

**ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA *IN VITRO* PARA EVALUAR LA
ABSORCIÓN INTESTINAL DE AMPICILINA LIBERADA POR EL POLÍMERO
PAM 18NA.**

SEBASTIÁN CALDERÓN PATIÑO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2013**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA *IN VITRO* PARA EVALUAR LA
ABSORCIÓN INTESTINAL DE AMPICILINA LIBERADA POR EL POLÍMERO
PAM 18NA.**

SEBASTIÁN CALDERÓN PATIÑO

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO**

ASESOR: JULIÁN ARBEY GONZÁLEZ OSPINA, M.SC.

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2013**

NOTA DE ACEPTACIÓN

DIRECTOR DEL TRABAJO DE GRADO

FIRMA DEL EVALUADOR

FIRMA DEL EVALUADOR

Santiago de Cali, 30 de octubre del 2013

AGRADECIMIENTOS

A la universidad Icesi por darnos la oportunidad de llevar a cabo esta experiencia investigativa, y por propiciar el presupuesto para ejecutar el proyecto.

Al profesor y coordinador del proyecto, Julián González Ospina M.Sc, por su apoyo y dirección en el diseño y ejecución de este trabajo de grado.

Al Centro de Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), por el compromiso y la entrega oportuna de los insumos necesarios para llevar a cabo los ensayos.

Al Dr. José Hipólito Isaza Martínez, profesor de la Universidad del Valle, por su colaboración y prestación de instalaciones para las lecturas en el equipo lector de multiplacas.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	10
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	12
4. OBJETIVOS	19
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
5. METODOLOGÍA.....	20
5.1 ESTABLECER LA LÍNEA CELULAR CACO-2 EN EL LABORATORIO Y LAS CONDICIONES DEL ENSAYO	20
5.2 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA CACO-2....	21
5.3 ENSAYOS DE PERMEABILIDAD DE AMPICILINA SOLA O LIBERADA POR EL POLÍMERO PAM 18NA.....	22
5.4 MATRIZ DE MARCO LÓGICO	24
6. IMPACTO AMBIENTAL.....	28
7. RESULTADOS	29
7.1 Evaluación de la integridad de la membrana Caco-2 – Resistencia Transepitelial (TEER) y Amarillo de Lucifer.....	29
7.2 Cuantificación de fármacos y determinación de coeficientes de permeabilidad aparente (P_{ap}).	37
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
8.1 Establecer la línea celular Caco 2 en el laboratorio y los parámetros del ensayo.....	48
8.2 Estandarizar la metodología para evaluar la integridad de la membrana celular en Caco 2.	50
8.3 Evaluar el nivel de absorción del antibiótico Ampicilina sólo o liberado por el polímero PAM-18Na en Caco 2.....	53
9. CONCLUSIONES.....	56
10. RECOMENDACIONES	57
11. BIBLIOGRAFÍA	58
12. ANEXOS	60
12.1 Anexo 1 – Cantidades promedio en $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina y Metoprolol, de cada inserto, sin corrección.....	60

TABLA DE ILUSTRACIONES

<i>Ilustración 1 - Esquema de la técnica de perfusión de un solo paso en rata in situ, (Oltra, 2010)</i>	11
<i>Ilustración 2 - Esquema de la técnica de estudio del transporte transepitelial de un compuesto in vitro con monocapas de Caco-2, (Oltra, 2010)</i>	11
<i>Ilustración 3 - Esquema morfológico del enterocito y su distribución en el intestino delgado (Rosenbaum, 2011)</i>	12
<i>Ilustración 4 - Esquema del proceso de absorción de fármacos que involucran proteínas de transporte de membrana (Rosenbaum, 2011).</i>	13
<i>Ilustración 5 - Reemplazo de medio de cultivo DMEM durante el mantenimiento en el laboratorio</i>	49
<i>Ilustración 6 - Ejecución ensayo de permeabilidad bajo condiciones fisiológicas.</i>	50
<i>Ilustración 7 - Estructura química del reactivo fluorescente Amarillo de Lucifer</i>	51

