 0.023
B_0 ($\mu\text{g/ml}$)	27.96	48.73	56.39	47.91	25.05	27.11	38.86 \pm 13.67
b (min^{-1})	0.032	0.040	0.043	0.040	0.030	0.032	0.036 \pm 0.005
k_{12} (min^{-1})	0.0180	0.0398	0.0323	0.0180	0.0326	0.0203	0.0268 \pm 0.0093
k_{21} (min^{-1})	0.0467	0.0834	0.0780	0.0642	0.0481	0.0457	0.0610 \pm 0.0168
k_{10} (min^{-1})	0.0710	0.0767	0.0826	0.0690	0.0840	0.0790	0.0771 \pm 0.0061

Cuadro 3.16 Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios del acamposato, calculados a partir de los ajustados del modelo bicompartimental a los valores experimentales expuestos en el Cuadro 3.9, correspondientes a la administración **intravenosa** rápida de **11 mg del fármaco**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.)

RATA							
Parámetro	1	2	3	4	5	6	Media ± d.e.
AUC_0^∞ ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	1947.9	1792.3	2119.6	2110.0	1789.3	2064.2	1970.6 ± 152.0
Cl_t (ml/min)	5.56	6.13	5.19	5.21	6.15	5.33	5.60 ± 0.44
$Vd_{(ss)}$ (ml)	110.67	125.11	92.14	99.17	130.57	102.21	109.98 ± 15.16
$t_{1/2}$ (min)	21.66	17.33	16.12	17.33	23.10	21.66	19.53 ± 2.94
MRT (min)	19.59	20.38	17.15	19.02	21.24	19.18	19.43 ± 1.39
U_0^{24} (%)	93.97	-	100.00	87.57	100.00	93.29	94.96 ± 5.22

Cuadro 3.17 Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios del acamprosato, calculados a partir de los valores experimentales expuestos en el Cuadro 3.9, correspondiente a la administración intravenosa de una dosis de **11 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del grupo B-2. Junto a los valores promedios de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

RATA							
Parámetro	1	2	3	4	5	6	Media ± d.e.
C_0 (µg/ml)	289.91	300.95	287.72	249.34	308.70	307.53	290.69 ± 22.06
A_0 (µg/ml)	243.80	243.30	191.70	210.20	135.90	242.40	211.22 ± 42.70
a (min ⁻¹)	0.114	0.110	0.140	0.087	0.180	0.110	0.123 ± 0.032
B_0 (µg/ml)	46.11	57.65	96.02	39.14	172.80	65.13	79.48 ± 49.81
b (min ⁻¹)	0.034	0.034	0.043	0.032	0.048	0.039	0.038 ± 0.006
k_{12} (min ⁻¹)	0.0181	0.0184	0.0277	0.0082	0.0352	0.0155	0.0205 ± 0.0095
k_{21} (min ⁻¹)	0.0466	0.0485	0.0753	0.0431	0.1218	0.0540	0.0649 ± 0.0301
k_{10} (min ⁻¹)	0.0827	0.0770	0.0798	0.0705	0.0708	0.0793	0.0767 ± 0.0050

Cuadro 3.18 Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios del acamprotrato, calculados a partir del ajustado del modelo bicompartimental a los valores experimentales expuestos en el *Cuadro 3.10*, correspondientes a la administración **intravenosa** rápida de **22 mg del fármaco**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.)

RATA							
Parámetro	1	2	3	4	5	6	Media ± d.e.
AUC_0^∞ ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	3572.0	3974.2	3647.4	3751.9	4467.6	3979.3	3898.8 ± 324.73
Cl_t (ml/min)	6.15	5.53	6.34	5.86	4.92	5.53	5.72 ± 0.51
$Vd_{(ss)}$ (ml)	102.04	103.49	107.66	117.39	97.21	94.66	103.74 ± 8.12
$t_{1/2}$ (min)	20.38	20.38	16.12	21.66	14.44	17.77	18.46 ± 2.82
MRT (min)	16.57	18.69	16.96	20.02	19.74	17.12	18.18 ± 1.50
U_0^{24} (%)	100.00	100.00	100.00	97.73	-	97.65	99.08 ± 1.27

Cuadro 3.19 Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios del acamprosato, calculados a partir de los valores experimentales expuestos en el Cuadro 3.10, correspondiente a la administración intravenosa de una dosis de **22 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del **grupo B-3**. Junto a los valores promedios de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

3.2.2.4 Análisis estadístico de los resultados

La comparación estadística de los principales parámetros farmacocinéticos calculados para los distintos grupos se reseñan en los Cuadros 3.20 y 3.21.

Como se puede apreciar, la disposición del acamprosato es lineal en el ámbito de dosis estudiadas. Los valores de AUC_0^∞ y de C_0 aumentan de forma lineal a medida que aumenta la dosis administrada (no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores normalizados en función de la dosis administrada). Adicionalmente, también se puede apreciar que el Cl_t medio determinado en cada uno de los grupos de ensayo no presentó diferencias significativas.

La comparación estadística de las microconstantes tampoco reveló ninguna diferencia significativa entre ellas (Cuadro 3.21).

En el Cuadro 3.20 también se resumen los porcentajes medios de dosis de acamprosato recogidos en la orina de los animales tratados. Como se puede apreciar, independientemente de la dosis de acamprosato administrada, el valor de U_0^{24} siempre se encuentra próximo al 100%.

Grupo	$t_{1/2}$ (min)	$Vd_{(ss)}$ (ml)	AUC_0^∞ * ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	Cl_t (ml/min)	U_0^{24} (%)
B-1	19.13 \pm 1.49	116.67 \pm 11.04	467.76 \pm 52.40	6.04 \pm 0.67	92.35 \pm 6.56
B-2	19.53 \pm 2.94	109.98 \pm 15.16	501.61 \pm 38.70	5.60 \pm 0.44	94.96 \pm 5.22
B-3	18.46 \pm 2.82	103.74 \pm 8.12	496.21 \pm 41.33	5.72 \pm 0.51	99.08 \pm 1.27
Signif.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Cuadro 3.20 Resultados del ANOVA realizado sobre los principales parámetros farmacocinéticos del acamprosato en la rata. (*) Los valores de AUC_0^∞ correspondientes a los **grupos B-2 y B-3** han sido normalizados para la menor de las dosis ensayadas.

Grupo	C_0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) *	k_{12} (min^{-1})	k_{21} (min^{-1})	k_{10} (min^{-1})	MRT (min)
B-1	32.84 \pm 4.88	0.0200 \pm 0.0090	0.0564 \pm 0.0093	0.0713 \pm 0.0105	19.35 \pm 1.05
B-2	37.83 \pm 3.75	0.0268 \pm 0.0093	0.0610 \pm 0.0168	0.0771 \pm 0.0061	19.43 \pm 1.39
B-3	37.00 \pm 2.81	0.0205 \pm 0.0095	0.0649 \pm 0.0301	0.0767 \pm 0.0050	18.18 \pm 1.50
Signif.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Cuadro 3.21 Resultados del ANOVA realizado sobre los valores obtenidos de C_0 , MRT y las microconstantes en la rata. (*) Los valores de C_0 correspondientes a los **grupos B-2 y B-3** han sido normalizados para la menor de las dosis ensayadas.

3.2.3 Estimación de los aclaramientos total y renal del acamprosato en estado estacionario

3.2.3.1 Parámetros farmacocinéticos

En los Cuadros 3.22 a 3.24 se muestran los distintos parámetros farmacocinéticos individuales y promedios obtenidos para el acamprosato tras la perfusión endovenosa del fármaco a las velocidades de 2.6, 132.5 y 530 $\mu\text{g}/\text{min}$ respectivamente. El valor promedio va acompañado de su desviación estándar (d.e.).

Acamprosato 2.6 $\mu\text{g}/\text{min}$							
	1	2	3	4	5	6	Media \pm d.e.
C_{ss} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.52	0.52	0.56	0.61	0.51	0.61	0.56 \pm 0.05
Cl_r (ml/min)	4.55	4.99	4.67	4.51	5.06	3.87	4.60 \pm 0.42
Cl_t (ml/min)	5.07	5.12	4.69	4.34	5.15	4.31	4.78 \pm 0.38
GFR (ml/min)	2.81	2.80	2.63	2.38	2.77	2.55	2.66 \pm 0.17
Cl_r/GFR	1.61	1.78	1.77	1.89	1.82	1.51	1.73 \pm 0.14

Cuadro 3.22 Parámetros individuales y promedio obtenidos en los ensayos realizados con los animales del grupo C-1, tras la perfusión endovenosa de acamprosato a la velocidad de 2.6 mg/min. C_{ss} indica la concentración plasmática media en estado estacionario, expresada en $\mu\text{g}/\text{ml}$; Cl_r y Cl_t representan los aclaramientos renal (corregido para la recogida de inulina) y aclaramiento total del acamprosato, expresados en ml/min. Adicionalmente, también se resumen los valores de velocidad de filtración glomerular (GFR) obtenidos en cada uno de los animales, expresado en ml/min, así como el cociente entre el aclaramiento renal del acamprosato y la GFR . Junto a los valores promedios de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

Acamprosato 132.5 $\mu\text{g}/\text{min}$							
	1	2	3	4	5	6	Media \pm d.e.
C_{ss} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	33.99	28.06	26.43	29.08	28.44	29.94	29.32 \pm 2.57
Cl_r (ml/min)	3.44	4.20	4.16	5.04	4.35	4.47	4.28 \pm 0.52
Cl_t (ml/min)	3.89	4.54	5.00	4.55	4.65	4.42	4.51 \pm 0.36
GFR (ml/min)	2.20	2.64	3.17	3.01	2.60	2.48	2.68 \pm 0.35
Cl_r/GFR	1.56	1.59	1.31	1.76	1.67	1.80	1.61 \pm 0.17

Cuadro 3.23 Parámetros individuales y promedio obtenidos en los ensayos realizados con los animales del **grupo C-2**, tras la **perfusión endovenosa de acamprosato** a la velocidad de **132.5 mg/min**. C_{ss} indica la concentración plasmática media en estado estacionario, expresada en $\mu\text{g}/\text{ml}$; Cl_r y Cl_t representan los aclaramientos renal (corregido para la recogida de inulina) y aclaramiento total del acamprosato, expresados en ml/min. Adicionalmente, también se resumen los valores de velocidad de filtración glomerular (GFR) obtenidos en cada uno de los animales, expresado en ml/min, así como el cociente entre el aclaramiento renal del acamprosato y la GFR . Junto a los valores promedios de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

Acamprosato 530 $\mu\text{g}/\text{min}$							
	1	2	3	4	5	6	Media \pm d.e.
C_{ss} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	103.43	127.65	146.18	135.58	113.45	137.77	127.30 \pm 16.10
Cl_r (ml/min)	5.23	3.69	3.61	4.12	4.40	3.41	4.08 \pm 0.67
Cl_t (ml/min)	5.10	4.14	3.62	3.90	4.67	3.84	4.21 \pm 0.56
GFR (ml/min)	2.98	2.43	2.39	2.43	2.46	2.28	2.50 \pm 0.25
Cl_r/GFR	1.75	1.51	1.51	1.69	1.78	1.49	1.62 \pm 0.13

Cuadro 3.24 Parámetros individuales y promedio obtenidos en los ensayos realizados con los animales del **grupo C-3**, tras la **perfusión endovenosa de acamprosato** a la velocidad de **530 mg/min**. C_{ss} indica la concentración plasmática media en estado estacionario, expresada en $\mu\text{g}/\text{ml}$; Cl_r y Cl_t representan los aclaramientos renal (corregido para la recogida de inulina) y aclaramiento total del acamprosato, expresados en ml/min. Adicionalmente, también se resumen los valores de velocidad de filtración glomerular (GFR) obtenidos en cada uno de los animales, expresado en ml/min, así como el cociente entre el aclaramiento renal del acamprosato y la GFR . Junto a los valores promedios de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

3.2.3.2 Análisis estadístico de los resultados

En el *Cuadro 3.25* se resumen los parámetros farmacocinéticos promedios del acamprosato, junto a su desviación estándar, obtenidos tras la perfusión endovenosa del mismo a las velocidades de 2.6, 132.5 y 530 $\mu\text{g}/\text{min}$.

Los resultados presentados muestran que las concentraciones plasmáticas de acamprosato en el estado estacionario (C_{ss}) aumentaron de un modo lineal en función de la velocidad de infusión del fármaco. En consecuencia, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el Cl_r y Cl_t del acamprosato determinado a las tres velocidades de perfusión estudiadas.

En los tres grupos experimentales, el valor del Cl_r de acamprosato calculado es claramente superior al de la velocidad de filtración glomerular (GFR), (el cociente Cl_r/GFR siempre es mayor que 1) y prácticamente igual al valor de Cl_t (en promedio, el Cl_r es un 96% del Cl_t).

	Velocidad de perfusión de acamprosato			Significc.
	2.6 mg/min	132.5 mg/min	530.0 mg/min	
C_{ss}^* ($\mu\text{g/ml}$)	0.56 \pm 0.05	0.58 \pm 0.05	0.62 \pm 0.07	n.s.
Cl_r (ml/min)	4.60 \pm 0.42	4.28 \pm 0.52	4.08 \pm 0.67	n.s.
Cl_t (ml/min)	4.78 \pm 0.38	4.51 \pm 0.36	4.21 \pm 0.56	n.s.
GFR (ml/min)	2.66 \pm 0.17	2.68 \pm 0.35	2.50 \pm 0.25	n.s.
Cl_r/GFR	1.73 \pm 0.14	1.61 \pm 0.17	1.62 \pm 0.13	n.s.

Cuadro 3.25 Parámetros individuales y promedio obtenidos en los ensayos realizados con los animales de los grupos **C-1**, **C-2** y **C-3** tras la perfusión endovenosa de acamprosato a la velocidad de **2.6**, **132.5** y **530 mg/min**. C_{ss} indica la concentración plasmática media en estado estacionario, expresada en $\mu\text{g/ml}$; Cl_r y Cl_t representan los aclaramientos renal (corregido para la recogida de inulina) y aclaramiento total del acamprosato, expresado en ml/min. Adicionalmente, también se resumen los valores de velocidad de filtración glomerular (GFR) obtenidos en cada uno de los animales, expresado en ml/min, así como el cociente entre el aclaramiento renal del acamprosato y la GFR . Significc. indica el resultado del ANOVA realizado sobre los parámetros farmacocinéticos del acamprosato obtenidos en la rata. (*) Los valores de C_{ss} correspondientes a las velocidades de perfusión 132.5 y 530 $\mu\text{g/min}$ han sido normalizados para la menor de las velocidades de perfusión ensayadas. Junto a los valores promedios de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

3.2.4 Estudio del efecto del probenecid sobre la farmacocinética del acamprosato

3.2.4.1 Niveles plasmáticos

Los niveles plasmáticos de acamprosato obtenidos a los correspondientes tiempos de muestreo, en los animales de los **grupos D-1** y **D-2** se resumen en los *Cuadros 3.26* y *3.27*.

Junto con los valores individuales, se relacionan los valores promedios cuya representación gráfica se ilustra en las *Figuras 3.13* y *3.14*.

RATA							
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media \pm d.e.
2	37.15	38.35	39.92	40.30	33.67	35.35	37.45 \pm 2.60
5	28.01	28.29	28.43	30.52	26.93	25.73	27.99 \pm 1.61
10	20.73	21.19	21.57	21.67	21.56	19.90	21.10 \pm 0.68
15	15.72	17.90	15.85	17.85	14.96	15.04	16.22 \pm 1.33
20	12.83	14.35	13.13	13.61	12.86	10.43	12.86 \pm 1.32
40	5.60	6.28	8.07	6.48	6.52	4.93	6.31 \pm 0.96
60	2.39	2.63	3.17	2.35	2.49	2.14	2.53 \pm 0.35
80	1.22	1.25	1.53	1.29	1.14	1.13	1.26 \pm 0.15

Cuadro 3.26 Niveles plasmáticos individuales y promedios de acamprosato obtenidos experimentalmente tras la administración, por vía intravenosa, de una dosis de **10 mg de probenecid** y **2.8 mg de acamprosato**, ambas en solución acuosa, a los animales del **grupo D-1**. Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en $\mu\text{g/ml}$.

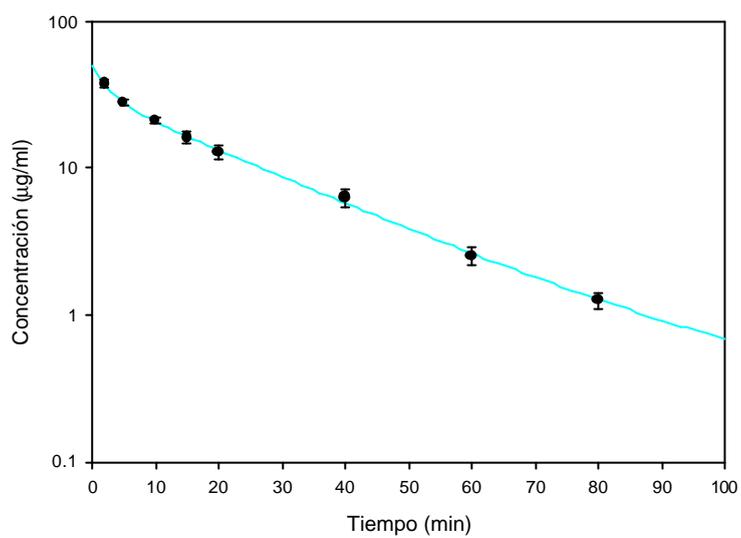


Figura 3.13 Curva de nivel plasmático promedio obtenida tras la administración por vía intravenosa de 2.8 mg de acamprosato en los animales del **grupo D-1 (10 mg de probenecid)**. En trazo continuo se han representado los niveles teóricos derivados del análisis de regresión no lineal de los datos plasmáticos promedio.

RATA							
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media \pm d.e.
2	44.11	43.24	44.70	44.91	40.88	40.13	43.00 \pm 2.03
5	31.84	32.95	33.02	32.35	32.84	27.61	31.77 \pm 2.06
10	24.92	25.22	24.89	26.58	25.20	20.91	24.62 \pm 1.92
15	19.82	20.04	21.09	21.13	17.76	18.82	19.78 \pm 1.31
20	15.70	16.90	15.87	16.13	15.77	15.28	15.94 \pm 0.54
40	8.84	11.92	7.36	9.50	7.72	8.59	8.99 \pm 1.63
60	3.45	4.12	3.99	4.69	4.01	4.09	4.06 \pm 0.40
80	1.92	2.19	1.95	2.60	2.14	2.39	2.20 \pm 0.26

Cuadro 3.27 Niveles plasmáticos individuales y promedios de acamprosato obtenidos experimentalmente tras la administración, por vía intravenosa, de una dosis de **20 mg de probenecid** y **2.8 mg de acamprosato**, ambas en solución acuosa, a los animales del **grupo D-2**. Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en $\mu\text{g/ml}$.

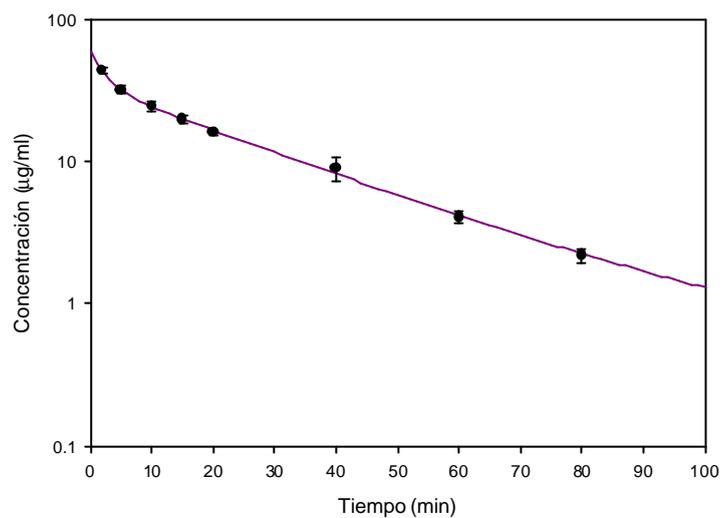


Figura 3.14 Curva de nivel plasmático promedio obtenida tras la administración por vía intravenosa de 2.8 mg de acamprosato en los animales del **grupo D-2 (20 mg de probenecid)**. En trazo continuo se han representado los niveles teóricos obtenidos del análisis de regresión no lineal de los datos plasmáticos promedio.

En la *Figura 3.15* se representa la curva de nivel plasmático obtenida tras administración de una dosis de **2.8 mg de acamprosato** (trazo verde) junto a las obtenidas tras la administración de la misma dosis de acamprosato pero tras un tratamiento previo con una dosis de **10** (trazo azul celeste) ó **20** (trazo fucsia) **mg de probenecid**. Se aprecia claramente como los niveles plasmáticos del fármaco aumentan progresivamente al aumentar la dosis de probenecid administrada.

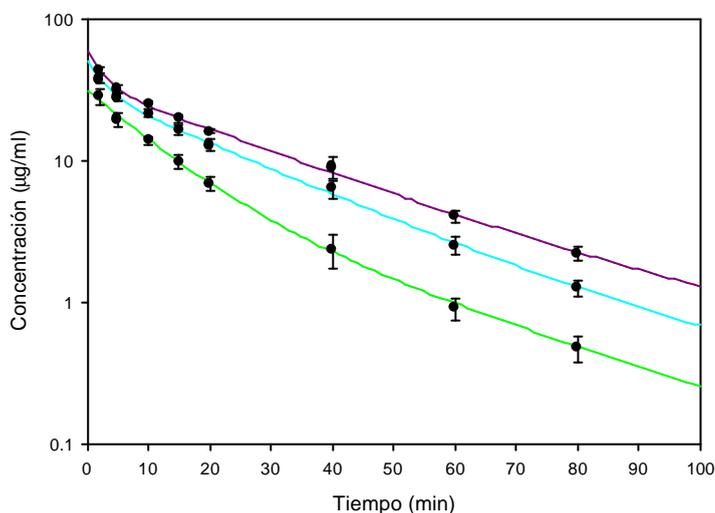


Figura 3.15 Curvas de nivel plasmático promedias obtenidas para los **grupos B-1, D-1 y D-2**, cuyas administraciones fueron de 2.8 mg de acamprosato (trazo verde), 10 mg de probenecid y 2.8 mg de acamprosato (trazo azul celeste) y 20 mg de probenecid y 2.8 mg de acamprosato (trazo fucsia) respectivamente. En trazo continuo se han representado los niveles teóricos obtenidos del análisis de regresión no lineal de los datos plasmáticos promedio.

3.2.4.2 Elección del modelo farmacocinético

En los *Cuadros 3.28 y 3.29* aparecen a modo de resumen los resultados obtenidos en la fase de selección del modelo farmacocinético para las curvas promedio obtenidas para los grupos experimentales **D-1** y **D-2**.

Merced al análisis realizado, todos los parámetros empleados indican que el modelo que mejor ajusta a los datos experimentales es el bicompartimental.

Grupo D-1 (10 mg probenecid)								
Modelo	r	s.c.	g.l.	Nº parám.	AIC	F.calc	F.teor	p
Mc	>0.9999	0.0680	6	2	-17.45			
						11.87	6.16	0.0157
Bc	>0.9999	0.0098	4	4	-29.00			

Cuadro 3.28 Resultado del ajuste de las ecuaciones representativas de los modelos estudiados (- **Mc**- Monocompartimental, -**Bc**- Bicompartimental) a los niveles plasmáticos promedio correspondientes a la administración de una dosis de **10 mg de probenecid** y **2.8 mg de acamprosato** por vía intravenosa rápida (**Grupo D-1**). En el *Cuadro* se indica el coeficiente de correlación obtenido entre los valores experimentales de concentración de fármaco y los predichos por el modelo (r), la suma de cuadrados (s.c.), los grados de libertad (g.l.) y número de parámetros del modelo estudiado (Nº de parám.), el valor de AIC, así como los valores de *F de Snedecor* calculada, teórica y su correspondiente valor de probabilidad (p). Como factor de ponderación se ha utilizado siempre el inverso de la concentración plasmática al cuadrado.