TABLA DE TABLAS

<i>Tabla 1 - Tiempo de cultivo y número de pase de los tres platos de cultivo</i>	29
<i>Tabla 2 - Medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial Plato ensayo 1</i> ...	30
<i>Tabla 3 - Medición de la Resistencia eléctrica Transepitelial Plato ensayo 2</i> ...	30
<i>Tabla 4 - Medición de la Resistencia Transepitelial Plato ensayo 3</i>	30
<i>Tabla 5 - Curva de calibración del marcador de permeabilidad Amarillo de Lucifer</i>	32
<i>Tabla 6 - Resultado lecturas ensayo de integridad de membrana Platos 1, 2, 3, estándar y blanco</i>	33
<i>Tabla 7 - Porcentaje de Amarillo de Lucifer permeado respecto a un estándar adicionado</i>	34
<i>Tabla 8 - Cantidad de Amarillo de Lucifer permeado finalizado el ensayo</i>	35
<i>Tabla 9 - Valores de P_{ap} en cm/seg del Amarillo de Lucifer</i>	36
<i>Tabla 10 - Curvas de calibración Ampicilina (a) y Metoprolol (b)- Sistema I</i>	38
<i>Tabla 11 - Concentración acumulada de Ampicilina y Metoprolol respecto al tiempo - Sistema I</i>	39
<i>Tabla 12 - Concentración acumulada de Ampicilina y Metoprolol respecto al tiempo - Sistema II</i>	41
<i>Tabla 13 - Concentración acumulada de Ampicilina respecto al tiempo - Sistema III</i>	42
<i>Tabla 14 - Concentración acumulada de Metoprolol respecto al tiempo - Sistema IV</i>	42
<i>Tabla 16 - Coeficientes de permeabilidad aparente calculados para los fármacos</i>	46

RESUMEN

Para la predicción de la permeabilidad intestinal de los fármacos, se han desarrollado diversos métodos experimentales, entre los que se destacan las determinaciones *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Las tres varían en complejidad experimental y en costo de ejecución. El siguiente trabajo tiene como objetivo principal estandarizar una metodología de permeabilidad *in vitro* en monocapas de células Caco-2. La importancia de esta investigación radica en la obligación legal que tienen las industrias en Colombia de presentar estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia para el registro sanitario de un medicamento.

Para llevar a cabo la estandarización de la metodología, se utilizaron monocapas diferenciadas de Caco-2, sobre las cuales se aplicaba una cantidad de fármaco conocida. Posteriormente en tiempos establecidos, se tomaban muestras para determinar la cantidad de fármaco que atravesaba la membrana, para la cuantificación de estos valores, se utilizó una metodología validada con técnica UPLC. Adicionalmente, fue necesario medir la integridad de las membranas de manera directa e indirecta, por medio de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y la permeabilidad del reactivo Amarillo de Lucifer, el cual responde a una tintura fluorescente y sólo atraviesa la membrana cuando ésta se encuentra íntegra y las uniones entre las células es adecuada.

Con los resultados, se determinaron los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{ap}) para cada fármaco evaluado, Ampicilina y Metoprolol, reportados en cm/seg. Por otra parte, también se determinaron los coeficientes de permeabilidad de los mismos fármacos, en presencia del polímero PAM 18 Na. Los resultados obtenidos muestran un P_{ap} para la Ampicilina de $1,02 \times 10^{-5} \pm 1,4 \times 10^{-5}$ cm/seg en ausencia del polímero, y un P_{ap} de $9,42 \times 10^{-7} \pm 1,2 \times 10^{-7}$ cm/seg presencia del polímero. Para el Metoprolol los resultados fueron $2,25 \times 10^{-5} \pm 3,7 \times 10^{-5}$ y $5,07 \times 10^{-5} \pm 2,9 \times 10^{-5}$ respectivamente.

Con los resultados se concluye que, existe una correlación de la estandarización realizada con otras reportadas en artículos científicos, la permeabilidad de los fármacos está sujeta a la naturaleza química de la molécula y que no existe un aumento de la permeabilidad de ampicilina en presencia del polímero PAM 18 Na.