Grupo D-2 (20 mg probenecid)								
Modelo	r	s.c.	g.l.	Nº parám.	AIC	F.calc	F.teor	P
Mc	>0.9999	0.0730	6	2	-16.92			
						13.86	6.16	0.0118
Bc	>0.9999	0.0092	4	4	-29.49			

Cuadro 3.29 Resultado del ajuste de las ecuaciones representativas de los modelos estudiados (- **Mc** - Monocompartimental, - **Bc** - Bicompartimental) a los niveles plasmáticos promedio correspondientes a la administración de una dosis de **20 mg de probenecid** y **2.8 mg de acamprosato** por vía intravenosa rápida (**Grupo D-2**). En el *Cuadro* se indica el coeficiente de correlación obtenido entre los valores experimentales de concentración de fármaco y los predichos por el modelo (r), la suma de cuadrados (s.c.), los grados de libertad (g.l.) y número de parámetros del modelo estudiado (Nº de parám.), el valor de AIC, así como los valores de *F de Snedecor* calculada, teórica y su correspondiente valor de probabilidad (p). Como factor de ponderación se ha utilizado siempre la inversa de la concentración plasmática al cuadrado.

3.2.4.3 Parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio (acompañados de su desviación estándar) del acamprosato obtenidos en el **grupo D-1**, se reseñan en los Cuadros 3.30 y 3.31.

Parámetro	RATA						Media \pm d.e.
	1	2	3	4	5	6	
C_0 ($\mu\text{g/ml}$)	20.79	56.46	54.96	50.76	40.64	40.19	43.97 \pm 13.31
A_0 ($\mu\text{g/ml}$)	17.82	24.10	26.44	19.74	11.48	21.67	20.21 \pm 5.26
a (min^{-1})	0.177	0.517	0.341	0.264	0.256	0.123	0.280 \pm 0.139
B_0 ($\mu\text{g/ml}$)	25.97	32.36	28.52	31.02	29.16	18.52	27.59 \pm 4.95
b (min^{-1})	0.038	0.041	0.036	0.041	0.040	0.035	0.039 \pm 0.003
k_{12} (min^{-1})	0.0387	0.1766	0.1194	0.0666	0.0485	0.0255	0.0792 \pm 0.0578
k_{21} (min^{-1})	0.1205	0.3138	0.1941	0.1773	0.1951	0.0756	0.1794 \pm 0.0810
k_{10} (min^{-1})	0.0558	0.0675	0.0631	0.0610	0.0525	0.0570	0.0595 \pm 0.0054

Cuadro 3.30 Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios del acamprosato, calculados a partir de los ajustados del modelo bicompartimental a los valores experimentales expuestos en el *Cuadro 3.26*, correspondientes a la administración intravenosa rápida de **2.8 mg de acamprosato y 10 mg de probenecid** en los animales del **grupo D-1 (10 mg de probenecid)**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.)

RATA							
Parámetro	1	2	3	4	5	6	Media ± d.e.
AUC_0^∞ ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	782.37	834.76	880.23	851.63	777.73	713.49	806.70 ± 60.55
Cl_t (ml/min)	3.58	3.35	3.18	3.29	3.60	3.92	3.49 ± 0.27
$Vd_{(ss)}$ (ml)	85.55	79.35	81.38	80.14	85.65	93.43	84.25 ± 5.24
$t_{1/2}$ (min)	18.24	16.90	19.25	16.90	17.33	19.80	18.07 ± 1.24
MRT (min)	23.90	23.65	25.58	24.37	23.79	23.8	24.18 ± 0.73
U_0^{24} (%)	96.52	98.49	89.79	100.00	99.86	97.36	97.00 ± 3.80

Cuadro 3.31 Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios del acamprosato, calculados a partir de los valores experimentales expuestos en el *Cuadro 3.26*, correspondiente a la administración intravenosa de 2.8 mg de acamprosato a los animales del **grupo D-1 (10 mg de probenecid)**. Junto a los valores promedios de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

En los Cuadros 3.32 y 3.33 quedan expuestos los parámetros farmacocinéticos individuales y promedios del acamprosato cuando se administraron **20 mg de probenecid** y **2.8 mg de acamprosato (grupo D-2)**. El valor medio va acompañado de su correspondiente desviación estándar (d.e.).

RATA							
Parámetro	1	2	3	4	5	6	Media ± d.e.
C_0 (µg/ml)	60.78	59.14	51.28	55.49	48.59	66.69	57.00 ± 6.61
A_0 (µg/ml)	26.66	23.90	21.37	23.43	21.36	37.46	25.70 ± 6.09
a (min ⁻¹)	0.390	0.410	0.170	0.257	0.160	0.540	0.321 ± 0.151
B_0 (µg/ml)	34.12	35.24	29.91	32.06	27.23	29.23	31.30 ± 3.06
b (min ⁻¹)	0.037	0.035	0.034	0.031	0.032	0.032	0.034 ± 0.002
k_{12} (min ⁻¹)	0.1304	0.1310	0.0396	0.0772	0.0389	0.2494	0.1111 ± 0.0792
k_{21} (min ⁻¹)	0.2351	0.2584	0.1133	0.1618	0.1037	0.2546	0.1878 ± 0.0707
k_{10} (min ⁻¹)	0.0613	0.0550	0.0510	0.0493	0.0493	0.0678	0.0556 ± 0.0075

Cuadro 3.32 Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios del acamprosato, calculados a partir de los ajustados del modelo bicompartimental a los valores experimentales expuestos en el Cuadro 3.27, correspondientes a la administración intravenosa rápida de 2.8 mg de acamprosato a los animales del **grupo D-2 (20 mg de probenecid)**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.)

RATA							
Parámetro	1	2	3	4	5	6	Media ± d.e.
AUC_0^∞ ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	1023.60	1120.28	1008.10	1119.22	998.85	1002.93	1045.50 ± 58.13
Cl_t (ml/min)	2.74	2.50	2.78	2.50	2.80	2.79	2.68 ± 0.14
$Vd_{(ss)}$ (ml)	74.87	71.35	72.00	74.97	78.78	87.69	76.61 ± 6.04
$t_{1/2}$ (min)	18.73	19.80	20.38	22.35	21.66	21.66	20.76 ± 1.37
MRT (min)	27.37	28.54	25.92	29.96	28.1	31.41	28.55 ± 1.93
U_0^{24} (%)	92.22	100.00	96.02	98.37	-	95.47	96.40 ± 2.98

Cuadro 3.33 Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios del acamprosato, calculados a partir de los valores experimentales expuestos en el *Cuadro 3.27*, correspondiente a la administración intravenosa de 2.8 mg de acamprosato en los animales del **grupo D-2 (20 mg de probenecid)**. Junto a los valores promedios de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

3.2.4.4 Análisis estadístico de los resultados

En los Cuadros 3.34 y 3.35 se muestran los resultados del análisis estadístico aplicado a los principales parámetros farmacocinéticos correspondientes a los grupos **B-1**, **D-1** y **D-2**. Como se puede observar, el valor medio de AUC_0^∞ aumentó significativamente ($P < 0.001$) con el aumento de la dosis de probenecid administrada. El valor medio de AUC_0^∞ creció hasta un 172% para la dosis de 10 mg de probenecid y hasta un 223% para la dosis de 20 mg de probenecid, con respecto al obtenido en los animales no tratados con probenecid.

Por otra parte, el valor medio de Cl_t disminuyó significativamente ($p < 0.001$) desde 6.04 ± 0.67 ml/min para el grupo no tratado con probenecid hasta 3.49 ± 0.27 ó 2.68 ± 0.14 ml/min para los grupos que recibieron 10 ó 20 mg de probenecid, respectivamente.

Del mismo modo, los valores de MRT sufrieron un incremento significativo como consecuencia de la presencia de probenecid en el plasma de los animales tratados. Adicionalmente, los resultados obtenidos demuestran que el probenecid disminuye de un modo significativo ($P < 0.015$) la constante de eliminación del acamprosato (k_{10}).

Finalmente se puede observar que la totalidad de la dosis administrada ($\cong 97\%$) se recoge en la orina de los animales tratados, independientemente de que se administre el acamprosato junto con el probenecid.

Grupo	$t_{1/2}$ (min)	$Vd_{(ss)}$ (ml)	AUC_0^∞ ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	Cl_t (ml/min)	U_0^{24} (%)
B-1	19.13 \pm 1.49 ^{ab}	116.67 \pm 11.04 ^a	467.76 \pm 52.40 ^a	6.04 \pm 0.67 ^a	92.35 \pm 6.56
D-1	18.07 \pm 1.24 ^a	84.25 \pm 5.24 ^b	806.70 \pm 60.55 ^b	3.49 \pm 0.27 ^b	97.00 \pm 3.80
D-2	20.76 \pm 1.37 ^b	76.61 \pm 6.04 ^b	1045.50 \pm 58.13 ^c	2.68 \pm 0.14 ^c	96.40 \pm 2.98
Signif.	P=0.013	P<0.001	P<0.001	P<0.001	n.s.

Cuadro 3.34 Resultados del análisis estadístico realizado sobre los principales parámetros farmacocinéticos del acamprosoato en la rata en presencia (**grupos D-1 y D-2**) o ausencia (**grupo B-1**) de probenecid. Con diferente superíndice se señalan los parámetros que mostraron diferencias significativas en la prueba de Tukey.

Grupo	C_0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	k_{12} (min^{-1})	k_{21} (min^{-1})	k_{10} (min^{-1})	MRT (min)
B-1	32.84 \pm 4.88 ^a	0.0200 \pm 0.0090	0.0564 \pm 0.0093	0.0713 \pm 0.0105 ^a	19.35 \pm 1.05 ^a
D-1	43.97 \pm 13.31 ^{ab}	0.0792 \pm 0.0578	0.1794 \pm 0.0810	0.0595 \pm 0.0054 ^b	24.18 \pm 0.73 ^b
D-2	57.00 \pm 6.61 ^b	0.1111 \pm 0.0792	0.1878 \pm 0.0707	0.0556 \pm 0.0075 ^b	28.55 \pm 1.93 ^c
Signif	P=0.003	n.s.	P=0.008	P=0.015	P<0.001

Cuadro 3.35 Resultados del análisis estadístico (ANOVA) realizado sobre el C_0 , MRT y las microconstantes del acamprosoato en la rata en presencia (**grupos D-1 y D-2**) o ausencia (**grupo B-1**) de probenecid. Con el diferente superíndice se señalan los parámetros que mostraron diferencias significativas en la prueba de comparación múltiple de Tukey.

3.3 ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE ACAMPROSATO

El estudio de la absorción intestinal de acamprosato se ha abordado mediante tres tipos de experiencias diferentes, cuyos resultados se resumen a continuación:

- Administración por vía oral de acamprosato. Cálculo de su biodisponibilidad en magnitud.
- Estudio topográfico de la absorción intestinal de acamprosato.
- Ensayos para la promoción de la absorción intestinal del acamprosato.

3.3.1 Administración por vía oral del acamprosato. Cálculo de su biodisponibilidad en magnitud

3.3.1.1 Niveles plasmáticos

Los niveles plasmáticos de acamprosato obtenidos a los correspondientes tiempos de muestreo, en los animales de los **grupos E-1** y **E-2** se agrupan en los *Cuadros 3.36* y *3.37*.

Junto con los valores individuales, se relacionan los valores promedio y su desviación estándar (d.e.) cuya representación gráfica se ilustra en las *Figuras 3.16* y *3.17*.

RATA							
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media \pm d.e.
5	0.259	0.370	0.243	0.481	0.543	0.525	0.404 \pm 0.134
10	0.414	0.614	0.334	0.614	0.623	0.632	0.539 \pm 0.130
20	0.668	0.686	0.624	0.697	0.637	0.857	0.695 \pm 0.084
30	0.739	0.790	0.735	0.697	0.650	0.767	0.730 \pm 0.050
40	0.726	0.734	0.702	0.664	0.635	0.707	0.695 \pm 0.038
60	0.652	0.596	0.595	0.679	0.569	0.617	0.618 \pm 0.041
80	0.460	0.546	0.508	0.539	-	0.568	0.524 \pm 0.042
100	0.483	0.462	0.530	0.476	0.486	0.489	0.488 \pm 0.023
120	0.447	0.453	0.427	0.412	0.458	0.424	0.437 \pm 0.018

Cuadro 3.36 Niveles plasmáticos individuales y promedios obtenidos experimentalmente tras la administración, por vía **oral**, de una dosis de **2.8 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del **grupo E-1**. Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en $\mu\text{g/ml}$.

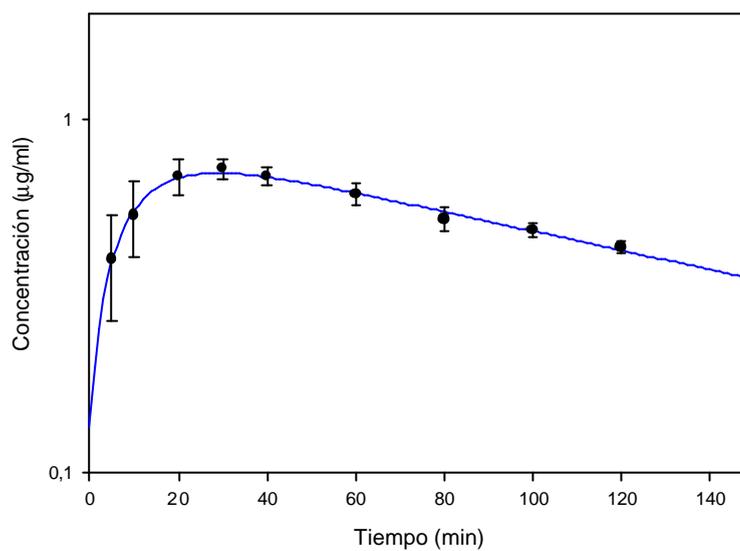


Figura 3.16 Curva de nivel plasmático promedio obtenida tras la administración, por vía **oral**, de una dosis de **2.8 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del **grupo E-1**. En trazo continuo se han representado los niveles teóricos correspondientes al análisis de regresión no lineal de los datos plasmáticos promedio.

Tiempo	RATA						Media \pm d.e.
	1	2	3	4	5	6	
5	1.27	2.33	1.74	1.63	0.91	2.98	1.81 \pm 0.75
10	1.98	3.42	2.12	2.10	2.05	4.07	2.62 \pm 0.89
20	2.67	4.38	2.83	2.38	3.01	4.94	3.37 \pm 1.04
30	3.03	4.44	3.68	2.93	4.17	5.26	3.92 \pm 0.89
40	3.08	4.78	3.76	2.95	4.71	4.85	4.02 \pm 0.88
60	2.68	4.35	4.55	2.73	4.67	4.80	3.96 \pm 0.97
80	2.35	4.51	3.82	2.45	4.43	4.75	3.71 \pm 1.07
100	2.20	4.64	3.87	2.21	4.06	4.13	3.52 \pm 1.05
120	2.04	3.84	3.73	2.08	3.62	3.93	3.21 \pm 0.89

Cuadro 3.37 Niveles plasmáticos individuales y promedios obtenidos experimentalmente tras la administración, por vía **oral**, de una dosis de **22 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del **grupo E-2**. Junto a los valores promedios de concentración plasmática para cada tiempo de muestreo se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.). El tiempo se expresa en minutos y la concentración en $\mu\text{g/ml}$.

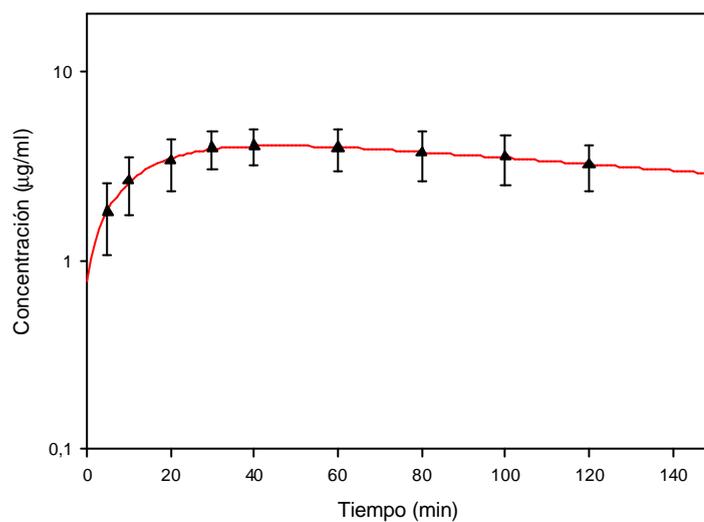


Figura 3.17 Curva de nivel plasmático promedio obtenida tras la administración, por vía **oral**, de una dosis de **22 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del **grupo E-2**. En trazo continuo se han representado los niveles teóricos correspondientes al análisis de regresión no lineal de los datos plasmáticos promedio.

Adicionalmente, en la *Figura 3.18* se han representado gráficamente las concentraciones plasmáticas medias en función del tiempo tras la administración intravenosa (**grupo B-1**) y oral (**grupo E-1**) de **2.8 mg de acamprosato**. En la *Figura* se muestra, asimismo, las curvas teóricas obtenidas por regresión no lineal de los datos plasmáticos promedio.

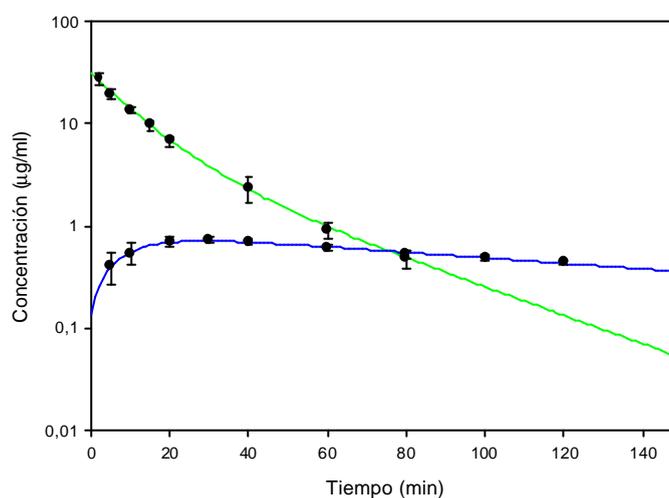


Figura 3.18 Representación gráfica de las curvas de nivel plasmático promedio obtenidas tras la administración de **2.8 mg de acamprosato** por vía **intravenosa** rápida (trazo verde) y por vía **oral** (trazo azul), a los animales de los **grupos B-1** y **E-1** respectivamente. En trazo continuo se han representado los niveles teóricos derivados del ajuste de regresión no lineal de los datos plasmáticos promedio.

En la *Figura 3.19* se han representado gráficamente las concentraciones plasmáticas medias en función del tiempo tras la administración intravenosa (**grupo B3**) y oral (**grupo E-2**) de **22 mg de acamprosato**. En la *Figura* se muestra, asimismo, las curvas teóricas obtenidas por regresión no lineal de los datos plasmáticos promedio.

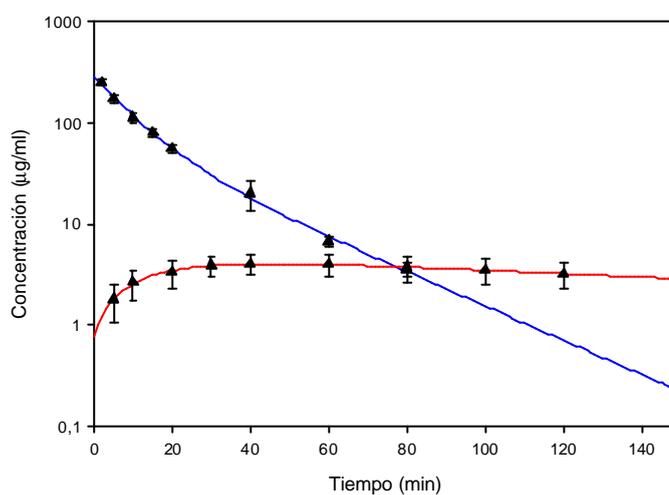


Figura 3.19 Representación gráfica de las curvas de nivel plasmático promedio obtenidas tras la administración de **22 mg de acamprosato** por vía **intravenosa** rápida (trazo azul) y por vía **oral** (trazo rojo), a los animales de los **grupos B-3** y **E-2** respectivamente. En trazo continuo se han representado los niveles teóricos derivados del ajuste de regresión no lineal de los datos plasmáticos promedio.

3.3.1.2 Elección del modelo farmacocinético

En los siguientes Cuadros (Cuadros 3.38 y 3.39), aparecen a modo de resumen los resultados obtenidos en la fase de selección del modelo farmacocinético para las curvas promedio obtenidas para los grupos experimentales **E-1** y **E-2**.

Grupo E-1 (2.8 mg acamprosato)								
Modelo	r	s.c.	g.l.	Nº parám.	AIC	F.calc	F.teor	p
Mc	0.989	0.0047	5	4	-40.12			
Bc	0.996	0.0014	3	6	-47.40	3.68	9.01	0.1561

Cuadro 3.38 Resultado del ajuste de las ecuaciones representativas de los modelos estudiados (**-Mc-** Monocompartimental, **-Bc-** Bicompartimental) a los niveles plasmáticos promedio correspondientes a la administración de **2.8 mg de acamprosato** por vía **oral** (Grupo **E-1**). En el Cuadro se indica el coeficiente de correlación obtenido entre los valores de concentración de fármaco experimentales y los predichos por el modelo (r), la suma de cuadrados (s.c.), los grados de libertad (g.l.) y el número de parámetros del modelo estudiado (Nº parám.), el valor de AIC, así como los valores de *F de Snedecor* calculada, teórica y su correspondiente valor de probabilidad (p). Como factor de ponderación se ha utilizado siempre el inverso de la concentración plasmática al cuadrado.

Grupo E-2 (22 mg acamprosato)								
Modelo	r	s.c.	g.l.	Nº parám.	AIC	F.calc	F.teor	p
Mc	0.998	0.0040	5	4	-41.69			
Bc	0.998	0.0040	3	6	-37.69	0	9.01	1

Cuadro 3.39 Resultado del ajuste de las ecuaciones representativas de los modelos estudiados (**-Mc-** Monocompartimental, **-Bc-** Bicompartimental) a los niveles plasmáticos promedio correspondientes a la administración de **22 mg de acamprosato** por vía **oral** (Grupo **E-2**). En el *Cuadro* se indica el coeficiente de correlación obtenido entre los valores de concentración de fármaco experimentales y los predichos por el modelo (r), la suma de cuadrados (s.c.), los grados de libertad (g.l.) y el número de parámetros del modelo estudiado (Nº parám.), el valor de AIC, así como los valores de *F de Snedecor* calculada, teórica y su correspondiente valor de probabilidad (p). Como factor de ponderación se ha utilizado siempre el inverso de la concentración plasmática al cuadrado.

3.3.1.3 Parámetros farmacocinéticos

En los Cuadros 3.40 a 3.46 se muestran los distintos parámetros farmacocinéticos individuales y promedios obtenidos para el acamprosato en los grupos experimentales **E-1** y **E-2**. El valor promedio va acompañado de su correspondiente desviación estándar (d.e.).

RATA							
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media ± d.e.
P_1 (µg/ml)	-1.04	-1.01	-1.05	-0.64	-0.34	-0.76	-0.81 ± 0.28
I_1 (min ⁻¹)	0.08	0.14	0.06	0.08	0.13	0.12	0.10 ± 0.03
P_2 (µg/ml)	0.91	0.90	1.06	0.96	0.73	0.97	0.92 ± 0.12
I_2 (min ⁻¹)	0.007	0.006	0.008	0.007	0.004	0.007	0.006 ± 0.001
AUC_0^∞ (µg.min/ml)	144.7	163.4	167.3	130.3	220.3	129.7	160.1 ± 34.0

Cuadro 3.40 Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios del acamprosato, calculados a partir de los ajustados del modelo monocompartimental a los valores experimentales expuestos en el Cuadro 3.36, correspondientes a la administración **oral** de **2.8 mg del fármaco (grupo E-1)**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.)

Tiempo	RATA						Media \pm d.e.
	1	2	3	4	5	6	
U_0^{24} (%)	23.22	22.82	13.66	22.77	14.60	15.18	19.20 \pm 4.14
U_{24}^{48} (%)	1.35	1.33	1.55	1.47	1.03	1.51	1.37 \pm 0.19
U_0^{48} (%)	24.57	24.15	15.21	24.24	15.62	16.69	20.08 \pm 4.67
H_0^{48} (%)	73.42	72.84	85.64	65.50	69.03	86.16	75.43 \pm 8.60
$U_0^{48} + H_0^{48}$ (%)	97.99	96.99	100.85	89.74	84.65	102.85	95.51 \pm 6.96

Cuadro 3.41 Porcentajes individuales y promedios de acamprosato excretados en orina (U) y en heces (H), obtenidos tras la administración **oral** de una dosis de **2.8 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del **grupo E-1**. Junto a los valores promedio se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

RATA							
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media \pm d.e.
P_1 ($\mu\text{g/ml}$)	-3.74	-4.57	-8.34	-3.00	-8.72	-4.83	-5.53 \pm 2.41
I_1 (min^{-1})	0.082	0.107	0.022	0.052	0.038	0.113	0.069 \pm 0.037
P_2 ($\mu\text{g/ml}$)	3.84	5.06	9.47	4.06	8.41	5.82	6.11 \pm 2.33
I_2 (min^{-1})	0.006	0.002	0.007	0.006	0.068	0.003	0.005 \pm 0.002
AUC_0^∞ ($\mu\text{g}\cdot\text{min/ml}$)	866.9	1495.6	1678.6	794.3	1182.1	1350.0	1227.9 \pm 349.3

Cuadro 3.42 Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios del acamprosato, calculados a partir de los ajustados del modelo monocompartimntal a los valores experimentales expuestos en el *Cuadro 3.37*, correspondientes a la administración oral de **22 mg del fármaco (Grupo E-2)**. Junto a los valores promedio de cada parámetro se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.)

RATA							
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media \pm d.e.
U_0^{24} (%)	14.83	21.18	15.93	18.88	14.05	16.86	16.95 \pm 2.67
U_{24}^{48} (%)	2.05	2.12	1.77	1.15	2.65	1.39	1.85 \pm 0.54
U_0^{48} (%)	16.88	23.30	17.70	20.03	16.70	18.25	18.81 \pm 2.50
H_0^{48} (%)	84.44	77.32	82.29	75.79	77.25	78.48	79.26 \pm 3.36
$U_0^{48} + H_0^{48}$ (%)	101.32	100.62	99.99	95.82	93.95	96.73	98.07 \pm 2.99

Cuadro 3.43 Porcentajes individuales y promedios de acamprosato excretados en orina (U) y en heces (H), obtenidos tras la administración por vía **oral** de una dosis de **22 mg de acamprosato**, en solución acuosa, a los animales del **grupo E-2**. Junto a los valores promedio se indica la correspondiente desviación estándar (d.e.).

3.3.2 Estudio topográfico de la absorción intestinal de acamprosato

En los Cuadros 3.44 a 3.46 se exponen los valores de las concentraciones remanentes de acamprosato en las muestras intestinales para cada tiempo de muestreo determinadas en los diferentes **tramos** del intestino delgado de la rata (**proximal, medio y distal**) tras la perfusión *in situ* de una solución de acamprosato de concentración 560 µg/ml. En todos los casos las concentraciones se corrigieron para el proceso de reabsorción de agua, como se detalla en el *Epígrafe 2.4.2.5.1*. Adicionalmente, se indican los valores de los volúmenes remanentes al finalizar el tiempo de muestreo (V_{30}). También se detalla en cada *Cuadro* el valor de concentración de fármaco extrapolado a tiempo cero (A_0) y la constante aparente de velocidad de absorción (k_a), con su error estándar de estimación. Ambos parámetros se obtienen por regresión no lineal de las concentraciones de fármaco remanentes en función del tiempo.

Como criterio de bondad del ajuste se indica el valor del coeficiente de determinación lineal entre valores teóricos y experimentales (r^2).

En la parte inferior de cada *Cuadro* se muestra, para cada condición experimental, la constante aparente de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad efectiva (P_{ef}) con su desviación estándar (d.e.).

En el *Cuadro 3.47* y *Figura 3.20* se muestran los valores promedios, junto a su desviación estándar, de la constante de velocidad de absorción del acamprosato obtenida en los ensayos realizados en los diferentes tramos del intestino delgado de la rata (**proximal, medio y distal**) con una solución de acamprosato 560 µg/ml.

El análisis estadístico (ANOVA) no reveló la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de k_a obtenidos. Por tanto, estos resultados parecen indicar que la constante de velocidad de absorción del acamprosato se mantiene constante a lo largo del intestino delgado de la rata.

Tiempo (min)	Concentración remanente en lumen (mg/ml)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	494.2	487.4	458.0	473.2	465.5	469.1	465.9	-	480.8	478.2	-	477.4
10	477.3	457.4	445.9	459.0	442.4	449.5	451.8	450.8	455.5	465.1	466.8	459.5
15	463.0	442.0	428.0	446.9	419.8	441.4	436.0	440.0	436.2	444.6	445.0	446.4
20	449.9	418.8	421.7	428.5	397.3	433.2	427.3	425.2	418.9	428.8	433.9	436.8
25	441.6	397.5	415.8	421.9	377.4	423.4	424.9	414.3	408.4	-	424.9	424.0
30	431.9	380.7	411.5	408.6	346.4	411.4	419.2	401.9	401.3	-	421.1	423.3
V ₃₀ (ml)	4.5	4.3	3.9	4.2	4.1	4.2	4.2	4.5	3.9	4.2	4.0	4.5
A ₀ (µg/ml)	504.6	509.4	464.3	486.9	495.4	476.8	471.0	478.5	492.6	497.8	485.4	484.9
e.e.	2.8	3.0	4.7	2.4	4.5	3.2	5.1	1.6	6.0	3.1	8.3	4.7
k _a (h ⁻¹)	0.32	0.59	0.26	0.35	0.68	0.29	0.26	0.35	0.44	0.44	0.31	0.30
e.e.	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.01	0.04	0.03	0.05	0.03
r ²	0.988	0.996	0.943	0.992	0.992	0.980	0.933	0.998	0.969	0.992	0.929	0.960
k_a ± d.e. = 0.38 ± 0.13 h⁻¹ (CV = 34.63%)												
P_{ef} ± d.e. = 1.17 · 10⁻⁵ ± 0.41 · 10⁻⁵ cm/s												

Cuadro 3.44 Concentraciones de acamprotrato remanentes (µg/ml) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **acamprotrato 560 mg/ml** en el **tramo inicial** (33 cm) del intestino delgado de la rata. Se indica asimismo, el volumen remanente final del ensayo (V₃₀) y los parámetros del ajuste obtenido en cada caso, acompañados de sus errores estándar (e.e.) y del coeficiente de determinación (r²). Finalmente se indican la constante de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad medio (P_{ef}), ambos con su desviación estándar (d.e.).

Tiempo (min)	Concentración remanente en lumen (mg/ml)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	-	-	480.5	471.5	480.5	452.3	466.4	454.9	484.6	482.9	480.7	482.9
10	470.5	457.1	473.0	466.3	463.8	436.5	459.1	437.9	470.8	466.5	462.6	469.8
15	452.6	453.7	455.4	451.3	442.6	418.8	444.4	416.5	447.5	452.8	443.2	449.6
20	440.9	442.1	453.3	444.3	433.5	408.1	430.3	400.1	449.6	441.4	432.4	429.7
25	424.3	439.4	425.2	436.0	416.7	393.4	428.1	381.7	437.9	428.5	419.2	422.9
30	417.9	425.3	414.2	432.3	409.6	380.7	423.9	361.1	425.8	419.4	405.9	403.1
V ₃₀ (ml)	4.4	4.7	4.8	4.6	4.5	4.7	4.8	4.6	4.8	4.6	4.4	4.4
A ₀ (µg/ml)	497.7	475.5	499.6	480.5	494.1	467.2	475.1	478.1	493.2	494.7	494.7	501.8
e.e.	4.5	4.8	6.3	2.8	3.7	1.5	4.5	2.1	5.7	1.7	2.5	3.5
k _a (h ⁻¹)	0.36	0.21	0.36	0.22	0.39	0.41	0.25	0.55	0.30	0.34	0.40	0.43
e.e.	0.03	0.03	0.04	0.02	0.02	0.01	0.03	0.01	0.04	0.01	0.02	0.02
r ²	0.985	0.946	0.952	0.974	0.985	0.997	0.946	0.997	0.942	0.996	0.993	0.989
k_a ± d.e. = 0.35 ± 0.10 h⁻¹ (CV = 27.46%)												
P_{ef} ± d.e. = 1.07 · 10⁻⁵ ± 0.29 · 10⁻⁵ cm/s												

Cuadro 3.45 Concentraciones de acamprosato remanentes (µg/ml) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **acamprosato 560 mg/ml** en el **tramo medio** (33 cm) del intestino delgado de la rata. Se indica asimismo, el volumen remanente final del ensayo (V₃₀) y los parámetros del ajuste obtenido en cada caso, acompañados de sus errores estándar (e.e.) y del coeficiente de determinación (r²). Finalmente se indican la constante de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad medio (P_{ef}), ambos con su desviación estándar (d.e.).

Tiempo (min)	Concentración remanente en lumen (mg/ml)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	437.1	475.5	456.5	463.9	486.2	489.1	487.2	495.6	479.8	478.1	489.4	477.9
10	423.9	458.6	450.4	445.5	474.5	450.6	463.9	481.9	463.3	469.1	475.0	462.8
15	412.3	445.8	431.2	419.8	451.7	427.0	450.5	471.0	450.5	446.4	461.2	451.1
20	395.8	423.4	420.8	415.3	441.0	404.6	442.6	468.7	443.8	438.1	448.3	444.3
25	393.1	425.8	416.1	404.1	423.6	382.1	442.3	461.6	427.7	422.1	435.1	433.9
30	384.8	411.2	403.8	382.0	420.7	363.6	431.5	458.1	-	404.3	429.2	425.4
V ₃₀ (ml)	4.0	4.2	3.7	3.7	4.8	4.0	4.0	4.2	4.1	4.5	3.9	3.7
A ₀ (µg/ml)	446.4	486.3	468.8	478.5	501.1	512.7	489.5	498.5	491.3	497.1	501.5	485.8
e.e.	3.7	5.8	3.5	5.7	4.7	4.7	6.9	3.8	3.1	3.6	2.3	3.3
k _a (h ⁻¹)	0.31	0.35	0.30	0.44	0.38	0.71	0.27	0.18	0.33	0.40	0.33	0.27
e.e.	0.03	0.04	0.02	0.04	0.03	0.03	0.05	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02
r ²	0.972	0.954	0.975	0.970	0.975	0.993	0.899	0.936	0.985	0.986	0.992	0.989
k_a ± d.e. = 0.35 ± 0.13 h⁻¹ (CV = 36.30%)												
P_{ef} ± d.e. = 1.08 · 10⁻⁵ ± 0.39 · 10⁻⁵ cm/s												

Cuadro 3.46 Concentraciones de acamprosato remanentes (µg/ml) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **acamprosato 560 mg/ml** en el **tramo distal** (33 cm) del intestino delgado de la rata. Se indica asimismo, el volumen remanente final del ensayo (V₃₀) y los parámetros del ajuste obtenido en cada caso, acompañados de sus errores estándar (e.e.) y del coeficiente de determinación (r²). Finalmente se indican la constante de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad medio (P_{ef}), ambos con su desviación estándar (d.e.).

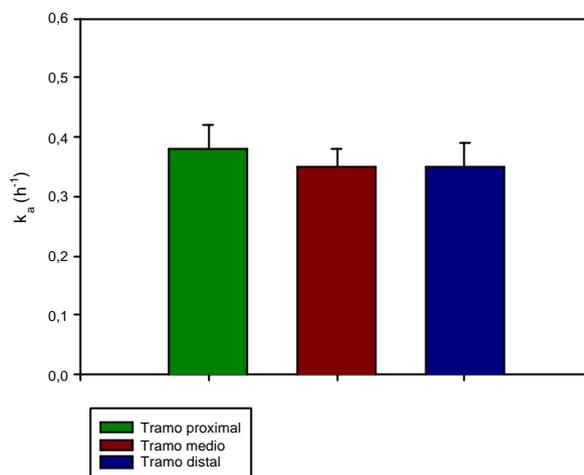


Figura 3.20 Representación gráfica de los valores medios (y su desviación estándar) de la constante de velocidad de absorción del acamprosato obtenidas en los diferentes tramos analizados -tramo proximal (barra verde), tramo medio (barra roja) y tramo distal (barra azul)- del intestino delgado de la rata

Tramo	$k_a \pm \text{d.e. (h}^{-1}\text{)}$
Proximal	0.38 ± 0.04
Medio	0.35 ± 0.03
Distal	0.35 ± 0.04
Signific.	n.s.

Cuadro 3.47 Valores medios (y su desviación estándar) de la constante de velocidad de absorción del acamprosato obtenidas los diferentes tramos -tramo proximal, tramo medio y tramo distal- del intestino delgado de la rata junto al resultado del análisis estadístico realizado (ANOVA).

3.3.3 Ensayos para la promoción de la absorción intestinal del acamprosato

Los estudios para la promoción de la absorción intestinal del acamprosato se han abordado mediante tres ensayos experimentales diferentes:

- ✓ Perfusión, *in situ*, de una solución de acamprosato en el intestino delgado de la rata y determinación de la constante de velocidad de absorción del fármaco en ausencia y presencia de **polisorbato 80** o **caprato sódico**.
- ✓ Administración, *in vivo*, de una solución de acamprosato, por vía oral en la rata consciente y determinación de la fracción de dosis excretada de forma inalterada en la orina del animal tratado en ausencia y presencia de **caprato sódico**.
- ✓ Perfusión *in vitro* de una solución de acamprosato o de manitol y determinación del coeficiente de permeabilidad efectivo de cada una de las moléculas perfundidas en ausencia y presencia de **caprato sódico** sobre una monocapa de células Caco-2.

Los resultados se presentan en el mismo orden cronológico en el que se desarrollaron los ensayos.

3.3.3.1 Ensayos *In situ*

3.3.3.1.1 Ensayos con polisorbato 80

En los *Cuadros 3.48 a 3.51* se exponen los valores de las concentraciones remanentes de acamprosato, corregidas para la reabsorción de agua, obtenidas para cada tiempo de muestreo en los distintos grupos de ensayo.

En la *Figura 3.21* se representa el valor medio de las constantes de velocidad de absorción del acamprosato obtenidas para cada uno de los grupos de ensayo.

En el *Cuadro 3.52* se resumen las constantes de velocidad de absorción promedias del acamprosato, junto con su desviación estándar, así como los resultados del análisis estadístico realizado. Los resultados obtenidos indican que el polisorbato 80 no ejerce ningún efecto promotor sobre la absorción del acamprosato, puesto que a ninguna de las concentraciones ensayadas produjo un aumento significativo de la constante de velocidad de absorción (k_a) respecto al grupo control. Es más, la presencia de polisorbato 80 en el lumen intestinal provocó una disminución significativa ($p < 0.001$) de la k_a del acamprosato para todas las concentraciones ensayadas.

Tiempo (min)	Concentración remanente en lumen ($\mu\text{g/ml}$)			
	1	2	3	4
5	466.9	486.9	444.4	488.5
10	438.7	461.9	433.4	474.7
15	430.9	442.0	413.3	450.5
20	421.2	434.2	403.8	443.5
25	415.1	427.0	403.1	440.0
30	402.9	416.0	384.8	431.2
V_{30} (ml)	4.7	4.6	4.3	4.6
A_0 ($\mu\text{g/ml}$)	471.0	493.8	455.3	496.2
e.e.	6.4	6.7	5.0	6.5
k_a (h^{-1})	0.32	0.36	0.33	0.30
e.e.	0.04	0.04	0.03	0.04
r^2	0.932	0.945	0.958	0.929
$k_a \pm \text{d.e.} = 0.33 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ (CV= 7.80 %)				
$P_{ef} \pm \text{d.e.} = 1.00 \cdot 10^{-5} \pm 0.07 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$				

Cuadro 3.48 Concentraciones de acamprosato remanentes ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **acamprosato (560 mg/ml)** en el tramo medio del intestino delgado de la rata. Se indica, asimismo, el volumen remanente final del ensayo (V_{30}) y los parámetros del ajuste obtenidos en cada caso, acompañados de sus errores estándar (e.e.) y del coeficiente de determinación (r^2). Finalmente se indican la constante de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad medio (P_{ef}), ambos con su desviación estándar (d.e.).

Tiempo (min)	Concentración remanente en lumen ($\mu\text{g/ml}$)					
	1	2	3	4	5	6
5	523.0	496.2	527.6	512.0	487.6	494.5
10	508.3	483.6	509.0	492.9	477.6	491.8
15	493.7	473.8	499.4	486.7	469.3	488.8
20	478.6	469.8	486.6	480.1	463.2	480.8
25	470.2	458.7	480.6	475.5	455.8	470.8
30	458.4	458.1	474.7	463.5	453.6	466.2
V_{30} (ml)	4.7	4.5	4.4	4.6	4.8	4.3
A_0 ($\mu\text{g/ml}$)	535.7	501.0	533.8	516.1	492.6	503.7
e.e.	2.0	3.3	4.1	4.0	2.2	2.7
k_a (h^{-1})	0.32	0.20	0.25	0.21	0.18	0.15
e.e.	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02
r^2	0.994	0.957	0.964	0.949	0.975	0.953
$k_a \pm \text{d.e.} = 0.21 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$ (CV= 26.07 %)						
$P_{ef} \pm \text{d.e.} = 0.64 \cdot 10^{-5} \pm 0.16 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$						

Cuadro 3.49 Concentraciones de acamprosato remanentes ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **acamprosato 560 mg/ml y polisorbato 80 (5 mg/l)** en el tramo medio del intestino delgado de la rata. Se indica, asimismo, el volumen remanente final del ensayo (V_{30}) y los parámetros del ajuste obtenidos en cada caso, acompañados de sus errores estándar (e.e.) y del coeficiente de determinación (r^2). Finalmente se indican la constante de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad medio (P_{ef}), ambos con su desviación estándar (d.e.).

Tiempo (min)	Concentración remanente en lumen ($\mu\text{g/ml}$)					
	1	2	3	4	5	6
5	506.7	487.1	494.6	499.1	481.1	484.2
10	496.4	478.7	483.5	495.6	480.5	470.4
15	483.3	469.6	481.7	483.9	466.9	465.5
20	475.4	451.6	471.6	474.7	456.4	456.8
25	470.6	445.7	460.5	475.2	447.6	457.0
30	453.4	439.9	450.7	461.8	437.0	452.1
V_{30} (ml)	4.8	4.9	4.7	4.3	4.5	4.7
A_0 ($\mu\text{g/ml}$)	517.4	498.5	504.3	507.9	495.6	485.7
e.e.	2.9	3.3	2.8	3.2	3.3	3.8
k_a (h^{-1})	0.25	0.26	0.22	0.18	0.24	0.16
e.e.	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
r^2	0.980	0.975	0.974	0.954	0.972	0.909
$k_a \pm \text{d.e.} = 0.22 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ (CV= 19.71 %)						
$P_{ef} \pm \text{d.e.} = 0.67 \cdot 10^{-5} \pm 0.16 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$						

Cuadro 3.50 Concentraciones de acamprosato remanentes ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **acamprosato 560 mg/ml** y **polisorbato 80 (20 mg/l)** en el tramo medio del intestino delgado de la rata. Se indica, asimismo, el volumen remanente final del ensayo (V_{30}) y los parámetros del ajuste obtenidos en cada caso, acompañados de sus errores estándar (e.e.) y del coeficiente de determinación (r^2). Finalmente se indican la constante de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad medio (P_{ef}), ambos con su desviación estándar (d.e.).

Tiempo (min)	Concentración remanente en lumen ($\mu\text{g/ml}$)					
	1	2	3	4	5	6
5	476.4	475.4	499.1	479.8	475.0	500.4
10	471.0	467.6	498.0	479.6	474.9	486.4
15	459.0	463.3	493.8	465.6	464.0	485.3
20	455.0	457.8	487.0	461.3	452.2	469.5
25	455.8	451.2	480.7	456.5	445.4	467.4
30	451.6	445.5	470.3	453.7	437.2	464.1
V_{30} (ml)	4.5	4.2	4.5	4.4	4.5	3.8
A_0 ($\mu\text{g/ml}$)	479.2	480.9	508.7	486.9	487.7	504.9
e.e.	3.7	0.8	3.0	3.1	3.2	4.1
k_a (h^{-1})	0.13	0.15	0.14	0.15	0.22	0.18
e.e.	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03
r^2	0.881	0.996	0.936	0.933	0.965	0.928
$k_a \pm \text{d.e.} = 0.16 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ (CV= 19.84 %)						
$P_{ef} \pm \text{d.e.} = 0.49 \cdot 10^{-5} \pm 0.10 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$						

Cuadro 3.51 Concentraciones de acamprosato remanentes ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **acamprosato 560 mg/ml** y **polisorbato 80 (800 mg/l)** en el tramo medio del intestino delgado de la rata. Se indica, asimismo, el volumen remanente final del ensayo (V_{30}) y los parámetros del ajuste obtenidos en cada caso, acompañados de sus errores estándar (e.e) y del coeficiente de determinación (r^2). Finalmente se indican la constante de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad medio (P_{ef}), ambos con su desviación estándar (d.e.).

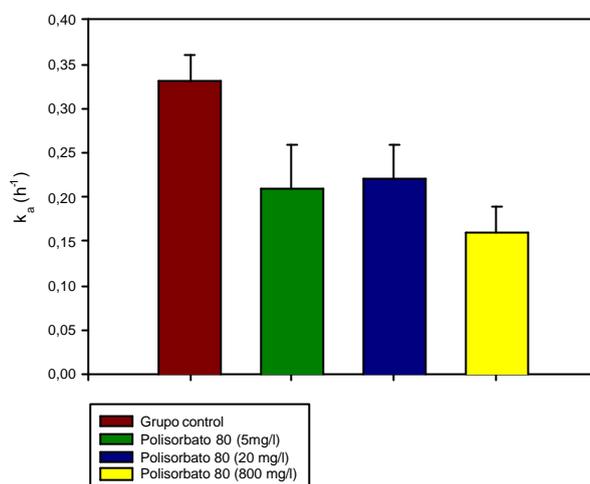


Figura 3.21 Representación gráfica de los valores medios de la constante de velocidad de absorción del acamprosato (k_a) en ausencia y presencia de **polisorbato 80** acompañados de sus desviaciones estándar (d.e.) en todos los grupos ensayados.

Grupo	Polisorbato 80	n	$k_a \pm \text{d.e.} (\text{h}^{-1})$
G-0	0	4	0.33 ± 0.03^a
G-1	5	6	0.21 ± 0.05^b
G-2	20	6	0.22 ± 0.04^b
G-3	800	6	0.16 ± 0.03^b
Signif.	-	-	<0.001

Cuadro 3.52 Valores medios de la constante de velocidad de absorción del acamprosato (k_a) en ausencia y presencia de distintas concentraciones de **polisorbato 80**, expresadas en mg/l, acompañados de sus desviaciones estándar (d.e.). Aquellos valores con superíndices distintos presentan diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$).

3.3.3.1.2 Ensayos con caprato sódico

A) Estudio de la influencia de la concentración de promotor

En los *Cuadros 3.53 a 3.55* se muestran las concentraciones remanentes corregidas de acamprosato, obtenidas para cada tiempo de toma de muestra en cada uno de los animales sometidos a ensayo. También se exponen el resto de parámetros característicos obtenidos mediante regresión no lineal de dichas concentraciones remanentes frente al tiempo de muestreo.

En la *Figura 3.22* se representan gráficamente los valores de las constantes medias de velocidad de absorción del acamprosato junto con su desviación estándar, para los distintos grupos de ensayo. Adicionalmente, en el *Cuadro 3.56* se muestran los resultados del análisis estadístico realizado (ANOVA).

Los resultados de estos ensayos muestran un aumento significativo de la constante de absorción del acamprosato con respecto al grupo control (79% para 13 mM y 75% para 16 mM), sin embargo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las k_a del acamprosato obtenidas en presencia de las distintas concentraciones de promotor ensayadas.

Tiempo (min)	Concentración remanente en lumen (ng/ml)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	48.8	48.8	47.4	47.4	53.9	49.6	36.8	42.0	50.7	49.7
10	47.9	48.0	46.1	46.4	52.0	49.5	36.7	41.7	49.3	49.6
15	46.4	47.2	44.5	44.8	49.7	47.7	35.9	39.6	48.3	48.4
20	45.9	46.1	44.0	43.8	48.4	46.5	35.5	39.1	46.4	47.5
25	45.6	44.5	42.6	42.8	47.0	46.1	34.4	38.0	45.5	47.0
30	44.5	42.8	41.8	42.1	45.2	45.0	33.9	36.3	42.8	45.7
V_{30} (ml)	4.7	4.7	4.2	4.5	4.0	4.7	4.7	4.1	4.2	4.5
A_0 (ng/ml)	49.5	50.5	48.5	48.5	55.7	50.9	37.7	43.6	52.6	50.9
e.e.	0.3	0.5	0.2	0.2	0.3	0.4	0.3	0.4	0.5	0.3
k_a (h^{-1})	0.21	0.30	0.30	0.30	0.42	0.25	0.21	0.35	0.38	0.21
e.e.	0.02	0.03	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02
r^2	0.965	0.961	0.989	0.990	0.994	0.965	0.961	0.967	0.972	0.965
$k_a \pm d.e. = 0.29 \pm 0.07 h^{-1}$ (CV= 25.14 %)										
$P_{ef} \pm d.e. = 0.89 \cdot 10^{-5} \pm 0.22 \cdot 10^{-5} cm/s$										

Cuadro 3.53 Concentraciones de acamprosato remanentes ($\mu g/ml$) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **acamprosato 55 ng/ml** en el tramo medio del intestino delgado de la rata. Se indica, asimismo, el volumen remanente final del ensayo (V_{30}) y los parámetros del ajuste obtenidos en cada caso, acompañados de sus errores estándar (e.e.) y del coeficiente de determinación (r^2). Finalmente se indican la constante de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad medio (P_{ef}), ambos con su desviación estándar (d.e.).

Tiempo (min)	Concentración remanente en lumen (ng/ml)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	46.9	48.1	50.7	48.2	39.7	46.3	49.3	49.5	47.8	44.8
10	44.7	46.3	48.6	46.2	39.2	45.0	47.7	46.8	45.5	42.8
15	41.8	45.0	45.6	44.8	37.0	41.9	46.0	44.4	42.8	39.7
20	38.3	43.5	44.8	43.8	35.3	40.3	44.2	42.6	40.5	37.2
25	37.8	43.0	44.5	43.0	33.7	38.6	42.6	41.9	37.9	35.2
30	34.1	42.1	43.5	42.0	32.5	36.8	41.2	39.8	35.4	33.0
V_{30} (ml)	3.8	4.2	4.5	4.5	4.0	4.3	4.5	4.2	3.6	4.0
A_0 (ng/ml)	50.3	49.0	51.4	49.1	42.0	48.8	51.2	51.2	51.1	47.9
e.e.	0.8	0.4	0.9	0.4	0.5	0.4	0.1	0.6	0.3	0.3
k_a (h^{-1})	0.75	0.32	0.37	0.32	0.51	0.57	0.44	0.51	0.72	0.75
e.e.	0.05	0.03	0.06	0.03	0.04	0.03	0.01	0.04	0.02	0.02
r^2	0.980	0.975	0.907	0.976	0.981	0.990	0.999	0.979	0.998	0.996
$k_a \pm d.e. = 0.52 \pm 0.17 h^{-1}$ (CV= 31.89 %)										
$P_{ef} \pm d.e. = 1.59 \cdot 10^{-5} \pm 0.51 \cdot 10^{-5} cm/s$										

Cuadro 3.54 Concentraciones de acamprosato remanentes ($\mu g/ml$) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **acamprosato 55 ng/ml** y **caprato sódico 13 mM** en el tramo medio del intestino delgado de la rata. Se indica, asimismo, el volumen remanente final del ensayo (V_{30}) y los parámetros del ajuste obtenidos en cada caso, acompañados de sus errores estándar (e.e.) y del coeficiente de determinación (r^2). Finalmente se indican la constante de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad medio (P_{ef}), ambos con su desviación estándar (d.e.).

Tiempo (min)	Concentración remanente en lumen (ng/ml)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	48.0	47.0	46.8	48.1	46.6	48.8	46.4	45.1	47.9	42.0
10	45.7	45.4	45.3	45.7	46.2	46.6	43.1	44.6	45.3	38.6
15	43.5	43.4	43.4	44.0	44.8	44.8	41.0	42.7	42.8	35.7
20	40.7	42.0	42.7	41.8	43.9	42.9	39.0	41.5	41.2	33.4
25	37.9	40.6	41.7	41.4	43.0	42.7	37.7	40.1	39.6	30.9
30	36.0	39.3	40.7	39.8	41.3	42.0	35.1	38.6	37.7	29.3
V_{30} (ml)	4.3	4.6	4.4	4.3	4.6	4.1	3.7	4.3	4.3	4
A_0 (ng/ml)	51.3	48.6	47.8	49.5	48.1	49.7	48.5	47.0	49.9	44.9
e.e.	0.4	0.2	0.4	0.5	0.4	0.7	0.5	0.3	0.3	0.3
k_a (h^{-1})	0.70	0.43	0.34	0.45	0.28	0.37	0.64	0.39	0.57	0.88
e.e.	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02	0.05	0.03	0.02	0.02	0.03
r^2	0.995	0.997	0.981	0.978	0.971	0.939	0.990	0.986	0.994	0.997
$k_a \pm$ d.e. = $0.51 \pm 0.19 h^{-1}$ (CV = 37.54 %)										
$P_{ef} \pm$ d.e. = $1.54 \cdot 10^{-5} \pm 0.57 \cdot 10^{-5} cm/s$										

Cuadro 3.55 Concentraciones de acamprosato remanentes ($\mu g/ml$) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **acamprosato 55 ng/ml** y **caprato sódico 16 mM** en el tramo medio del intestino delgado de la rata. Se indica, asimismo, el volumen remanente final del ensayo (V_{30}) y los parámetros del ajuste obtenidos en cada caso, acompañados de sus errores estándar (e.e.) y del coeficiente de determinación (r^2). Finalmente se indican la constante de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad medio (P_{ef}), ambos con su desviación estándar (d.e.).

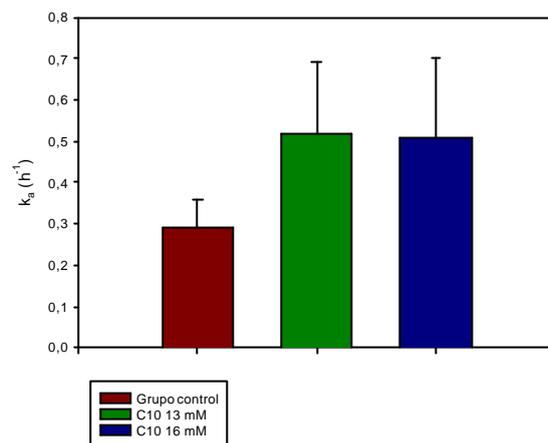


Figura 3.22 Representación gráfica de los valores medios de la constante de velocidad de absorción del acamprosato (k_a) en ausencia y presencia de **caprato sódico** (13 y 16 mM) acompañados de sus desviaciones estándar (d.e.) en todos los grupos ensayados.

Grupo	Caprato sódico	n	$k_a \pm \text{d.e.} (\text{h}^{-1})$
H-0	0	10	0.29 ± 0.07^a
H-1	13	10	0.52 ± 0.17^b
H-2	16	10	0.51 ± 0.19^b
Signific.	-	-	$P < 0.001$

Cuadro 3.56 Valores medios de la constante de absorción del acamprosato (k_a) acompañados de sus desviaciones estándar (d.e.), en ausencia y en presencia de **caprato sódico** (13 y 16 mM). Aquellos valores con superíndices distintos presentan diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$).

B) Estudio de la influencia del tiempo de exposición del promotor

En los *Cuadros 3.57 a 3.59* se exponen los valores de las concentraciones remanentes corregidas de acamprosato, obtenidas para cada tiempo de muestreo en cada uno de los animales sometidos a ensayo. Adicionalmente, se exponen el resto de parámetros empleados en este tipo de estudios, tal y como se describe en el *Epígrafe 3.3.3.1*.

En la *Figura 3.23* se representan las constantes medias de velocidad de absorción del acamprosato junto con su desviación estándar, para los distintos grupos ensayados.

En el *Cuadro 3.60* se resumen los valores medios (y su desviación estándar) de la constante de velocidad de absorción del acamprosato obtenidas en los ensayos realizados, así como los resultados del análisis estadístico realizado.

Los resultados obtenidos indican que un tiempo de exposición previa de 40 minutos no condiciona el efecto promotor del caprato sódico en la absorción intestinal del acamprosato.

Tiempo (min)	Concentración remanente en lumen (ng/ml)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	43.1	43.6	69.5	37.0	37.8	46.5	48.3	43.8	48.9	43.6
10	41.9	42.9	66.9	36.5	37.1	46.4	48.1	43.4	45.7	43.4
15	40.7	41.3	63.9	36.1	36.5	45.1	47.5	42.8	44.9	42.8
20	39.6	40.9	60.8	35.9	35.9	43.5	46.7	42.0	43.2	42.1
25	38.5	39.9	60.5	35.2	35.4	42.8	45.9	41.6	41.4	41.5
30	37.5	39.5	60.8	34.2	35.3	41.6	45.5	41.2	39.7	41.0
V_{30} (ml)	4.7	4.6	4	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4	4.7
A_0 (ng/ml)	44.3	44.5	70.6	37.6	38.2	48.1	49.1	44.4	50.3	44.4
e.e.	0.0	0.3	1.4	0.3	0.2	0.4	0.2	0.1	0.5	0.1
k_a (h^{-1})	0.34	0.25	0.36	0.17	0.17	0.29	0.15	0.15	0.47	0.16
e.e.	0.00	0.02	0.06	0.02	0.01	0.03	0.01	0.01	0.03	0.01
r^2	1.000	0.975	0.884	0.940	0.979	0.965	0.973	0.987	0.983	0.986
$k_{a\pm}$ d.e. = 0.25 ± 0.08 h^{-1} (CV= 33.53 %)										
$P_{ef\pm}$ d.e. = $0.76 \cdot 10^{-5} \pm 0.26 \cdot 10^{-5}$ cm/s										

Cuadro 3.57. Concentraciones de acamprosato remanentes ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **acamprosato 55 ng/ml**, previa perfusión durante 40 minutos de 5 ml de solución de lavado (Grupo I-0) en el tramo medio del intestino delgado de la rata. Se indica, asimismo, el volumen remanente final del ensayo (V_{30}) y los parámetros del ajuste obtenidos en cada caso, acompañados de sus errores estándar (e.e.) y del coeficiente de determinación (r^2). Finalmente se indican la constante de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad medio (P_{ef}), ambos con su desviación estándar (d.e.).

Tiempo (min)	Concentración remanente en lumen (ng/ml)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	43.5	46.5	42.6	42.8	39.5	44.9	44.8	39.8	45.3	42.4
10	42.8	44.6	40.4	42.2	38.7	42.8	43.0	37.8	43.7	41.4
15	41.5	42.2	37.8	40.9	37.0	39.0	41.5	36.6	42.2	39.4
20	40.3	40.5	35.5	40.0	35.6	37.0	39.5	35.5	41.1	38.7
25	39.3	39.0	32.9	38.4	33.5	32.8	37.5	34.0	40.3	37.0
30	38.0	37.7	30.4	37.5	32.6	32.7	36.2	33.0	39.1	36.0
V ₃₀ (ml)	4.6	4.6	4	4.7	4.4	4.1	4.6	4.7	4.6	4.6
A ₀ (ng/ml)	44.9	48.4	45.9	44.3	41.6	48.5	46.9	41.0	46.3	44.0
e.e.	0.2	0.3	0.4	0.0	0.4	1.0	0.2	0.2	0.2	0.3
k _a (h ⁻¹)	0.33	0.52	0.80	0.33	0.49	0.84	0.52	0.44	0.34	0.40
e.e.	0.01	0.02	0.03	0.02	0.03	0.07	0.02	0.02	0.02	0.02
r ²	0.993	0.994	0.995	0.984	0.986	0.974	0.997	0.993	0.991	0.990
k_a ± d.e. = 0.50 ± 0.18 h⁻¹ (CV= 36.84 %)										
P_{ef} ± d.e. = 1.52·10⁻⁵ ± 0.56·10⁻⁵ cm/s										

Cuadro 3.58 Concentraciones de acamprosato remanentes (µg/ml) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **acamprosato 55 ng/ml** y **caprato sódico 16 mM**, previa perfusión durante 40 minutos de 5 ml de **líquido de lavado (Grupo I-00)** en el tramo medio del intestino delgado de la rata. Se indica, asimismo, el volumen remanente final del ensayo (V₃₀) y los parámetros del ajuste obtenidos en cada caso, acompañados de sus errores estándar (e.e.) y del coeficiente de determinación (r²). Finalmente se indican la constante de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad medio (P_{ef}), ambos con su desviación estándar (d.e.).

Tiempo (min)	Concentración remanente en lumen (ng/ml)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	41.4	41.2	42.0	45.8	42.9	44.6	41.9	40.2	41.9	38.9
10	40.8	38.5	40.3	43.8	39.8	43.0	41.0	38.7	41.0	37.9
15	38.1	37.1	38.5	42.2	39.4	40.5	39.2	36.9	40.2	35.9
20	36.0	35.3	37.4	40.7	36.6	39.8	37.9	36.1	39.8	35.8
25	33.8	34.1	36.8	39.8	36.3	37.5	36.7	34.8	39.0	34.1
30	31.1	31.7	35.1	38.4	34.9	35.9	35.7	33.0	38.4	33.3
V_{30} (ml)	4.4	4.3	4.5	4.5	4.4	4.5	4.6	4.7	4.7	4.5
A_0 (ng/ml)	44.8	43.0	43.2	47.1	44.0	46.6	43.4	41.7	42.5	40.1
e.e.	0.8	0.4	0.4	0.3	0.7	0.4	0.2	0.3	0.1	0.4
k_a (h^{-1})	0.68	0.59	0.41	0.42	0.49	0.51	0.40	0.45	0.20	0.38
e.e.	0.06	0.03	0.03	0.02	0.05	0.03	0.02	0.02	0.01	0.03
r^2	0.972	0.990	0.983	0.992	0.952	0.989	0.994	0.992	0.993	0.974
$k_a \pm d.e. = 0.45 \pm 0.13 h^{-1}$ (CV= 28.42 %)										
$P_{ef} \pm d.e. = 1.38 \cdot 10^{-5} \pm 0.39 \cdot 10^{-5} cm/s$										

Cuadro 3.59 Concentraciones de acamprosato remanentes ($\mu g/ml$) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **acamprosato 55 ng/ml** y **caprato sódico 16 mM**, previa perfusión durante 40 minutos de 5 ml de solución de **caprato sódico 16 mM** (**Grupo I-1**) en el tramo medio del intestino delgado de la rata. Se indica, asimismo, el volumen remanente final del ensayo (V_{30}) y los parámetros del ajuste obtenidos en cada caso, acompañados de sus errores estándar (e.e) y del coeficiente de determinación (r^2). Finalmente se indican la constante de velocidad de absorción media (k_a) y el coeficiente de permeabilidad medio (P_{ef}), ambos con su desviación estándar (d.e.).

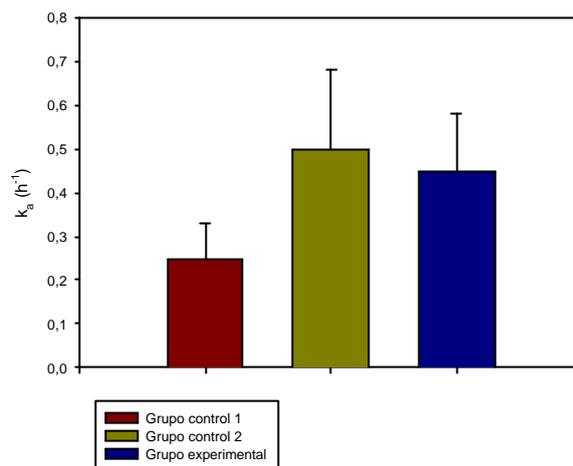


Figura 3.23 Representación gráfica de las constantes medias de velocidad de absorción del acamprosato, junto a su desviación estándar, en ausencia y presencia de una disolución de caprato sódico 16 mM en las distintas condiciones de ensayo.

Grupo	Pre-exposición	Ensayo	n	k_a (h ⁻¹) ± d.e.
I-0	Líquido lavado.	¹⁴ C-acamprosato	10	0.25 ± 0.08 ^a
I-00	Líquido lavado	C-10 (16 mM) + ¹⁴ C-acamprosato	10	0.50 ± 0.18 ^b
I-1	C-10 (16mM)	C-10 (16mM) + ¹⁴ C-acamprosato	10	0.45 ± 0.13 ^b
Signif.	-	-	-	P < 0.001

Cuadro 3.60 Valores medios de la constante de absorción del acamprosato (k_a) acompañados de sus desviaciones estándar (d.e.), determinados en los distintos grupos ensayados para el estudio de la influencia del **tiempo de exposición del caprato sódico**. Aquellos valores con superíndices distintos presentan diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$).

3.3.3.2 Ensayos *In vivo*

En la *Figura 3.24* se han representado gráficamente los porcentajes medios de dosis de ^{14}C -acamprosato administrado, junto con su desviación estándar, excretado en la orina de los animales en ausencia y presencia de distintas concentraciones (13, 16 y 50 mM) de caprato sódico. Adicionalmente en el *Cuadro 3.61* se resumen estos mismos resultados junto al análisis estadístico correspondiente.

Aunque los valores medios de porcentaje de dosis de acamprosato excretada en orina obtenidos en los grupos tratados con caprato sódico son superiores al obtenido en el grupo control, el análisis estadístico empleado (ANOVA) no detectó la existencia de diferencias estadísticamente significativas.

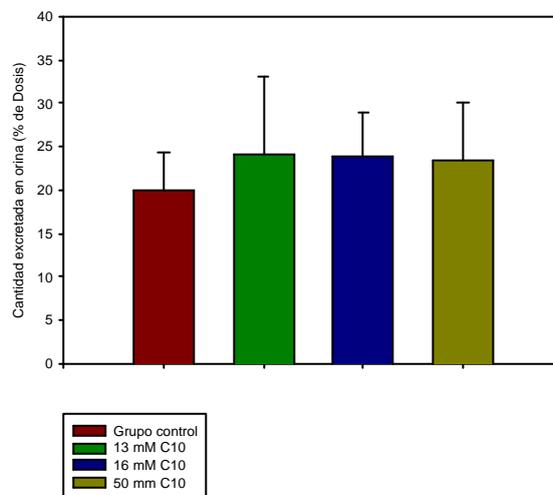


Figura 3.24 Representación gráfica de las cantidades medias de dosis de acamprosato (expresadas como porcentaje) excretada en la orina en ausencia y presencia de caprato sódico (13, 16 y 50 mM) acompañadas de su desviación estándar obtenidas en todos los grupos ensayados.

Grupo	C10 (mM)	n	U_0^{24} (%)
J-0	0	12	19.87 ± 4.57
J-1	13	8	24.18 ± 8.81
J-2	16	8	23.82 ± 5.12
J-3	50	8	23.40 ± 6.71
Signif.			n.s.

Cuadro 3.61 Valores medios del porcentaje de dosis de **acamprosato** excretado en orina tras su administración por vía oral en el animal despierto en ausencia y en presencia de caprato sódico (13, 16 y 50 mM). Junto a los valores promedio se indica la correspondiente desviación estándar.

3.3.3.3 Ensayos *In vitro*

A continuación se detallan los valores de las cantidades acumuladas de **acamprosato** o **manitol** por unidad de superficie en el compartimento receptor para cada tiempo de muestreo. También se indican los valores individuales y promedio de permeabilidad efectiva (P_{ef}) junto a su desviación estándar (d.e.).

En los *Cuadros 3.62 a 3.65* se reseñan los resultados obtenidos tras la exposición de la monocapa celular a una solución de **manitol 8.2 mM** en ausencia (**Grupo K-0**) y presencia de caprato sódico a las concentraciones de **13 (Grupo K-1)**, **16 (Grupo K-2)** y **16 mM con pre-exposición de 40 min (Grupo K-3)**.

En el *Cuadro 3.66* se resumen los resultados correspondientes a la determinación de la permeabilidad efectiva del acamprosato sin la presencia de ningún promotor. En este bloque de experimentos se calculó la permeabilidad en sentido apical-basolateral (P_{AB}) (**Grupo L-0**) y sentido basolateral-apical (P_{BA}) (**Grupo L-00**) del **acamprosato** a la concentración de **4.9 mM**.

El cociente entre los valores de permeabilidad efectiva del acamprosato determinados en sentido apical-basolateral y basolateral-apical (P_{BA}/P_{AB}) fue de 1.01 ± 0.16 , indicando que la permeabilidad no se ve favorecida en ninguno de los dos sentidos. Por tanto, estos resultados parecen indicar que es poco probable la existencia de transportadores o mecanismos de excreción implicados en el transporte del acamprosato a nivel intestinal.

Los resultados correspondientes al estudio de la permeabilidad del **acamprosato 4.9 mM** en presencia de **caprato sódico 13 mM (Grupo L-1)**, **16 mM (Grupo L-2)** y **16 mM con pre-exposición de 40 min. (Grupo L-3)** se muestran en los *Cuadros 3.67 a 3.69*.

En la *Figura 3.25* se representan, los valores medios de permeabilidad efectiva determinada *in vitro* (P_{ef}) del **manitol** y del **acamprosato**, junto a su desviación estándar, en ausencia y presencia de caprato sódico en las distintas condiciones de ensayo. Adicionalmente en el *Cuadro 3.70* se resumen dichos valores junto al resultado

del análisis estadístico realizado. Como se puede observar, las permeabilidades de ambas moléculas se incrementan a medida que las concentraciones del promotor y el tiempo de exposición al mismo.

Los resultados obtenidos muestran que permeabilidad efectiva del manitol aumenta en presencia del caprato sódico (13, 16 ó 16 mM con pre-exposición) hasta un 177, 260 ó 804% respectivamente ($P < 0.001$) en relación al grupo control. Paralelamente, el análisis estadístico también determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$) entre las permeabilidades de acamprosato determinadas en ausencia y presencia de caprato sódico (13, 16 ó 16 mM con pre-exposición). El incremento registrado en la P_{ef} del acamprosato en estos grupos experimentales fue del 119, 144 y 233 % respecto al grupo control.

Los resultados correspondientes a la prueba de comparación múltiple (test de Tukey) entre las diferentes condiciones ensayadas se muestran en el *Cuadro 3.71*.

Adicionalmente, se incluye un *Cuadro* resumen (*Cuadro 3.72*) donde se indican los valores medios y la desviación estándar de la resistencia transepitelial (TEER), expresada como porcentaje del valor inicial, de la monocapa celular medida al finalizar cada uno de los ensayos ($t = 150$ min).

Manitol 8.2 mM				
Tiempo (min)	Cantidad acumulada por superficie (ng/cm ²)			
	1	2	3	4
30	0.70	0.55	0.72	0.81
60	1.65	1.37	1.20	1.62
90	2.94	2.06	1.72	2.22
120	3.83	2.92	2.26	3.04
150	5.07	3.68	3.04	3.25
P_{ef} (cm/s)	$4.04 \cdot 10^{-7}$	$2.93 \cdot 10^{-7}$	$2.14 \cdot 10^{-7}$	$2.39 \cdot 10^{-7}$
$P_{ef} \pm \text{d.e.} = 2.80 \cdot 10^{-7} \pm 0.85 \cdot 10^{-7} \text{ cm/s}$				

Cuadro 3.62 Cantidades acumuladas de manitol por unidad de superficie (ng/cm²) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución **de manitol 8.2 mM (grupo K-0)**. Adicionalmente, se indica el coeficiente de permeabilidad individual (P_{ef}), así como el valor medio acompañado de su desviación estándar (d.e.).

Manitol 8.2 mM + C10 13mM				
Tiempo (min)	Cantidad acumulada por superficie (ng/cm ²)			
	1	2	3	4
30	1.39	1.38	0.77	0.88
60	2.62	2.49	1.74	1.68
90	4.59	3.87	2.89	2.45
120	7.22	5.84	3.71	3.88
150	8.61	8.02	5.12	5.35
P_{ef} (cm/s)	$6.45 \cdot 10^{-7}$	$5.70 \cdot 10^{-7}$	$3.75 \cdot 10^{-7}$	$3.93 \cdot 10^{-7}$
$P_{ef} \pm \text{d.e.} = 4.95 \cdot 10^{-7} \pm 1.33 \cdot 10^{-7} \text{ cm/s}$				

Cuadro 3.63 Cantidades acumuladas de manitol por unidad de superficie (ng/cm²) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de **manitol 8.2 mM** y **caprato sódico 13 mM (grupo K-1)**. Adicionalmente, se indica el coeficiente de permeabilidad individual (P_{ef}), así como el valor medio acompañado de su desviación estándar (d.e.).

Manitol 8.2 mM + C10 16 mM				
Tiempo (min)	Cantidad acumulada por superficie (ng/cm ²)			
	1	2	3	4
30	1.34	1.05	0.68	1,20
60	2.96	2.29	2.44	2.85
90	4.83	4.21	4.52	4.18
120	7.42	6.58	6.68	6.93
150	11.36	9.88	10.55	10.06
P_{ef} (cm/s)	$8.41 \cdot 10^{-7}$	$7.56 \cdot 10^{-7}$	$6.72 \cdot 10^{-7}$	$6.39 \cdot 10^{-7}$
$P_{ef} \pm \text{d.e.} = 7.27 \cdot 10^{-7} \pm 0.91 \cdot 10^{-7} \text{ cm/s}$				

Cuadro 3.64 Cantidades acumuladas de manitol por unidad de superficie (ng/cm²) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de **manitol 8.2 mM** y **caprato sódico 16 mM (grupo K-2)**. Adicionalmente, se indica el coeficiente de permeabilidad individual (P_{ef}), así como el valor medio acompañado de su desviación estándar (d.e.).

Manitol 8.2 mM + C10 16 mM (40 min. pre-exposición)					
Tiempo (min)	Cantidad acumulada por superficie (ng/cm ²)				
	1	2	3	4	5
30	1.06	0.81	1.29	1.51	2.09
60	3.31	2.84	3.42	5.22	6.80
90	6.99	6.64	8.27	10.67	12.28
120	12.50	11.81	13.98	18.68	24.19
150	22.40	22.26	24.87	30.98	36.17
P_{ef} (cm/s)	$20.03 \cdot 10^{-7}$	$19.38 \cdot 10^{-7}$	$21.31 \cdot 10^{-7}$	$26.95 \cdot 10^{-7}$	$24.95 \cdot 10^{-7}$
$P_{ef} \pm \text{d.e.} = 22.52 \cdot 10^{-7} \pm 3.28 \cdot 10^{-7} \text{ cm/s}$					

Cuadro 3.65 Cantidades acumuladas de manitol por unidad de superficie (ng/cm²) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de **manitol 8.2 mM** y **caprato sódico 16 mM**, tras la pre-exposición de la monocapa celular a una solución de caprato sódico 16 mM durante 40 minutos (grupo K-3). Adicionalmente, se indica el coeficiente de permeabilidad individual (P_{ef}), así como el valor medio acompañado de su desviación estándar (d.e.).

Acamprosato 4.9 mM											
		Cantidad acumulada por superficie (ng/cm ²)									
		Transporte apical-basolateral (AB)					Transporte basolateral-apical (BA)				
Tiempo (min)		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4
30		1.56	3.16	6.40	4.85	5.63	5.11	5.34	5.49	5.56	5.96
60		5.45	6.22	10.01	8.92	10.96	10.04	10.56	10.82	11.09	11.07
90		8.18	8.78	15.01	13.61	15.89	14.26	14.22	14.50	15.11	14.53
120		10.93	12.32	17.74	16.50	19.01	18.69	17.19	17.14	18.21	17.68
150		14.20	14.94	20.93	18.87	21.19	21.87	19.68	20.10	21.08	20.01
P _{ef} (cm/s)		8.74·10 ⁻⁷	8.26·10 ⁻⁷	10.73·10 ⁻⁷	10.39·10 ⁻⁷	11.49·10 ⁻⁷	12.38·10 ⁻⁷	10.22·10 ⁻⁷	10.29·10 ⁻⁷	11.06·10 ⁻⁷	10.05·10 ⁻⁷
		P_{AB} ± d.e (cm/s)					P_{BA} ± d.e. (cm/s)				
		10.33·10⁻⁷ ± 1.58·10⁻⁷					10.40·10⁻⁷ ± 0.45·10⁻⁷				
		P_{BA}/P_{AB} ± d.e. = 1.01 ± 0.16									

Cuadro 3.66 Cantidades acumuladas de acamprosato por unidad de superficie (ng/cm²) en el compartimento receptor (apical, AB, ó basolateral, BA) a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de **acamprosato 4.9 mM** (Grupo experimental). Adicionalmente, se indican los coeficientes de permeabilidad medio en ambos sentidos, acompañados de sus desviaciones estándar (d.e.). Finalmente se muestra el valor del cociente P_{BA}/P_{AB} con su desviación estándar (d.e.).

Acamprosato 4.9 mM + C10 13 mM					
Tiempo (min)	Cantidad acumulada por superficie (ng/cm ²)				
	1	2	3	4	5
30	3.33	2.63	2.95	7.18	8.18
60	7.45	7.73	8.15	12.22	12.53
90	11.36	13.51	11.80	17.35	16.72
120	15.54	16.63	15.81	21.90	21.14
150	20.75	18.99	19.61	25.98	24.44
P_{ef} (cm/s)	$12.12 \cdot 10^{-7}$	$11.85 \cdot 10^{-7}$	$11.73 \cdot 10^{-7}$	$13.70 \cdot 10^{-7}$	$11.91 \cdot 10^{-7}$
$P_{ef} \pm \text{d.e.} = 12.26 \cdot 10^{-7} \pm 0.82 \cdot 10^{-7} \text{ cm/s}$					

Cuadro 3.67 Cantidades acumuladas de acamprosato por unidad de superficie (ng/cm²) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de **acamprosato 4.9 mM y caprato sódico 13 mM (grupo L-1)**. Adicionalmente, se indica el coeficiente de permeabilidad individual (P_{ef}), así como el valor medio acompañado de su desviación estándar (d.e.).

Acamprosato 4.9 mM + C10 16 mM				
Tiempo (min)	Cantidad acumulada por superficie (ng/cm ²)			
	1	2	3	4
30	2.26	4.68	6.24	6.25
60	9.88	9.76	12.57	13.02
90	14.35	13.59	19.04	18.68
120	18.22	17.85	24.42	23.52
150	23.12	25.86	30.45	29.48
P_{ef} (cm/s)	$14.26 \cdot 10^{-7}$	$14.30 \cdot 10^{-7}$	$15.94 \cdot 10^{-7}$	$15.07 \cdot 10^{-7}$
$P_{ef} \pm \text{d.e.} = 14.89 \cdot 10^{-7} \pm 0.79 \cdot 10^{-7} \text{ cm/s}$				

Cuadro 3.68 Cantidades acumuladas de acamprosato por unidad de superficie (ng/cm²) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de **acamprosato 4.9 mM y caprato sódico 16 mM (grupo L-2)**. Adicionalmente, se indica el coeficiente de permeabilidad individual (P_{ef}), así como el valor medio acompañado de su desviación estándar (d.e.).

Acamprosato 4.9 mM + C-10 16 mM (40 min. pre-exposición)					
Tiempo (min)	Cantidad acumulada por superficie (ng/cm ²)				
	1	2	3	4	5
30	4.38	2.10	3.99	4.81	5.53
60	10.09	7.21	10.33	10.64	12.15
90	16.41	16.51	16.77	15.77	19.89
120	25.75	27.36	27.85	24.43	33.52
150	35.94	37.35	39.25	34.32	43.50
P_{ef} (cm/s)	$22.57 \cdot 10^{-7}$	$25.74 \cdot 10^{-7}$	$25.29 \cdot 10^{-7}$	$21.51 \cdot 10^{-7}$	$25.75 \cdot 10^{-7}$
$P_{ef} \pm \text{d.e.}: 24.11 \cdot 10^{-7} \pm 1.99 \cdot 10^{-7} \text{ cm/s}$					

Cuadro 3.69 Cantidades acumuladas de acamprosato por unidad de superficie (ng/cm²) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de **acamprosato 4.9 mM** y **caprato sódico 16 mM**, tras la **pre-exposición** de la monocapa celular a una solución de caprato sódico 16 mM durante 40 minutos (grupo L-3). Adicionalmente, se indica el coeficiente de permeabilidad individual (P_{ef}), así como el valor medio acompañado de su desviación estándar (d.e.).

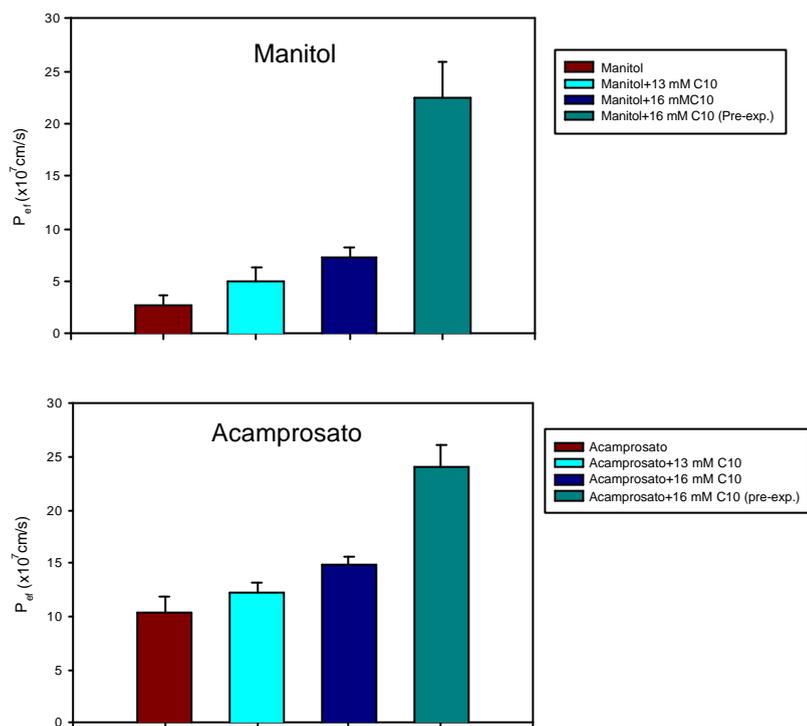


Figura 3.25 Representación gráfica de los valores de permeabilidad efectiva (P_{ef}) de **manitol** y **acamprosato** en ausencia y en presencia de **caprato sódico** (13, 16 y 16mM con pre-exposición de 40 minutos). Junto a los valores promedio se ha representado su desviación estándar (d.e.).

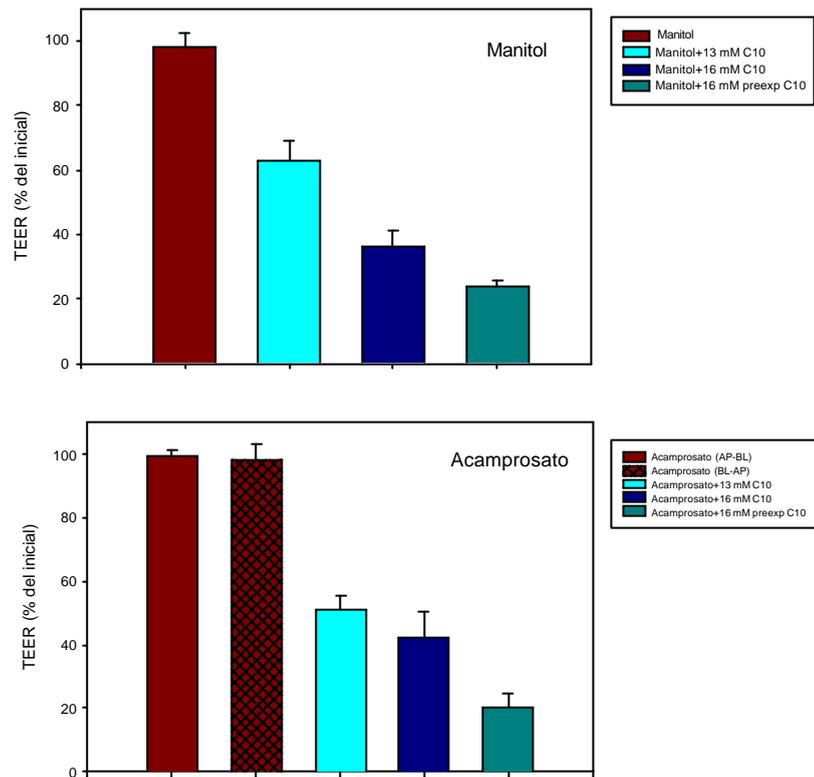


Figura 3.26 Representación gráfica de los valores medios y desviación estándar de la resistencia transepitelial (TEER), expresada como porcentaje del valor inicial, de la monocapa celular medida al finalizar cada uno de los ensayos (t=150 min).

C-10 (mM)	Manitol	Acamprosato
	P_{ef} ($\times 10^7$ cm/s)	P_{ef} ($\times 10^7$ cm/s)
0	2.80 \pm 0.85	10.33 \pm 1.58
13	4.95 \pm 1.33	12.26 \pm 0.82
16	7.27 \pm 0.91	14.89 \pm 0.79
16 (Pre-exp.)	22.52 \pm 3.28	24.11 \pm 1.99
Significación	P<0.001	P<0.001

Cuadro 3.70 Resumen de los valores medios y desviación estándar de las permeabilidades efectivas (P_{ef}) de **manitol** y **acamprosato** en ausencia y presencia de **caprato sódico (C-10)** a las concentraciones de 13, 16 y 16 mM tras una preexposición de 40 minutos de la monocapa celular a una solución de C-10 16 mM. Junto a los valores promedio se indica la correspondiente desviación estándar.

Manitol					Acamprosato				
C-10 (mM)	0	13	16	16 Pre	C-10 (mM)	0	13	16	16 Pre
0	-				0	-			
13	NS	-			13	NS	-		
16	S	NS	-		16	S	S	-	
16 Pre-exp.	S	S	S	-	16 Pre-exp.	S	S	S	-

Cuadro 3.71 Resultado de la prueba de comparación múltiple de Tukey de los valores de permeabilidad efectiva (P_{ef}) de **manitol** y **acamprosato** en ausencia y presencia del **caprato sódico** en las distintas condiciones de ensayo, para un nivel de significación global de P=0.05 (S: diferencias significativas; NS sin diferencias significativas)

	Manitol	Acamprosato
C-10 (mM)	TEER (%)	TEER (%)
0 (AP-BL)	98.3 ± 3.9 ^a	99.2 ± 2.4 ^a
0 (BL-AP)	-	98.4 ± 4.6 ^a
13	62.7 ± 6.5 ^b	51.1 ± 4.5 ^b
16	36.4 ± 4.7 ^c	42.2 ± 7.9 ^b
16 (Pre-exp)	23.7 ± 2.3 ^d	20.3 ± 4.0 ^c

Cuadro 3.72 Valores medios y desviación estándar de la resistencia transepitelial (TEER), expresada como porcentaje del valor inicial, de la monocapa celular medida al finalizar cada uno de los ensayos (t=150 min). Aquellos valores con superíndices distintos presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre ellos determinadas mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey.

4. DISCUSIÓN

4.1 MÉTODOS ANALÍTICOS

Para la realización de un estudio farmacocinético es necesario contar con un método de valoración sensible, exacto y preciso con el fin de poder cuantificar el fármaco en las muestras biológicas recogidas. Por ello, esta es la primera cuestión que se debe resolver cuando se aborda un estudio de esta índole.

Las técnicas de cromatografía líquido-líquido de alta eficacia (HPLC) son, en la actualidad, una excelente opción. Sin embargo, estudios previos en los que se empleó la cromatografía de alta eficacia con detección UV para la valoración de acamprosato, mostraron unos niveles de sensibilidad muy bajos (CHABENAT y cols., 1987, 1988 y 1989). En concreto, la cromatografía líquida sólo permite detectar concentraciones de fármaco superiores a 30 µg/ml aproximadamente.

Aunque se han empleado otros métodos analíticos para la cuantificación del acamprosato en muestras biológicas, sus resultados han sido poco satisfactorios. Tal y como se ha indicado en el *Epígrafe 1.1.2* el acamprosato o acetilhomotaurinato cálcico es altamente soluble en agua y en la mayoría de fluidos biológicos, donde se encuentra casi totalmente disociado (CHABENAT y cols., 1988). En concreto se disocia en dos moléculas de acetilhomotaurina y un ión calcio. La detección directa mediante espectrofotometría UV del acetilhomotaurinato, es un método poco sensible, por lo que en 1987 se propuso un método analítico alternativo que consiste en hidrolizar la acetilhomotaurina a homotaurina. A continuación se puede derivatizar el grupo amino primario funcional de la homotaurina con o-ftalaldehído (CHABENAT y cols., 1987). El derivado formado se puede detectar mediante fluorescencia o detección electroquímica, hasta niveles de sensibilidad del orden de nanogramos o picogramos.

Sin embargo, algunos autores (GIRAULT y cols., 1990) consideran que esta técnica no es lo suficientemente específica para estudiar la farmacocinética y biodisponibilidad de este fármaco, proponiendo el empleo de un método de cromatografía de gases combinado con espectrometría de masas. Este último método permite cuantificar con precisión y exactitud los niveles de acetilhomotaurinato tras su administración. Además puede ser de gran utilidad en los ensayos clínicos desarrollados en humanos debido a su elevada sensibilidad. Sin embargo, su aplicación en un animal de experimentación pequeño, como es la rata Wistar, parece poco viable puesto que necesita un elevado volumen de plasma (1ml) para realizar la cuantificación.

Como se puede apreciar, el empleo de la técnica analítica adecuada es crucial para el correcto desarrollo de este tipo de estudios. Así, determinados autores (SAIVIN y cols., 1998) sugieren, que las distintas técnicas analíticas empleadas por los diferentes autores para la valoración del acamprosato en orina y plasma, puede ser la causa de la disparidad de resultados obtenidos. De este modo mientras que *Jaillon y Salvat en 1991 empleando como método de valoración del fármaco la cromatografía líquida de alta resolución, determinaron que en el ser humano se excreta aproximadamente el 90% de la dosis administrada de forma inalterada a través de la orina, *Fourtillan en 1990 utilizando la cromatografía gaseosa en conjunción con espectrometría de masas obtuvo un 49% para este mismo parámetro.

Para la realización de la presente Memoria, se seleccionó como técnica analítica la medida de la radiactividad del ^{14}C -acamprosato por medio de un contador de centelleo en fase líquida. Esta técnica es extremadamente sensible y no necesita un volumen elevado para su cuantificación. Sin embargo, su mayor inconveniente radica en su falta de especificidad. Por lo tanto, para extraer cualquier conclusión acerca de la farmacocinética del acamprosato a partir del conteo radiactivo, se debe tener la certeza de que no exista ningún proceso de metabolismo o degradación química de la molécula. En este sentido, diversos autores han demostrado que la acetilhomotaurina es estable en el plasma (CHABENAT y cols., 1987) y no se metaboliza a homotaurina en el medio biológico (SOYKA, 1996; SAIVIN y cols., 1998).

No obstante, en la presente Memoria, con la finalidad de confirmar la ausencia de procesos metabólicos o de degradación química del acamprosato, se ha estudiado la integridad tanto del acamprosato (grupo experimental **A-1**) como del ^{14}C -acamprosato (grupos **C-1**, **C-2** y **C-3**) en la orina de los animales tratados. Para ello se empleó un método de HPLC con detección UV que permite la detección de la acetilhomotaurina. Este método, puesto a punto en nuestro laboratorio, permite un análisis rápido y específico de los elevados niveles de fármaco presentes en la orina. Los resultados obtenidos en los ensayos de determinación de la fracción de acamprosato inalterado excretado en la orina (*Cuadro 3.7*) han puesto de manifiesto que el 95.0 ± 13.9 % de la dosis administrada de fármaco (22 mg por vía intravenosa rápida) aparece de forma inalterada en la orina de los animales tratados.

Adicionalmente, las muestras de orina obtenidas en los ensayos de estimación del aclaramiento total y renal en estado estacionario se sometieron a análisis mediante HPLC. A continuación se recogió la fracción correspondiente al pico cromatográfico de acetilhomotaurina. El conteo mediante centelleo líquido de la fracción recogida demuestra que el ^{14}C -acamprosato también aparece inalterado en la orina de los animales (el porcentaje medio de recogida de radiactividad en la fracción obtenida tras su inyección en el sistema cromatográfico correspondió a 101 ± 18 % de la muestra biológica original).

En consecuencia, nuestros resultados confirman los resultados previos de otros autores acerca de la estabilidad del acamprosato en el medio biológico y ausencia de metabolismo y justifican el empleo del conteo de centelleo en fase líquida como un

método analítico adecuado para nuestras condiciones experimentales. La técnica presenta un límite de sensibilidad que nos permite cuantificar, con un bajo error, la radiactividad (≤ 200 Cpm) presente en las muestras correspondientes a los últimos tiempos experimentales, permitiendo un análisis más prolongado en el tiempo.

4.2 ESTUDIO DE LA ELIMINACIÓN DEL ACAMPROSATO

Los resultados obtenidos en la presente Memoria indican claramente que:

- La farmacocinética del acamprosato en la rata es lineal al menos en el ámbito de concentraciones plasmáticas ensayadas.
- El fármaco se elimina inalterado fundamentalmente mediante excreción renal siendo los mecanismos implicados la filtración glomerular y la secreción tubular activa.
- El probenecid es capaz de inhibir la excreción renal del acamprosato y, por tanto, alterar su disposición en la rata.

4.2.1 Linealidad cinética y eliminación del acamprosato

El estudio de la linealidad farmacocinética del acamprosato se ha realizado tras la administración intravenosa rápida de tres dosis diferentes del fármaco (2.8, 11 ó 22 mg), que equivalen a 9.3, 36.6 y 73.3 mg/kg, entre las que se incluye la dosis empleada en humanos (11 mg/kg).

La comparación de los principales parámetros farmacocinéticos del fármaco ($t_{1/2}$, $Vd_{(ss)}$, AUC_0^∞ , Cl_t , U_0^{24} , C_0 , k_{12} , k_{21} , k_{10} y MRT) obtenidos en los grupos **B-1**, **B-2** y **B-3** no reveló ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Cuadros 3.20 y 3.21) evidenciando un comportamiento lineal de su farmacocinética.

No obstante, la linealidad en la disposición del acamprosato se manifiesta de forma patente cuando se estudian los valores del parámetro AUC_0^∞ obtenidos con las tres dosis ensayadas (2.8, 11 y 22 mg), que son 467.76 ± 52.40 , 1970.6 ± 152.0 y 3898.8 ± 324.7 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$. El análisis estadístico (ANOVA) realizado sobre los valores de AUC_0^∞ , normalizados para la menor de las dosis ensayadas, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellos (*Cuadro 3.20*); es decir, los valores de AUC_0^∞ crecieron linealmente con el incremento en las dosis ensayadas. Este crecimiento prácticamente lineal en los valores de AUC_0^∞ , conduce a unos valores de Cl_t equivalentes, desde el punto de vista estadístico, para el acamprosato en los animales de los grupos experimentales **B-1**, **B-2** y **B-3** (6.04 ± 0.67 , 5.60 ± 0.44 y 5.72 ± 0.51 ml/min respectivamente).

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los obtenidos por otros autores (*JAILLON y SALVAT, 1991) en humanos sanos. Aunque no se aportan datos exhaustivos sobre la farmacocinética del acamprosato tras su administración intravenosa, estos autores no encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de semivida biológica ni en la fracción de dosis excretada en orina en 24 horas tras la perfusión intravenosa (10 minutos) de 10, 20 y 30 mg/kg de acamprosato, al igual que ha ocurrido en nuestros experimentos.

Del mismo modo, los resultados obtenidos en nuestros experimentos de perfusión intravenosa a velocidad constante vienen a corroborar las afirmaciones hasta ahora realizadas. Así, los valores de la concentración plasmática media del acamprosato en estado estacionario (C_{SS}) obtenidas en los ensayos en los que se administró el fármaco mediante perfusión intravenosa a tres velocidades de perfusión diferentes (2.6, 132.5 y 530 $\mu\text{g}/\text{min}$) crecieron linealmente con la dosis (el análisis estadístico (ANOVA), realizado sobre los valores de C_{SS} , normalizados para la menor de las dosis ensayadas, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellos (*Cuadro 3.25*)).

A la luz de todas las experiencias realizadas, se puede concluir que el acamprosato presenta una disposición lineal en el ámbito de concentraciones estudiadas, tanto en condiciones de estado estacionario como tras una administración intravenosa rápida. Este hecho es significativo, pues simplifica enormemente el diseño de pautas posológicas en los tratamientos con acamprosato.

En lo relativo a la eliminación del acamprosato, los resultados obtenidos en la presente Memoria indican claramente que este fármaco se elimina inalterado vía renal casi en exclusividad. Son varios los experimentos que lo confirman. Por un lado, en los ensayos de determinación de las curvas de nivel plasmático tras la administración intravenosa rápida de tres dosis de acamprosato se obtuvo un valor promedio de $\overline{U}_0^{24} = 95.5 \pm 2.77\%$. Por otro lado, los experimentos de determinación de la fracción inalterada de acamprosato en orina tras su administración intravenosa rápida arrojaron un valor promedio de $95.0 \pm 13.9\%$ en las 6 horas posteriores a la administración, y por último los experimentos realizados en estado estacionario indican que el Cl_r corresponde al $96.0 \pm 1.02\%$ del Cl_t (ver Cuadro 3.25).

Llama la atención los elevados valores de aclaramiento total y renal encontrados para el acamprosato. Así, el aclaramiento total obtenido tras la administración intravenosa rápida del fármaco osciló entre 6.04 ± 0.67 y 5.60 ± 0.44 ml/min, valores prácticamente equivalentes al valor del flujo plasmático renal en la rata, que según la bibliografía se sitúa en torno a 5.89 ± 1.73 ml/min (GRANERO y cols., 1993), y que claramente sobrepasa la tasa de filtración glomerular (GFR) (2.76 ± 0.10 ml/min) en el mencionado animal (GRANERO y cols., 1994). El mismo comportamiento puede observarse en los resultados obtenidos en los experimentos realizados en estado estacionario; así, se puede observar que el valor de Cl_r determinado en condiciones de estado estacionario en los tres grupos experimentales (4.60 ± 0.42 ml/min (grupo C-1), 4.28 ± 0.52 ml/min (grupo C-2), 4.08 ± 0.67 ml/min (grupo C-3)) supera la tasa de filtración glomerular calculada en cada experimento (el cociente Cl_r / GFR siempre ha sido claramente superior a 1).

Estos resultados evidencian, que la filtración glomerular no es el único mecanismo de excreción renal implicado en la eliminación del fármaco, debiendo existir también algún proceso de secreción tubular activa, altamente efectivo, que sería responsable del alto valor de Cl_r obtenido.

Los procesos de secreción tubular activa son susceptibles de saturarse cuando se incrementan los niveles plasmáticos del fármaco, ocasionando una disminución progresiva de los valores de aclaramiento total y aclaramiento renal, conduciendo a la aparición de no linealidades en la cinética del fármaco. Sin embargo, no parece ser éste el caso del acamprosato, puesto que tal y como se indicó anteriormente, no se

detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de Cl_t de los tres grupos experimentales **B-1**, **B-2** y **B-3** (Cuadro 3.20) ni entre los valores de Cl_t o Cl_r de los grupos **C-1**, **C-2** y **C-3**. Por tanto, todo parece indicar que el proceso de secreción tubular no sólo parece poseer una elevada eficacia, sino también una alta capacidad, siendo difícil lograr su saturación.

Aunque en los resultados obtenidos en los experimentos realizados en estado estacionario no se identificaron de un modo significativo diferencias entre los valores de Cl_t y Cl_r (Cuadro 3.24), sí se puede observar que estos parámetros muestran una tendencia a disminuir a medida que aumenta la concentración de fármaco perfundida. Por ejemplo, los valores de Cl_r disminuyeron desde 4.60 ± 0.42 ml/min para una velocidad de perfusión de $2.6 \mu\text{g}/\text{min}$, pasando por 4.28 ± 0.52 ml/min para la velocidad de perfusión intermedia ($132.5 \mu\text{g}/\text{min}$) hasta 4.08 ± 0.67 ml/min obtenida con una velocidad de perfusión de $530 \mu\text{g}/\text{min}$. Los valores de Cl_t muestran un comportamiento similar, hecho totalmente lógico si consideramos que el Cl_r es aproximadamente el 96% del Cl_t . Aunque este hecho podría deberse a un cierto grado de saturación del proceso de excreción renal del acamprosato en la rata, tampoco descartamos que la disminución observada sea debida, probablemente, a un progresivo fracaso renal ocasionado por el propio fármaco: de hecho cuando se intentaron determinar los valores de Cl_t y Cl_r para un valor de $C_{ss} = 500 \mu\text{g}/\text{ml}$, los tres animales con los que se iniciaron las experiencias fallecieron durante el ensayo.

El análisis de los escasos datos procedentes de la bibliografía también parece indicar la existencia de un proceso de secreción tubular en la excreción renal del compuesto en la especie humana. Así, *Jaillon y Salvat determinaron en voluntarios sanos, a los que se administró el acamprosato por vía intravenosa a las dosis de 10, 20, y 30 mg/kg, un valor de aclaramiento renal del acamprosato de 200 ml/min, es decir, superior a la GFR media en humanos que se sitúa en torno a 125-130 ml/min (NOTARI, 1987). Además también observaron que los valores de Cl_t y Cl_r sufren reducciones importantes, pasando el Cl_t de acamprosato desde 24.12 ± 14.88 l/h para la menor de la dosis ensayadas hasta 14.22 ± 2.82 l/h para la dosis de 30 mg/kg. Aunque los autores no detectaron diferencias significativas, la tendencia mostrada en sus resultados coincide con los obtenidos, en la presente Memoria, en la rata Wistar.

4.2.2 Efecto del probenecid en la farmacocinética del acamprosato

Con objeto de confirmar la existencia de un proceso de secreción tubular activa implicado en la eliminación del acamprosato, se diseñaron una serie de experimentos en los que se administró conjuntamente acamprosato con probenecid. El probenecid es un conocido inhibidor de la secreción tubular activa de muchos fármacos (GIBALDI y PERRIER, 1982). La potencial interacción entre ambas sustancias fue estudiada en dos grupos experimentales, **D-1** y **D-2**, a los que se administró por vía intravenosa rápida **10** ó **20 mg de probenecid** 10 minutos antes de la administración del acamprosato. Las curvas de nivel plasmático obtenidas se muestran en la *Figura 3.15*. Como se puede observar, los niveles plasmáticos promedio del fármaco en los animales de los grupos **B-1** y **B-2** son claramente superiores a los obtenidos para el grupo **A-1** (misma dosis de acamprosato pero sin administración del inhibidor). El análisis estadístico de los valores de AUC_0^∞ para los grupos **B-1**, **D-1** y **D-2** mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres valores comparados ($p < 0.001$), y también un descenso significativo de los valores de aclaramiento total ($p < 0.001$) como consecuencia del tratamiento con probenecid. Así, los valores de aclaramiento total tras administración de probenecid fueron, aproximadamente, el 57 por ciento (para el grupo B-1) y 44 por ciento (para el grupo B-2) del valor de Cl_t calculado para el grupo B-1.

De este modo, los resultados de estos experimentos confirman la existencia de un mecanismo de secreción tubular activa a nivel renal para el acamprosato. Este mecanismo es responsable de los elevados valores del Cl_t y Cl_r del fármaco, que en condiciones normales, son claramente superiores a la tasa de filtración glomerular. Además, el probenecid es capaz de reducir el valor aclaramiento total hasta valores próximos a la GFR, tal y como se aprecia en el *Cuadro 3.34* correspondiente al grupo **D-2**. De hecho, la comparación estadística entre el Cl_t de acamprosato obtenido en el grupo **D-2** (2.68 ± 0.14 ml/min) y la GFR calculada en estado estacionario en el grupo **C-1** (2.66 ± 0.17 ml/min) no reveló la existencia de diferencias significativas. A la luz de estos resultados, se puede concluir que la dosis de 20 mg de probenecid es capaz de bloquear completamente, en nuestras condiciones de ensayo, la secreción tubular activa sufrida por el acamprosato.

Llama la atención, sin embargo, que la tendencia de disminución observada para los valores de Cl_t y k_{10} no se mantuviera para el caso de la constante de disposición lenta **b** para la que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Así, mientras que en el grupo **B-1**, el acamprosato presentaba una semivida de 19.13 ± 1.49 minutos, en los grupos **D-1** y **D-2** (en presencia de probenecid) este valor fue respectivamente de 18.07 ± 1.24 y 20.76 ± 1.37 minutos. Estos resultados, se podrían explicar teniendo en cuenta la posible existencia de un error analítico en la determinación de las concentraciones plasmáticas del acamprosato correspondientes al último tiempo experimental del grupo **B-1**. Para estas muestras la relación señal/ruido fue próxima a 1, lo que podría haber falseado por exceso el valor de concentración del fármaco. Este falseamiento habría conducido a una sobreestimación del valor de semivida en fase **b** del grupo **B-1** y por tanto a la obtención de estos resultados. Futuros experimentos en los que se administrará una dosis mayor de ^{14}C -acamprosato, permitirán aclarar este punto.

La interacción entre el acamprosato y el probenecid, puesta de evidencia en el presente trabajo, puede ser relevante desde el punto de vista clínico, puesto que se podrían obtener los mismos niveles plasmáticos de fármaco (mismo efecto farmacológico) utilizando una menor dosis pero coadministrándolo con probenecid. Ello se traduciría en un gran beneficio no sólo de tipo clínico, puesto que se reducirían los efectos adversos, debidos según la mayor parte de autores, al catión Ca^{+2} que forma parte de la molécula, sino también de tipo económico, ya que se podrían abaratar los tratamientos que, recordemos, duran entre 6 y 12 meses. Paralelamente, la existencia de la secreción tubular como mecanismo de eliminación abre la puerta a posibles interacciones medicamentosas: la coadministración de acamprosato y fármacos que se eliminan mediante secreción tubular activa, podría inducir cambios significativos en la farmacocinética y por extensión en los efectos farmacológicos de ambos compuestos, hecho muy a tener en cuenta en los tratamientos de larga duración.

4.3 ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE ACAMPROSATO

Uno de los problemas que presenta la terapia con acamprosato es su reducida biodisponibilidad oral en magnitud que, según la bibliografía, se sitúa entorno a un 11% en humanos (SAIVIN y cols., 1998). Este hecho comporta un reducido aprovechamiento del fármaco por parte del organismo. Además, es de sobra conocido que valores pequeños de biodisponibilidad conducen a una elevada variabilidad en las concentraciones plasmáticas y por extensión en los efectos farmacológicos buscados (AUNGST, 2000).

De acuerdo con los resultados presentados en la presente Memoria, el acamprosato se excreta de forma inalterada a través de la orina de los animales, es decir, se elimina completamente por vía renal y sin sufrir ningún tipo de metabolismo. Además, este fármaco es una molécula con un elevado carácter hidrofílico y que presenta una gran estabilidad química en cualquier fluido biológico (CHABENAT y cols., 1988). Por tanto, a tenor de las premisas expuestas, se podría considerar que la principal causa de la baja biodisponibilidad del fármaco podría ser su escasa permeabilidad intrínseca a través de la mucosa intestinal.

Con el objetivo de confirmar esta hipótesis y profundizar en el estudio del mecanismo de absorción intestinal del acamprosato se desarrollaron todos los experimentos que se discuten a continuación.

4.3.1 Administración por vía oral de acamprosato

Según se ha expuesto en el capítulo de Antecedentes el conocimiento acerca de los mecanismos implicados en la absorción del acamprosato es escaso. En general, los escasos estudios publicados coinciden en que la absorción del fármaco es lenta en velocidad y pobre en magnitud lo que conduce a unos valores de biodisponibilidad en magnitud en humanos de aproximadamente un 11% (*FOURTILLAN, 1990; *SCOTT, 1991). Sin embargo, no existen en la bibliografía especializada, datos sobre la

biodisponibilidad del acamprosato en animales de experimentación. Para abordar este estudio se seleccionó la rata como modelo animal porque además de tener adaptadas todas las técnicas quirúrgicas al mismo, autores como He y cols. (1998) han demostrado que este modelo animal es mucho más apto para la realización de estudios de predicción de la biodisponibilidad en humanos que otras especies como por ejemplo el perro. Estos autores han demostrado que existe una buena correlación entre los valores de biodisponibilidad obtenidos en rata y en humanos, especialmente para sustancias de naturaleza hidrofílica y que se excreten de forma inalterada a través de la orina.

Como se ha puesto de manifiesto en la presente Memoria el acamprosato es una sustancia hidrofílica que no se metaboliza y que se excreta prácticamente en su totalidad ($\cong 96\%$) de forma inalterada a través de la orina (ZORNOZA y cols., 2000). Asimismo en los ensayos realizados en este Trabajo, correspondientes a determinación de la fracción inalterada de acamprosato en orina tras administración intravenosa rápida se demostró la elevada velocidad con que transcurre el proceso de eliminación, obteniéndose casi el 80% y el 95% de la dosis administrada durante el periodo 0-3 y 0-6 horas postadministración respectivamente. Además, en esta Memoria se ha evidenciado que tras la administración oral del acamprosato, éste se elimina inalterado prácticamente en su totalidad en orina y heces (20% en orina y 80% en heces). Todas estas premisas justifican que la fracción de dosis excretada en la orina de los animales tratados durante las 24 horas posteriores a su administración por vía oral, sea un excelente indicador de la biodisponibilidad oral en magnitud del mismo.

Nuestros resultados demuestran que la biodisponibilidad oral en magnitud del acamprosato en la rata se sitúa entorno al 20%. Hay que remarcar que el valor de biodisponibilidad estimado en la rata prácticamente duplica al obtenido en humanos, más cuando los resultados de biodisponibilidad en este animal tienden a estar infraestimados con respecto al ser humano (HE y cols., 1998). Esta discrepancia se podría explicar teniendo en cuenta que el acamprosato se comercializa como comprimido con recubrimiento gastrorresistente, mientras que en nuestros estudios el fármaco se ha administrado como solución acuosa. En primer lugar esto implica que en nuestras condiciones experimentales, el fármaco se encuentra disuelto, disponible para poder ser absorbido, evitando los procesos de disgregación y disolución que preceden a la absorción propiamente dicha en el caso de un comprimido. Además, este tipo de comprimidos gastrorresistentes, debido a su elevado tamaño presentan un vaciado

gástrico lento y muy variable, contribuyendo de esta forma a la variabilidad detectada en su biodisponibilidad y efecto farmacológico. Por tanto, la elevada hidrofilia de esta molécula, unido a una más que probable forma farmacéutica inadecuada, desemboca en la pobre biodisponibilidad cuantificada en humanos. Desde un punto de vista biofarmacéutico, la administración del acamprosato incluido en otra forma farmacéutica como por ejemplo en microcápsulas recubiertas, las cuales presentan un tamaño de partícula mucho menor y sufren un vaciado gástrico progresivo, podría conducir a un mayor aprovechamiento de las dosis administradas.

Los resultados obtenidos por *Fourtillan en 1990, sugerían la existencia de un fenómeno FLIP-FLOP en la farmacocinética del acamprosato tras su administración oral, puesto que la semivida de eliminación que obtuvieron tras la perfusión intravenosa (3.2 ± 0.2 horas) fue muy distinta de la obtenida tras la administración por vía oral (32.7 ± 4.3 horas). A la luz de nuestros resultados, el valor de las pendientes terminales (I_2) calculadas a partir de los niveles plasmáticos de acamprosato obtenidos tras la administración oral de 2.8 y 22 mg fueron de 0.006 ± 0.001 y $0.005 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$, respectivamente, las cuales son aproximadamente un orden de magnitud menores que las obtenidas tras la administración intravenosa de las mismas dosis de fármaco (0.036 ± 0.003 y $0.038 \pm 0.006 \text{ min}^{-1}$). Este hecho hace sospechar que la pendiente terminal obtenida en los ensayos tras la administración oral del fármaco, no es la representativa del proceso de eliminación del fármaco.

Además, se puede observar que el valor de las pendientes terminales obtenidas tras la administración oral del acamprosato (I_2) expresadas en unidades de horas^{-1} (0.36 h^{-1} en el grupo **E-1** y 0.30 h^{-1} en el grupo **E-2**) prácticamente coinciden con la k_a del acamprosato ($0.36 \pm 0.12 \text{ h}^{-1}$) determinada en el *estudio topográfico de la absorción intestinal* del fármaco *in situ*.

Así pues, todos los datos sugieren que el tramo ascendente que se visualiza en las curvas de nivel plasmático obtenidas tras la administración oral del acamprosato (I_1) define el proceso de eliminación del fármaco, mientras que la pendiente terminal (I_2) corresponde al proceso de absorción.

Por tanto, nuestros resultados coinciden con la hipótesis postulada por Fourtillan (1990) y claramente evidencian la existencia de un comportamiento FLIP-FLOP en la farmacocinética del acamprosato tras su administración por vía oral, confirmando

nuevamente la lenta absorción del fármaco a nivel intestinal.

4.3.2 Estudio topográfico de la absorción intestinal de acamprosato

En el año 2000 Más-Serrano y cols. publicaron un trabajo en el que se demostraba que la absorción del acamprosato se produce principalmente mediante difusión pasiva, aunque también señalaban que algunos transportadores, fundamentalmente de aminoácidos, están implicados, aunque de modo muy minoritario, en el proceso de absorción del compuesto (MÁS-SERRANO y cols., 2000). Adicionalmente, y a tenor de los resultados, los autores postularon la posible existencia de un mecanismo de secreción intestinal, mediado por la glicoproteína P, como posible responsable de la baja biodisponibilidad del fármaco.

Teniendo en cuenta los resultados de Más-Serrano y cols. se plantearon, en la presente Memoria, una serie de experimentos con el objetivo de determinar la posible existencia de una zona de absorción preferente a lo largo del intestino delgado de la rata, debida a la localización de transportadores de aminoácidos en algún tramo intestinal o simplemente a una diferente permeabilidad a lo largo del canal intestinal tal y como se ha descrito para algunas moléculas (ARTURSSON y cols., 1993), que pudiera explicar la baja biodisponibilidad oral en magnitud del acamprosato.

Para desarrollar este estudio se perfundió, *in situ*, en tres tramos diferentes del intestino delgado de la rata, una solución de acamprosato 1.38 mM. Los valores promedio de k_a obtenidos en cada uno de los tres tramos del intestino delgado estudiados (proximal, medio ó distal), no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Cuadro 3.47).

Así pues, todas las evidencias experimentales parecen indicar que:

- 1) La absorción del acamprosato no varía a lo largo del intestino delgado de la rata.
- 2) El valor medio de constante aparente de velocidad de absorción del acamprosato puede ser considerado como un valor relativamente pequeño ($k_a = 0.36 \pm 0.12 \text{ h}^{-1}$)

- 3) La baja permeabilidad intestinal del acamprosato parece ser la principal causa de la baja biodisponibilidad del acamprosato tras su administración oral.

4.3.3 Promoción de la absorción intestinal del acamprosato

A) Ensayos *in situ* e *in vitro*

Desde el punto de vista fisicoquímico, el acamprosato se caracteriza por presentar una elevada hidrofilia y ser capaz de solubilizarse fácilmente en la mayoría de fluidos biológicos. Además este fármaco, formulado como sal cálcica, se encuentra prácticamente disociado (98%) en medio acuoso de manera que el ácido acetilhomotaurínico presenta un grupo funcional fuertemente cargado. Estas características fisicoquímicas del acamprosato probablemente responsables de su baja biodisponibilidad oral hacen que, a priori, sea un excelente candidato para beneficiarse del empleo de excipientes capaces de promover su absorción intestinal (AUNGST, 2000).

Una de las estrategias para aumentar la biodisponibilidad oral de moléculas con marcado carácter hidrofílico es el empleo de promotores de la absorción intestinal (AUNGST, 1996). Existe una gran variedad de compuestos catalogados como promotores de la absorción intestinal de entre los cuales se pueden destacar los tensioactivos y los ácidos grasos de cadena media. Dentro de estas categorías se seleccionaron como potenciales promotores de la absorción intestinal del acamprosato un tensioactivo no iónico, el **polisorbato 80**, y un ácido graso de cadena media, el **caprato sódico (C10)**. Un aspecto fundamental en el diseño de los experimentos de promoción de la absorción es la selección de la concentración del promotor, puesto que muchos presentan pequeñas diferencias entre su concentración eficaz y su concentración tóxica (WARD y cols., 2000). Las distintas concentraciones de promotor ensayadas en esta Memoria, se seleccionaron siguiendo las directrices reseñadas en la bibliografía (BERMEJO y cols., 1991; MARTÍNEZ-COSCOLLÁ y cols., 1993; ANDERBERG y cols., 1993; KNIPPT y cols., 1997; SAKAI y cols., 1997; LINDMARK y cols., 1998; CHAO y cols., 1999).

El polisorbato 80 es un tensioactivo no iónico que ha demostrado una capacidad notable para incrementar los valores de la k_a de moléculas hidrofílicas (BERMEJO y cols.,

1991; ANDERBERG y cols. 1992; REGE y cols., 2002). Parece actuar aumentando la polaridad de la membrana absorbente, lo que mejora la difusión a través de la ruta transmembrana de estas moléculas con cierta hidrofilia. No obstante, en nuestras condiciones experimentales (**ensayos *in situ***) el polisorbato 80 no sólo no fue capaz de aumentar los valores de k_a del fármaco sino que, como se aprecia en el *Cuadro 3.52*, el análisis estadístico reveló la existencia de una disminución significativa en el valor de k_a del acamprosato en presencia del polisorbato 80. Aunque los efectos que los tensioactivos no iónicos ejercen sobre la membrana absorbente son complejos y no se conocen en su totalidad, la ausencia de efecto promotor del polisorbato 80 permite sospechar, en principio, que la ruta difusional más probable empleada por el acamprosato no sería la ruta transcelular.

En lo relativo al caprato sódico, la mayoría de autores consideran que el caprato sódico es capaz de aumentar la absorción intestinal de muchos compuestos de naturaleza hidrofílica mediante el incremento de la difusión a través de la ruta paracelular (ANDERBERG y cols., 1993; TAKAHASHI y cols., 1994; SAKAI y cols., 1997; SÖDERHOLM y cols., 2002), aunque su mecanismo de acción no está completamente dilucidado.

El estudio de la influencia del caprato sódico en la absorción intestinal del acamprosato se abordó con un doble objetivo, el estudio de la influencia de la concentración del promotor (13 y 16 mM), así como la influencia del tiempo de exposición del mismo. Los resultados que se muestran en el *Cuadro 3.56* indican que, en nuestras condiciones experimentales y en el ámbito de concentraciones estudiadas, el caprato sódico es capaz de incrementar de 1,75 a 2 veces la constante de velocidad de absorción del acamprosato; sin embargo este efecto no es concentración-dependiente. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Anderberg y cols. en 1993, quienes ensayaron distintas soluciones de C10 (10, 13, 16, 18 y 23 mM) sobre monocapas de células Caco-2. Estos autores detectaron un aumento significativo en la permeabilidad efectiva del manitol, de manera que el efecto del promotor aumentaba significativamente al incrementarse la concentración del ácido graso.

En lo referente al estudio de la influencia del tiempo de exposición del promotor sobre la mucosa intestinal, éste se diseñó en base a los resultados obtenidos por Anderberg y cols. (1993), quienes observaron que el incremento en la permeabilidad del manitol y de la penicilina V en presencia de caprato sódico a concentraciones superiores a 13 mM

(especialmente a 16 mM) sobre monocapas de células Caco-2, era dependiente del tiempo de exposición del promotor. Sin embargo, nuestros resultados obtenidos tras una exposición previa (40 min) de la mucosa intestinal al caprato sódico a una concentración 16 mM no revelaron ningún incremento en los valores de k_a del fármaco con respecto a los grupos control correspondientes. Por tanto, en nuestras condiciones experimentales tampoco se pudo poner en evidencia que el efecto promotor del C10 sea dependiente del tiempo de exposición.

No obstante, la literatura al respecto también muestra datos que apoyan nuestras observaciones. De hecho, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Takahashi y cols. en 1994 quienes empleando una técnica de perfusión *in situ*, estudiaron desde un punto de vista farmacocinético la acción promotora del caprato sódico en el intestino delgado de la rata. Estos autores concluyeron que en sus condiciones de trabajo, el caprato sódico presentaba un efecto promotor de la absorción de la fenolsulfoftaleína, compuesto modelo de baja absorción, que no era dependiente de su concentración. Adicionalmente otros autores (RAOOF y cols., 2002) comprobaron que el caprato sódico es capaz de incrementar la absorción intestinal de varios oligonucleótidos en el cerdo, tras su administración intraduodenal, de forma dosis-independiente. Por tanto, el hecho de haber desarrollado los estudios sobre sustratos experimentales diferentes (perfusión *in situ* en intestino delgado de rata versus monocapas celulares Caco-2) podría explicar estas diferencias. Con el fin de confirmar esta última aseveración e intentar dilucidar esta controversia, se realizaron los correspondientes **estudios *in vitro*** de promoción de la absorción del acamprosato empleando monocapas de células Caco-2. En estos ensayos se estudió el efecto de la concentración y tiempo de exposición del caprato sódico sobre la permeabilidad del acamprosato y adicionalmente sobre la del manitol, conocido marcador del paso a través de la ruta paracelular (MADARA, 1998).

Curiosamente, los resultados obtenidos en estos ensayos *in vitro* mostraron que el efecto promotor que el caprato sódico ejerce tanto sobre el manitol como sobre el acamprosato es concentración y tiempo-dependiente, obteniéndose el mayor efecto promotor tras la pre-exposición durante 40 minutos de la monocapa celular frente a una solución de C10 16 mM. Por tanto, el sustrato experimental sobre el que se desarrollan los estudios sí que realmente parece influir en los resultados obtenidos.

En el siguiente *Cuadro* se resumen los porcentajes de P_{ef} , calculados con respecto al

control, en las diferentes condiciones de ensayo:

	13 mM C10	16 mM C10	16 mM C10 (Pre-exp.)
P_{ef} manitol (% del control)	176.8	259.6	804.3
P_{ef} acamprosato (% del control)	118.7	144.1	233.4

Como se observa, en el caso del acamprosato se consiguió incrementar su valor de P_{ef} hasta en un 233%, mientras que para el manitol se alcanzó hasta el 804% del valor control (en ausencia de promotor). Probablemente el distinto grado de promoción observado para ambas moléculas pueda deberse a la diferente permeabilidad intrínseca de cada compuesto, así como al mecanismo específico empleado por el caprato sódico para ejercer su efecto promotor.

Asimismo, en este bloque de experimentos *in vitro* se determinó la P_{ef} del acamprosato en los dos sentidos difusionales (apical-basolateral y basolateral-apical). El valor de permeabilidad efectiva del acamprosato determinado en sentido apical-basolateral ($10.33 \cdot 10^{-7} \pm 1.58 \cdot 10^{-7}$ cm/s) no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al valor obtenido en sentido basolateral-apical ($10.40 \cdot 10^{-7} \pm 0.45 \cdot 10^{-7}$ cm/s). También se calculó el cociente $P_{ef(BL-AP)} / P_{ef(AP-BL)}$ según se ha descrito en el *Epigrafe 2.4.3.3.6* obteniéndose un valor muy próximo a la unidad, concretamente 1.01 ± 0.16 . Este resultado parece confirmar la ausencia de transportadores específicos implicados en la absorción del acamprosato y también permite descartar la existencia de un proceso de secreción activa. Si a estos resultados unimos los obtenidos en ensayos previos en los que se observó una ausencia de efecto del verapamilo (conocido inhibidor de la glicoproteína P) en la absorción intestinal del acamprosato, se podría descartar con una alta fiabilidad que el fármaco sea sustrato de transportadores intestinales como la glicoproteína-P, los cuales establecen un proceso de secreción activa intestinal desde el borde en cepillo del enterocito hacia el lumen intestinal, simultáneo e inverso al proceso de absorción, que produciría una menor absorción del fármaco, y, por lo tanto, una biodisponibilidad oral reducida (MAS-

SERRANO y cols., 2000).

La comparación de las permeabilidades obtenidas para el acamprosato y para el manitol muestra que la permeabilidad del fármaco es del orden de 3 veces superior a la del manitol. Una de las causas que podría explicar la diferencia de permeabilidades en la ruta paracelular es el tamaño de ambas moléculas. Sin embargo, ambos compuestos presentan un peso molecular similar (PM manitol=182 Da; PM acetilhomotaurina=181.65 Da). Aplicando la siguiente ecuación (*Ecuación 4.1*), propuesta por Tavelin y cols. (2003), se calculó el radio hidrodinámico del acamprosato cada molécula:

$$r = K \cdot \sqrt[3]{MW}$$

Ecuación 4.1

donde K representa un valor constante que equivale al cociente entre el radio del manitol (3.6 Å) y la raíz cúbica de su peso molecular (182 Da) y MW el peso molecular del compuesto del que se quiere determinar su tamaño. El valor obtenido para el acamprosato (3.596 Å) es prácticamente equivalente al del manitol (3.6 Å) lo que no podría explicar las diferencias observadas en las permeabilidades. Sin embargo, algunos autores han comprobado que cuando el tamaño molecular se encuentra próximo al del poro intercelular (3.7 Å en células Caco-2), como ocurre con estos compuestos, pequeñas variaciones del mismo pueden traducirse en cambios importantes en la permeabilidad (TAVELIN y cols., 2003). De hecho, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Watson y cols. (2001), quienes observaron que la permeabilidad obtenida a través de células Caco-2 del PEG 282 era 3 ó 4 veces superior a la del manitol, y curiosamente sus radios hidrodinámicos son similares. Adicionalmente, según han comprobado diversos autores (ARTURSSON y cols., 1993; PAULETTI y cols., 1997) no sólo hay que considerar el peso molecular sino que también existen otras características como la carga, la forma y la flexibilidad de la molécula que juegan un papel importante en la permeabilidad paracelular. En este sentido hay que tener en cuenta que mientras que el manitol es una molécula con una carga neta neutra, el acamprosato en solución se encuentra cargado negativamente, hecho que podría explicar las diferencias observadas en los valores de P_{ef} del acamprosato y el manitol. No obstante, existe cierta controversia (BALDA y cols., 1996; HE y cols., 1998) en cuanto al efecto que la carga de una molécula tiene sobre su permeabilidad paracelular.

Finalmente, en estos ensayos *in vitro* también se cuantificaron los valores de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en cada monocapa al comienzo (t=0 min) y al final de cada ensayo (t=150 min). En el siguiente *Cuadro* (equivalente al *Cuadro 3.72*) se resumen los valores medios de la resistencia transepitelial (TEER), expresada como porcentaje del valor inicial de la monocapa celular, en cada condición experimental.

	Manitol	Acamprosato
C-10 (mM)	TEER (%)	TEER (%)
0 (AP-BL)	98.3 ± 3.9 ^a	99.2 ± 2.4 ^a
0 (BL-AP)	-	98.4 ± 4.6 ^a
13	62.7 ± 6.5 ^b	51.1 ± 4.5 ^b
16	36.4 ± 4.7 ^c	42.2 ± 7.9 ^b
16 (Pre-exp)	23.7 ± 2.3 ^d	20.3 ± 4.0 ^c

Como se puede apreciar, existe un descenso significativo en los valores de TEER a medida que aumenta la concentración de caprato sódico, obteniéndose la máxima reducción en los experimentos con pre-exposición del promotor. Estos resultados muestran una tendencia de descenso de la TEER que es realmente similar en los ensayos realizados con el acamprosato, como con el manitol (marcador del paso por la ruta paracelular) lo cual es indicativo del efecto del caprato sódico en la ruta paracelular. A pesar ello el efecto promotor del C10 en el caso del manitol ha sido mucho mayor que en el caso del acamprosato. No obstante, hay que remarcar que Artursson y cols. (1993) demostraron que el coeficiente de permeabilidad (P_{ef}) de una molécula marcadora, como el manitol, es mucho más fiable para la caracterización de cambios en la permeabilidad intrínseca de una membrana absorbente que la determinación de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Adicionalmente otros autores (BALDA y cols., 1996) han demostrado que no siempre se correlacionan bien los cambios en la TEER con la permeabilidad del manitol. Por tanto, en la presente Memoria, las variaciones en los valores de TEER no se han considerado concluyentes pero es claramente significativo que la tendencia mostrada por esta medida sea equivalente a las permeabilidades calculadas.

El valor de P_{ef} del acamprosato obtenido en condiciones *in vitro* ($1.03 \cdot 10^{-6}$ cm/s) se puede comparar con el obtenido y en condiciones *in situ* tras su transformación en las unidades correspondientes ($1.10 \cdot 10^{-5}$ cm/s). Como se observa, el valor de P_{ef} del acamprosato determinado en el intestino de la rata es aproximadamente un orden de magnitud mayor que el obtenido en células Caco-2, hecho totalmente lógico teniendo en cuenta que la línea celular empleada presenta unas uniones intercelulares con un diámetro medio (3.7 Å) mucho menor que el observado en el intestino delgado de la rata (6 Å en la parte apical del epitelio intestinal y 10-15 Å en la parte basal del villi intestinal) (TAVELIN, 2003).

Globalmente los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in situ* demuestran que la absorción intestinal del acamprosato transcurre preferentemente a través de la ruta paracelular, siendo ésta la causa principal de su escasa biodisponibilidad oral en magnitud. Adicionalmente, también se ha puesto de manifiesto que el caprato sódico es capaz de incrementar de un modo significativo su absorción intestinal. De estas observaciones se deduce que el caprato sódico podría ser un buen candidato como promotor para su inclusión como excipiente en futuras formas farmacéuticas del acamprosato. Sin embargo, es necesario la realización de estudios *in vivo*, en animales de experimentación, que confirmen la eficacia de este ácido graso como promotor de la absorción intestinal del acamprosato.

B) Ensayos *in vivo*

Para la realización de los estudios de promoción de la absorción intestinal del acamprosato *in vivo* se seleccionó la rata Wistar como modelo animal atendiendo a los criterios descritos anteriormente.

En este conjunto de experimentos, se ensayó una dosis adicional de caprato sódico (50 mM) mayor que las empleadas en los ensayos *in vitro* e *in situ*. Chao y cols. (1999) demostraron que la administración *in vivo* de una solución de caprato sódico 50 mM en la rata, era capaz de incrementar significativamente la biodisponibilidad de un decapeptido sintético sin causar alteraciones en la mucosa intestinal. Por ello se decidió incluir esta concentración tan elevada en los ensayos *in vivo*.

Aunque de acuerdo con los resultados el valor de la biodisponibilidad del fármaco fue siempre mayor en presencia del caprato sódico, el análisis estadístico no reveló la existencia de diferencias significativas entre los distintos valores comparados ($19.87 \pm 4.57\%$ frente a 24.18 ± 8.81 , 23.82 ± 5.12 y $23.40 \pm 6.71\%$ en presencia de caprato sódico 13, 16 y 50 mM, respectivamente).

Esta falta de efecto *in vivo* del caprato sódico coincide con los datos publicados por Lennernäs y cols. (2002). Estos autores, empleando una perfusión *in vivo* en humanos, demostraron que el C10 en solución no era capaz de incrementar la absorción rectal de la fenoimetilpenicilina. Adicionalmente sus resultados demostraron que un factor determinante para obtener un efecto promotor en la absorción de compuestos poco permeables es la permeabilidad intrínseca del ácido graso en el tejido. Otros autores (RAOOF y cols., 2002) mostraron que el caprato sódico ejerce su efecto de forma rápida y en un espacio corto de tiempo, hecho que podría explicar su falta de efecto en los ensayos *in vivo*.

Otro punto crucial en este tipo de ensayos es la concentración del agente promotor en el lugar de absorción. Cuando el C10 se administra *in vivo*, en contraste con las condiciones de los ensayos *in vitro* e *in situ*, el contenido de Ca^{+2} presente en el contenido luminal podría reducir la concentración del ácido graso por precipitación (ANDERBERG y cols., 1993) y, en consecuencia, su eficacia. Algo similar ocurre con la dilución que se produce *in vivo* a causa de los fluidos intestinales.

Un motivo adicional que podría explicar esta pérdida de eficacia del promotor cuando se administra *in vivo* es la interacción del C10 con el moco que protege al epitelio intestinal, tal y como se ha podido observar con otros promotores (ANDERBERG y cols., 1992; SCHIPPER y cols., 1999). De hecho, Schipper y cols. demostraron que los quitosanos (potentes promotores de la absorción de fármacos poco permeables) son capaces de aumentar la permeabilidad del atenolol en células Caco-2, así como incrementar su desaparición a partir de una solución de perfusión (usando una técnica de perfusión *in situ* en el intestino delgado de la rata). Sin embargo estos compuestos, no fueron capaces de aumentar la biodisponibilidad del atenolol cuando se administró *in vivo*. Los autores sugieren que la capa de moco que cubre la mucosa intestinal y que se encuentra cargada negativamente interaccionó con el quitosano, inhibiendo su efecto promotor, y en consecuencia su eficacia. Los resultados obtenidos en la presente

Memoria son totalmente comparables, puesto que el caprato sódico fue capaz de promover la absorción del acamprosato en los ensayos *in vitro* e *in situ*, pero no aumentó la biodisponibilidad del fármaco, por tanto se podría sospechar de la interacción anteriormente citada.

En contraste con nuestros resultados, Chao y cols. en 1999 observaron un efecto promotor del C10 *in vivo* sobre la absorción de un péptido de pequeño tamaño. Esta discrepancia en los resultados puede explicarse teniendo en cuenta que en los ensayos *in vivo* desarrollados por este grupo, la administración se realizó directamente en el íleon de los animales tratados a través de una cánula implantada en la zona. Sin embargo, tal y como se ha descrito en el *Epígrafe 2.4.3.2* en nuestros experimentos la administración fue oral. Por tanto, la controversia con los resultados publicados por Chao y cols. (1999) y los obtenidos en este trabajo se pueden explicar teniendo en cuenta que la biodisponibilidad de un fármaco administrado junto a un promotor por vía oral siempre es menor que la obtenida si se administra directamente en el intestino (AUNGST, 2000).

A tenor de lo expuesto, la falta de efecto del caprato sódico sobre la biodisponibilidad oral del acamprosato en nuestras condiciones experimentales podría explicarse como la suma de todos los aspectos anteriormente citados, los cuales son inherentes al proceso de absorción *in vivo*.

En resumen, de los datos aportados se desprende que el acamprosato es un fármaco cuya absorción transcurre fundamentalmente por vía paracelular y que puede ser incrementada por el caprato sódico *in situ* e *in vitro*, pero no *in vivo*, sugiriendo que aunque los estudios *in situ* e *in vitro* pueden ser de gran utilidad en los estadios tempranos para la selección de un potencial promotor, los ensayos *in vivo* en modelos animales son necesarios para confirmar la utilidad del promotor y para determinar la influencia de las distintas variables fisiológicas.

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En la presente Memoria se ha abordado el estudio de los mecanismos involucrados tanto en la eliminación como en la absorción del acamprosato. Este fármaco, utilizado en varios países de la Unión Europea para la prevención de las recaídas en el consumo de alcohol en pacientes sometidos a tratamiento de deshabituación, presenta como problema fundamental la baja biodisponibilidad (en torno al 11% en humanos) del preparado comercial (comprimidos con recubrimiento gastrorresistente destinados a administración oral). Además, en el momento actual se desconocen aspectos tan relevantes de su farmacocinética como son: los mecanismos y rutas utilizados para su absorción intestinal o las vías y mecanismos involucrados en la eliminación del fármaco. A través de estudios que han empleado metodologías *in vitro*, *in situ* e *in vivo* se ha podido establecer, en la presente Memoria, la naturaleza de dichos mecanismos, lo que ha permitido, a su vez, analizar las causas de la baja biodisponibilidad del fármaco e iniciar los estudios orientados a mejorar, a través del empleo de diversos promotores, la magnitud de la absorción.

Los estudios realizados indican que el acamprosato se elimina inalterado a través de la orina de los animales, utilizando dos mecanismos: la filtración glomerular y la secreción tubular activa. La absorción en la rata conduce a valores de biodisponibilidad en magnitud situados en torno al 20% cuando el fármaco se administra por vía oral en forma de solución acuosa. La absorción intestinal transcurre fundamentalmente mediante difusión pasiva a través de la vía paracelular, siendo esta la causa fundamental de la reducida biodisponibilidad del acamprosato.

Las **conclusiones** más relevantes del trabajo que se presenta son las siguientes:

1. La farmacocinética del acamprosato en la rata es lineal en un amplio ámbito de concentraciones plasmáticas (desde 0.3 hasta 300 µg/ml, aproximadamente)

2. El acamprosato se elimina inalterado a través de la orina, siendo los mecanismos involucrados en la excreción renal: la filtración glomerular y la secreción tubular activa. Este último mecanismo parece ser de gran capacidad (no se pudo saturar en nuestras condiciones experimentales) y susceptible de inhibición competitiva por el probenecid.

3. La absorción del acamprosato se produce mayoritariamente por difusión pasiva a través de la ruta paracelular en el intestino delgado de la rata. La velocidad del proceso es claramente baja en nuestras condiciones experimentales, lo que explica la aparición de un fenómeno FLIP-FLOP (también detectable en humanos) en las curvas de nivel plasmático obtenidas tras la administración oral del fármaco.

4. La biodisponibilidad en magnitud del acamprosato en la rata tras su administración oral en solución acuosa es del 20%. Esta baja biodisponibilidad es consecuencia de la reducida velocidad con que se absorbe el fármaco a nivel intestinal.

5. Los estudios *in situ* e *in vitro* indican que el caprato sódico es capaz de incrementar la permeabilidad intestinal del acamprosato. Sin embargo, los estudios realizados *in vivo* no detectaron incrementos significativos en los valores de biodisponibilidad en magnitud del fármaco en presencia, incluso, de elevadas concentraciones de este promotor.

6. BIBLIOGRAFÍA

- **Ades J., Granger B., Parot P.** Interés de acamprosato en alcohólicos dentro de la práctica médica corriente. Ensayo multicéntrico en 860 pacientes. *L'Information Psychiatrique*. 5: 517-521 (1992)
- **Akaike H.** AN information criterion (AIC). *Mathem. Sci.* 14: 5-9 (1986)
- **Al Qatari M., Littleton J.** The anticraving drug acamprosate inhibits calcium channel antagonist binding to membranes from the rat cerebral cortex. *Alcohol Alcoholism*. 30: 551 (1995)
- **Al Qatari M., Bouchenafa O., Littleton J.** Mechanism of action of acamprosato: II. Ethanol dependence modifies effects of acamprosate on NMDA receptor binding in membranes from rat cerebral cortex. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22(4): 810-4 (1998)

- **Amidon G. L., Sinko P. J., Fleisher D.** Estimating human oral fraction dose absorbed: A correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. *Pharmaceut. Res.* 5: 651-654 (1988).
- **Anderberg E.K., Nyström C., Artursson P.** Epithelial transport of drugs in cell culture.VII:Effects of pharmaceutical surfactants and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pharm Sci.* 81 (9): 879-887 (1992)
- **Anderberg E.K., Lindmark T., Artursson P.** Sodium caprate elicits dilatations in human intestinal tight junctions and enhances drug absorption by the paracellular route, *Pharmaceut Res.* 10 (6): 857-864 (1993)
- **Arimori K., Nakano M.** Drug exorption from blood into the gastrointestinal tract. *Pharmaceut. Res.* 15(3), 371-376 (1998)
- **Artursson P., Ungell A.L., Löfroth J.E.** Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharmaceut. Res.* 10(8): 1123-1129 (1993)
- **Artursson P., Palm K., Luthman K.** Caco-2 monolayers in experimental and theoretical prediction of drug transport. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 22: 67-84 (1996)
- **Aubin H.J., Lehert P., Beaupère B.** Tolérance de l'association de l'acamprosate aux médicaments du sevrage d'alcool. Essai multicentrique sur 591 alcooliques en sevrage. *Alcoologie.* 16: 32-41 (1994)
- **Aubin H.J. Lehert P. Beaupère B. et al.** Tolerability of the combination of acamprosate with drugs used to prevent alcohol withdrawal syndrom. *Alcoholism,* 1995; 31; 25-38 (1995)
- **Aungst B.J., Saitoh H.** Intestinal absorption barriers and transport mechanism, including secretory transport for a cyclic peptide, fibrinogen antagonist. *Pharmaceut. Res.* 13, 114-119 (1996)
- **Aungst B.J.** Oral mucosa permeation enhancement: possibilities and limitations. En *Oral Mucosa Drug Delivery,* M.J. Rathbone (Ed), Marcel Dekker, New York, 65-83 (1996)
- **Aungst B.J.** Intestinal pemeation enhancers, *J. Pharm. Sci.* 89(4): 429-442 (2000)
- **Aurich C., Aurich J.E., Klug E.** Naloxone affects gastrointestinal functions and behaviour in horses. *Dtsch. Tieraztl. Wochenschr.* 100: 314-315 (1993)

- **Bakar S.K. Niazi S.** Simple reliable method for chronic cannulation of the jugular vein for pharmacokinetic studies in rats. *J. Pharm. Sci.* 72: 1027-1029 (1983)
- **Balda M.S., Whitney J.A., Flores C., Gonzalez S., Cerejido M., Matter K.** Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell. Biol.* 134(4): 1031-1049 (1996)
- **Bermejo M.V., Pérez-Varona A.T., Segura-Bono M.J., Martín-Villodre A., Pla-Delfina J.M., Garrigues T.M.** Compared effects of synthetic and natural bile acid surfactants on xenobiotic absorption I. Studies with polysorbate and taurocholate in rat colon. *Int. J. Pharm.* 69: 221-231 (1991)
- **Besson J. Aeby F. Fendl A. Lehert P.** Combined efficacy of acamprosate and disulfiram for enhancing abstinence of chronic alcoholic patients during a one year post-detoxication period. *Neuropsychopharmacology.* 10: 745 (1994)
- **Boismare F., Daoust M., Moore N., Saligaut C., Lhuintre J.P. Chretien P., Durlach J.** A homotaurine derivate reduces the voluntary untake by rats: Are cerebral GABA receptors involved?. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 21: 787-789 (1984)
- **Bonnet P., Fabry J.P., Gradisky D., Chaumont Ph.** Cathétérisme permanent chez le rat vigile pour l'étude des cinétique sanguines et urinaires. *Sci. Tech. Anim. Lab.* 3 (1978)
- **Boxenbaum H.G., Riegelmann S., Elashoff R.M.** Statistical estimations in pharmacokinetics. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 2: 123-148 (1974)
- **Calpena A.C., Escribano E.** Bolus intravenoso. Modelo bicompartimental. En *Farmacocinética*, Doménech J. Martínez-Lanao J. Plá J.M. (editores), 87-115 (1997)
- **Cano-Cebrián M.J., Zornoza-Sabina T., Guerri C., Polache A., Granero L.** Local acamprosate modulates dopamine release in the rat nucleus accumbens through NMDA receptors.: an in vivo microdialysis study. *N-S Arch. Pharmacol.* 367: 119-125 (2003)
- **Chabenat C., Ladure P., Moore N.** Determination of calcium acetylhomotaurinate by liquid chromatography with fluorimetric and electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 414: 417-22 (1987)

- **Chabenat C., Chretien P., Daoust M., Moore N., Andre D., Lhuintre J.P., Saligaut C., Boucly P., Boismare F.** Physicochemical, pharmacological and pharmacokinetic study of a new GABAergic compound, calcium acetylhomotaurinate. *Method Find. Exp. Clin.*, 10: 311-17 (1988)
- **Chabenat C. Ladure P. Moore N. Boucly P., Boismare F.** Application of an analytical method to calcium acetylhomotaurinate determination. *Arzneimittel-Forsch.* 39: 1413-4 (1989)
- **Chang K.J., Cooper B.R. Hazum E., Cuatrecasas P.** Multiple opiate receptors: Different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides. *Mol. Pharmacol.* 16: 91-104 (1979)
- **Chao A.C., Nguyen J.V., Broughall M., Griffin A., Fix J.A., Daddona P.E.** In vitro and in vivo evaluation of effects of sodium caprate on enteral peptide absorption and on mucosal morphology. *Int. J. Pharm.* 191:15-24 (1999)
- **Cox D., Raje S., Gao H., Salama N.N., Eddington N.D.** Enhanced permeability of molecular weight markers and poorly bioavailable compounds across Caco-2 cell monolayers using the absorption enhancer, zonula occludens toxin. *Pharmaceut. Res.* 19: 1680-1688 (2002)
- **Daoust M., Legrand E, Gewis M., Heidbreder C., De Writte P., Tran G., Durbin P.** Calcium bis acetyl homotaurine increases the number of GABA uptake sites in alcohol preferring rat hippocampus. *Alcohol Alcohol.* 21: A31 (1986)
- **De Boer A.G.** Drug absorption enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations and Trends. Harwood Academic Publisher, Amsterdam, (1994)
- **Dewland P.M.** A rising dose tolerance and pharmacokinetic study of calcium bis acetylhomotaurinate following single oral administration of a solution at four dose levels. Lipla France, RD. 298/17927. (Data on file) (1991)
- **Dewland P.M.** Report of an investigation of the effect of ethanol upon the pharmacokinetics of acamprosate. Lipla France, 1991; RD 298/17949. (Data on file) (1991)
- **Dewland P.M.** Report of the comparison of the plasma pharmacokinetics of acamprosate following a single oral dose to equal numbers of men and women. Lipla France, RD 298/20673. (Data on file) (1995)
- **Dewland P.M.** Report of the potential pharmacokinetic interaction of disulfiram with acamprosate. Lipla France, RD 298/20828. (Data on file) (1995)

- **Diamond J.M.** The epithelial junction: bridge, gate and fence. *Physiologist*. 20: 10-18 (1977)
- **Di Pierro M., Lu R., Uzzau S., Wang W., Margaretten K., Pazzani C., Maimone F., Fasano A.** Zonula occludens toxin structure-function análisis: identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *J. Biol. Chem.* 276: 19160-19165 (2001)
- **Doluisio J.T., Billups N.F., Dittert L.W., Sugita E.T., Swintosky J.V.** Drug absorption I. An "in situ" rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J. Pharm. Sci.* 58: 1196-1199 (1969)
- **Durbin P. Hulot T. Chabac S.** Pharmacodynamics and pharmacokinetics of acamprosate: an overview. En *Acamprosate in relapse prevention of alcoholism* (editor Soyka M.). Procedente de " 1st. Campral Symposium: 1995 Sep. 3"; Stuttgart; Springer: 47-64 (1995)
- **Fabra-Campos S., Climent E., Sanchis-Cortés A., Pla-Delfina J.M.** Compared effects of synthetic and natural bile acid surfactants on xenobiotic absorption: IV. Studies with taurocholate in the rat small intestine. *Int. J. Pharm.* 109: 197-207 (1994)
- **Fadda F., Rosseti Z.** Chronic ethanol consumption from neuroadaptation to neurogeneration. *Prog. Neurobiol.* 56: 385-431 (1998)
- **Faingold C.L., Gouemo P., Riaz A.** Ethanol and neurotransmitter interactions –from molecular to integrative effects. *Prog. Neurobiol.* 55: 509-35 (1998)
- **Fasano A., Uzzau S., Fiore C., Margaretten K** The enterotoxic effect of zonula occludens toxin on rabbit small intestine involves the paracellular pathway. *Gastroenterology*. 112: 839-846 (1997)
- **Faus M.T., Olcina J., Soler E., Martinez A.** Fármacos anticonsumo: Actualización en el tratamiento del transtorno por dependencia del alcohol. *Rev. Esp. Drogodependencia*. 21: 271-290 (1996)
- **Faus-Soler M.T., Olme-Rodríguez J., Soler-Company E** Acamprosato: nuevo fármaco en el tratamiento de la dependencia alcohólica. *Farmacia Hospitalaria*. 21(1): 1-10 (1997)

- **Fourtillan J.B.** Pharmacokinetics and relative bioavailabilities of acetylhomotaurinate (AOTA) after oral administration of a single dose equal to 666 mg. of calcium acetylhomotaurinate (AOTA-Ca) in six young healthy volunteers, when given as aqueous solution and enteric coated tablets. Lipla France, AD 864 H. (Data on file) (1989)
- **Fourtillan J.B.** Pharmacokinetics of acetylhomotaurine (AOTA) in young healthy volunteers subjects after single and multiple oral administrations of doses equal to 666 mg. of calcium acetylhomotaurinate (AOTA-Ca). Lipla France, AD 875 H. (Data on file) (1990).
- **Fourtillan J.B.** Influence of food on acetylhomotaurine pharmacokinetics after single oral administration of acamprosate. Lipla France, AD 1011 H. (Data on file) (1992)
- **Fourtillan J.B.** Research of pharmacokinetic interactions between diazepam and acamprosate when given in combination on multiple oral dosing. Lipla France, AD 1126 H. (Data on file) (1995)
- **Fourtillan J.B.** Research of pharmacokinetic interactions between imipramine and acamprosate when given in combination on multiple oral dosing. Lipla France, AD 1135 H. (Data on file) (1995)
- **Freshney R.I.** *Animal Cell Culture. A practical approach.* IRL Press Ltd. Oxford, 73-77, 1986.
- **Gabus-Sannié C., Buri P.** Étude comparative des méthodes de détermination du volume d'eau absorbé lors de perfusion de l'intestine grêle du rat. S. T. P. *Pharma.* 3: 856-860 (1987)
- **Garrigues T.M., Perez-Varona A.T., Bermejo M.V., Martin-Villodre A.** Absorption-partition relationship for true homologous series of xenobiotics as a possible approach to study mechanisms of surfactants in absorption. IV. Phenylacetic acid derivatives and anionic surfactants. *Int. J. Pharm.* 79: 135-140 (1992)
- **Gewiss M., Heidbreder C., De Witte P.** Effects of a Ca-acetylhomotaurinate on the alcohol-induced behavioral and corticovascular alterations following chronic alcoholization. *Alcohol Alcohol.* 24: 374 (1989)
- **Gewiss M., Heidbreder C., Opsomer L., Durbin P., De Witte P.** Acamprosate and diazepam differentially modulate alcohol-induced behavioural and cortical alterations in rats following chronic inhalation of ethanol vapour. *Alcohol Alcohol.* 26: 129-137 (1991)

- **Gibaldi M., Perrier D.** Farmacocinética. Editorial Reverté, Barcelona (1982)
- **Girault J. Gobin P. Fourtillan J.B.** Determination of calcium acetylhomotaurinate in human plasma and urine by combined gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 530: 295-305 (1990)
- **Gloff C.A., Benet L.Z.** Differential effects of the degree of renal damage on p-aminohipuric acid and inulin clearances in rats. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 17: 169-177 (1988)
- **Granero L., Chesa-Jiménez J., Monserrat V., Almela M., Gimeno M.J., Torres-Molina F., Peris-Ribera J.E.** Physiological pharmacokinetic model for ceftazidime disposition in the rat and its application to prediction of plasma concentrations in humans. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1: 3-11 (1993)
- **Granero L., Gimeno M.J., Torres-Molina F., Chesa-Jimenez J., Peris-Ribera J.E.** Studies on the renal excretion mechanisms of cefadroxil. *Drug Metab. Dispos.* 22: 447-450 (1994)
- **Guerra C., Grisolia S.** Chronic ethanol treatment affects synaptosomal membrana-bound enzymes. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18: 45-50 (1983)
- **Guyton A.C., Hall J.E.** *Tratado de Fisiología Médica*, 9ª ed., Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid, 903-916 (1999)
- **Han H.K., Vrueth R.L., Rhie J.K., Covitz K.M., Smith P.L., Lee C.P., Oh D.M., Sadée W., Amidon G.L.** 5'-AA esters of antiviral nucleosides acyclovir and AZT are absorbed by the intestinal PEPT₁ peptide transporter. *Pharmaceut. Res.* 15: 1154-1159 (1998)
- **Harms P.G., Ojeda S.R.** A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J. Applied Physiol.* 36: 391-392 (1974)
- **Haug G.** Pharmacokinetic study of 2 acamprosate tablets (2 x 333 mg.) in patients with different stages of impaired liver function compared to a control group of healthy volunteers. Lipla France, 90235. (Data on file) (1992)
- **He L., Murby S., Warhurst G., Gifford L., Walker D., Ayrton J., Eastmond R., Rowland M** Species differences in size discrimination in the paracellular pathway reflected by oral bioavailability of poly(ethylene glycol) and D-peptides. *J. Pharm. Sci.* 87(5): 626-633 (1998)

- **Hu M., Chen J., Tran D., Zhu Y., Leonardo G.** The Caco-2 cell monolayers as an intestinal metabolism model: metabolism of dipeptide Phe-Pro. *J. Drug Targeting*. 2: 79-89 (1994a)
- **Hu M., Chen J., Zhu Y., Dantzing A.H., Stratford R.E., Kuhfeld M.T.** Mechanism and kinetics of transcellular of a new B-Lactam antibiotic loracarbef across a human intestinal epithelial model system (Caco-2). *Pharmaceut. Res.* 11: 1405-1413 (1994b)
- **Hunter J. Hirst B.H., Simmons N.L.** Epithelial secretion of vinblastine by human intestinal adenocarcinoma cell (HCT-8 and T84) layers expressing P-glycoprotein. *Br. J. Cancer*. 64: 437-444 (1991)
- **Imbimbo B.P., Martinelli P., Rocchetti M., Ferrari G., Bassotti G., Imbimbo E.** Efficiency of different criteria for selecting pharmacokinetics multiexponential equations. *Biopharm. Drug. Dispos.*, 12: 139-147 (1991)
- **Jaillon P. Salvat M.** Pharmacokinetics study of intravenous administration of AOTAL (calcium acetylhomotaurinate) at single doses of 10, 20 and 30 mg/Kg. Lipha France, (Data on file) (1991)
- **Jakoby W., Pastan I.** En: *Methods in enzymology*. 58: 314-449, (1979)
- **Johannessen W.M., Tyssebotn I.M., Aarbakke J.** Antipyrine and acetaminophen kinetics in the rat: Comparison of data based on blood samples from the cut tail and a cannulated femoral artery. *J. Pharm. Sci.* 71: 1352-1356 (1982)
- **Knippt G., Ho N.F.H., Barshun C.L., Brochardt T.** Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: Effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size, *J. Pharm. Sci.* 86(10): 1105-1110 (1997)
- **Krevsky B., Fisher R.S., Cowan A.** Failure of (+)-naloxone to accelerate feline colonic transit. *Experientia*. 46: 217-219 (1990)
- **Kruse P., Patterson M.** Tissue culture methods and applications. Academic Press, New York, 471 (1973)
- **Le Magnen J.** Effect of calcium acetylhomotaurinate on alcohol dependency. *Med. Chir. Dig.* 19: 47-48 (1990)
- **Lennernäs H., Gjellan R., Hälgren R., Graffner C** The influence of caprate on rectal absorption of phenoxymethylpenicillin: experience from an in vivo perfusion in humans. *J. Pharm. Pharmacol.* 54: 499-508 (2002)

- **Leu H.B., Huang J.D.** Inhibition of intestinal P-glycoprotein and effects on etoposide absorption. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* 35: 432-436 (1995)
- **Levine R.R., Hansch C., Elkins D** The influence of experimental procedures and dose on the intestinal absorption of amonium, benzome-thamine. *J. Pharm. Sci.*, 69: 648-650 (1980)
- **Lhuintre J.P. Daoust M. Moore N., Chretien P., Saligaut C., Tran G., Boismare F., Hillemand B.** Ability of calcium bisacetyl homotaurinate, a GABA agonist, to prevent relapse in weaned alcoholics. *Lancet.* 1: 1014-1016 (1985)
- **Lhuintre J.P. Moore N. Tran G, Steru L., Langrenon S., Daoust M., Parot P. Ladure P., Libert C., Boismare F.** Acamprosate appears to decrease alcohol intake in weaned alcoholics. *Alcohol Alcohol.* 25; 613-622 (1990)
- **Lindmark T., Schipper N., Lazorova L., de Boer A.G., Artursson P.** Absorption enhancement in intestinal epithelial Caco-2 monolayers by sodium caprate: assessment of molecular Weight Dependence and demonstration of transport routes. *J. Drug Target.* 5(3): 215-223 (1997)
- **Lindmark T., Kimura Y., Artursson P.** Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids. *J. Pharm. Exp. Ther.* 284: 362-369 (1998)
- **Litten R.Z, Allen J.P.** Advances in development of medications for alcoholism treatment. *Psicopharmacology.* 139: 20-33 (1998)
- **Littleton J.** Acamprosate in alcohol dependence: How does it work?. *Addiction.* 90: 1179-1188 (1995)
- **Lo Y.L., Huang J.D.** Effects of Sodium deoxicholate and Sodium caprate on the transport of Epirubicin in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers and everted gut sacs of rats. *Biochem. Pharmacol.* 59 (6): 665-672 (2000)
- **Lucker P.L.** A pilot study of the influence of AOTAL on the pharmacokinetics of ethyl alcohol. Lpha France, 12/89-03 AL (Data on file) (1989)
- **Madara J.L.** Regulation of the movement of solutes across tight junction. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 143-159 (1998)

- **Martín-Villodre A., Plá-Delfina J.M., Moreno J., Pérez-Buendía M.D., Miralles-Mir J., Collado E.F., Sánchez-Moyano E., Del Pozo A.** Studies on the reliability of a bihyperbolic functional absorption model. I. Ring-substituted anilines. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 14: 615-633 (1986)
- **Martínez-Coscollá A., Miralles-Loyola E., Garrigues T.M., Sirvent M.D., Salinas E., Casabó V.G.** Studies on the reliability of a novel absorption lipophilicity approach to interpret the effects of synthetic surfactants on drug and xenobiotic absorption. *Arzneim. Forsch.* 86 (7): 699-705 (1993)
- **Mason B.J., Goodman A.M., Dixon R.M., Magdy H.A., Hulot T., Wesnes K., Hunter J.A., Boyeson M.G.** A pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interaction study of acamprosate and naltrexone. *Neuropharmacology.* 27 (4): 596-606 (2002)
- **Más-Serrano P., Granero L., Martín-Algarra R.V., Guerri C., Polache A.** Kinetic study of acamprosate absorption in rat small intestine. *Alcohol Alcohol.* 35 (4): 324-330 (2000)
- **Merck.** Campral. Acamprosate. Monografía. Meck, 1997.
- **Migdaloff B.H.** Methods for obtaining drug time course data from individual small laboratory animals: Serial microblood sampling and assay. *Drug Metab. Rev.* 5: 295-310 (1976)
- **Miguet J.** Plasma kinetics of acamprosate after a single oral administration to patients with liver disease. Lipla France, AOTA-CIN IHP I. (Data on file) (1991)
- **Naassila M., Hammoumi S., Legrand E., Durbin P., Daoust M.** Mechanism of action of acamprosate. I. Characterisation of spermidine sensitive acamprosate binding site (ABS) in rat brain. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22(4): 802-9 (1998)
- **Nalda-Molina R.** Permeabilidad de fármacos en cultivos celulares de carcinoma humano de colon (Caco-2): puesta a punto de la técnica y determinación de la capacidad predictiva de la absorción. Tesis Doctoral. Valencia (2003)
- **Nalpas B., Dabadie H., Parot P., Paccalin J.** L'acamprosate: de la pharmacologie à la clinique. *Encephale.* 16(3):175-9 (1990)
- **Notari R.** Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics. Marcel Dekker Inc: New York (1987)

- **Pauletti G.M., Okumu F.W., Borchardt R.T.** Effect of size and charge on the passive diffusion of peptides across Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway, *Pharmaceut. Res.* 14(2): 164-168 (1997).
- **Pérez-Buendía M.D., Gómez-Pérez B., Pla-Delfina J.M.** Permeation mechanisms through artificial lipoidal membranes and effects of synthetic surfactants on xenobiotic permeability. *Arzneimittel Forschung.* 43: 183-190 (1993)
- **Raof A.A., Ramtoola Z., McKenna B., Yu R.Z., Hardee G., Geary R.S.** Effect of sodium caprate on the intestinal absorption of two modified antisense oligonucleotides in pigs, *Eur. J. Pharm. Sci.* 17(3): 131-138 (2002)
- **Rege B.D. Kao J.P.Y. Polli J.E.** Effect of non-ionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. , *Eur. J. Pharm. Sci.* 16: 237-246 (2002)
- **Saitoh H., Aungst B.J.** Possible involvement of multiple p-glycoprotein-mediated efflux systems in the transport of verapamil and other organic cation across rat intestine. *Pharmaceut.Res.* 12:1304-1310 (1995)
- **Saivin S., Hulot T., Chabac S., Potgieter A., Durbin P., Houin G.** Clinical Pharmacokinetics of acamprosate. *Clin. Pharmacokinet.* 5: 331-345 (1998)
- **Sakai M., Imai T., Ohtake H., Azuma H., Otagiri M.** Effects of absorption enhancers on the transport of model compounds in Caco-2 cells monolayers: assessment by confocal laser scanning, *J. Pharm. Sci.* 86(7): 779-785 (1997)
- **Sakimura K., Kutsuwada T., Ito I., Manabe T., Takayama C., Kushiya E., Yagi T., Aizawa S., Inoue I., Sugiyama H. Mishina M.** Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor $\epsilon 1$ subunit. *Nature.* 373: 151-5 (1995)
- **Salama N.N., Fasano A., Lu R., Eddington N.D.** Effect of the biologically active fragment of zonula occludens toxin, ΔG , on the intestinal paracellular transport and oral absorption of manitol. *Int. J. Pharm.* 251: 113-121 (2003)
- **Sass H.** Results from a pooled analysis of 11 European trials comparing acamprosate and placebo in the treatment of alcohol dependence. *Alcohol Alcohol.* 4: 551 (1995).
- **Saunders B.D., Trapp R.G.** *Basic and clinical biostatistics.* 2^a ed., Appleton & Lange, Connecticut (1994)
- **Sawada T., Ogawa T., Tomita M., Hayashi M., Awazu S.** Role of paracellular pathway in nonelectrolyte permeation across rat colon epithelium enhanced by Sodium caprate and Sodium caprylate. *Pharmaceut. Res.* 8(11): 1365-1371 (1991)

- **Schipper N.G., Värüm K.M., Stenberg P., Ocklind G., Lennernäsand H., Artursson P.** Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. 3: Influence of mucus on absorption enhancement. *Eur. J. Pharm. Sci.* 8(4): 335-343 (1999).
- **Scott G.** The metabolism and pharmacokinetics of ¹⁴C-AOTA in man. Lipla France, IRI 7488. (Data on file) (1991)
- **Sennesael J.** Acamprosate pharmacokinetic study after a single oral administration of 2 acamprosate tablets (2 x 333 mg) to subjects with normal or impaired renal function. Lipla France, AOTA-CIN IRI-AD 1003 H. (Data on file) (1992)
- **Soyka M.** Acamprosate in relapse prevention of alcoholism. Springer-Verlag, Berlin (1996)
- **Söderholm J.D., Olaison G., Peterson K.H., Franzen L.E., Lindmark T., Wiren M., Tagesson C., Sjö Dahl.** Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut.* 50 (3): 307-313 (2002)
- **Spanagel R., Hölter S.M., Allingham K., Landgraf R., Zieglgansberger W.** Acamprosate and alcohol: I. Effects on alcohol intake following alcohol deprivation in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 305: 39-44 (1996)
- **Spanagel R., Zieglgansberger W.** Acamprosate and alcohol: III. Effects on alcohol discrimination in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 305: 51-56 (1996)
- **Spanagel R., Zieglgansberger W.** Anticraving compounds for ethanol: New pharmacological tools to study addictive processes. *TIPS.* 18: 54-59 (1997)
- **Su S.F., Huang J.D.** Inhibition of the intestinal digoxin absorption and exsorption by quinidine. *Drug Metab. Dispos.* 24: 142-147 (1996)
- **Takahashi K., Murakami T., Kamata A., Yumoto R., Higashi Y., Yata N.** Pharmacokinetic analysis of the absorption enhancing action of decanoic acid and its derivatives in rats. *Pharmaceut. Res.* 11(3): 388-392 (1994).
- **Tanner M.A.** Tools for statistical inference. En *Lecture notes is statistics*, Springer-Verlag, Berlin, vol. 67 (1992)

- **Tavelin S., Taipalensuu J., Soderberg L., Morrison R., Chong S., Artursson P.** Prediction of the oral absorption of low-permeability drugs using small intestine-like 2/4/A1 cell monolayers. *Pharmaceut. Res.* 20(3): 397-405 (2003)
- **Tomita M., Hayashi M., Horie T., Ishizawa T., Awazu S.** Enhancement of colonic drug absorption by the transcellular permeation route. *Pharmaceut. Res.* 5: 186-189 (1988)
- **Torres-Molina F., Aristorena J.C., García-Carbonell C., Granero L., Chesa-Jiménez J., Pla-Delfina J.M., Peris-Ribera J.E.** Influence of permanent cannulation of the jugular vein on pharmacokinetics of amoxicillin and antipyrine in the rat. *Pharmaceut. Res.* 9: 1587-1591 (1992)
- **Ueda K., Taguchi Y., Morishima M.** How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Semin. Cancer Biol.* 8: 151-159 (1997)
- **Upton R.A.** Simple and reliable method for serial sampling of blood from rats. *J. Pharm. Sci.* 64: 112-114 (1975)
- **Waeldele G., Stoclet J.C.** Cathétérisme permanent de laorte thoracique. Mesure directe de la pression artérielle, injection de substances et prélèvements de sang chez le rat vigile. *J. Physiol.* 66: 357-366 (1973)
- **Wagner J.G.** Pharmacokinetics for the Pharmaceutical Scientist, Technomic Publishing Co., Pennsylvania, (1993)
- **Ward P.D., Tippin T.K., Thakker D.R.** Enhancing permeability by modulating epithelial tight junctions. *Pharm. Sci. Technol. To.* 3 (10): 346-358 (2000)
- **Watson C.J., Rowland M., Warhurst G.** Functional modeling of tight junction in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281: C388-C397 (2001)
- **Whitworth A.B., Fischer F., Lesch O.M., Nimmerrichter A., Oberbauer H., Platz T., Potgieter A., Walter H., Fleischhacker W.W.** Comparison of acamprosate and placebo in long-term treatment of alcohol dependence. *Lancet.* 347: 1438-1442 (1996)
- **Wilde M.I., Wagstaff A.J.** Acamprosate: a review of its pharmacology and clinical potential in the management of alcohol dependence after detoxification. *Drugs.* 53: 1038-1053 (1997)

290 *Bibliografía*

- **Yamamoto A., Tatsumi H., Maruyama M., Uchiyama T., Okada N., Fujita T.** Modulation of intestinal permeability by nitric oxide donors: implications in intestinal delivery of poorly absorbable drugs. *JPET*. 296: 84-90 (2001)
- **Zamora J.M., Pearce H.L., Beck W.T.** Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells. *Mol. Pharmacol.* 33:454-462 (1998)
- **Zornoza T., Guerri C., Polache A., Granero L.** Disposition of acamprosate in the rat: influence of probenecid. *Biopharm. Drug Dispos.* 23: 283-291 (2002)