1. INTRODUCCIÓN

Cuando se desea hacer la comercialización de un fármaco, es necesario predecir características propias de la molécula y sus componentes de formulación. Para ello, se realizan una serie de ensayos de laboratorio tanto fisicoquímicos como farmacocinéticos, con el fin de poder hacer evidentes comportamientos claves de su administración por vía oral; en los antibióticos como Ampicilina, se deben hacer estas predicciones (Biganzoli, Rossi, Brunati, & Nolli, 1999). Para los ensayos se utilizó un estándar de Ampicilina Sódica que se administra normalmente por vía oral. Aunque las pruebas fisicoquímicas son bastante útiles, los ensayos de permeabilidad a través de la membrana intestinal resultan ser más importantes al momento de realizar una clasificación biofarmacéutica, (Baena & Ponce D' León, 2008). En la caracterización farmacocinética de antibióticos, no se han reportado muchos estudios que permitan establecer una metodología para este tipo de moléculas.

Para medir los parámetros farmacocinéticos, se han desarrollado diversas metodologías que pueden clasificarse en tres: ensayos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Estos ensayos se diferencian técnicamente en su nivel de complejidad; mientras en los ensayos *in vivo* e *in situ* se requiere un modelo animal, en los ensayos *in vitro* se requieren solamente monocapas celulares (Oltra, 2010). A nivel general todos los ensayos de absorción intestinal, pretenden medir el Coeficiente de Permeabilidad (P) utilizando un modelo matemático, dicho coeficiente se encuentra directamente relacionado al coeficiente de reparto de la molécula activa (Baena & Ponce D' León, 2008), y permite determinar qué tan permeable es la molécula a la capa de enterocitos. Una vez se decide utilizar el modelo *in vitro* empleando monocapas, es necesario hacer la siembra de líneas celulares que una vez adheridas sean capaz de diferenciarse y mostrar características propias de la mucosa intestinal, posteriormente se cuantifica la cantidad de fármaco que atravesó la monocapa tomando muestras del lado basolateral de la cámara (Oltra, 2010).

Dentro de las posibles líneas celulares que se pueden utilizar para la simulación de la mucosa intestinal, existen algunas de carcinoma de colon humano que tienen mucha, alguna o poca diferenciación. En 1998 se realizó un estudio para determinar las líneas celulares más eficientes para diferenciarse y simular las condiciones del intestino, el resultado arrojó que la línea Caco-2 es la más eficiente en diferenciación y producción de enzimas activas, seguida de la línea HT-29 (Chantret, Barbat, Dussaulx, Brattain, & Zweibaum, 1988). La línea celular Caco-2 que fue aislada inicialmente de un carcinoma de colon, es actualmente la que está aprobada por la FDA para determinar la clase de permeabilidad y correlacionar su absorción intestinal (FDA, 2000)

La gran importancia de esta investigación radica en la obligación legal que tienen las industrias en Colombia de presentar estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia para el registro sanitario de un medicamento, según el Decreto 677 del 26 de abril de 1995 y que es corroborado en el Decreto 2086 del 10 de junio de 2010. En Colombia, los estudios de esta índole son realizados *in vivo* o *in situ* con modelos animales, lo que hace más complicada y costosa la implementación técnica para una industria farmacéutica al tratar de obtener resultados de la absorción intestinal. Algunos estudios publicados han revelado que el modelo *in vitro*, con monocapas de Caco-2, es capaz de clasificar los perfiles de permeabilidad de fármacos de manera similar a las técnicas más complejas (*in situ* o *in vivo*), incluso en fármacos con problemas de absorción (P Artursson, Palma, & Luthmanb, 2001). Esto sugiere una razón más para afirmar que la alternativa que se propone es rentable para las industrias y laboratorios, arrojando resultados que pueden ser utilizados para reportar el comportamiento de permeabilidad de un medicamento ante la comunidad científica y al INVIMA. No obstante, se sabe que es posible realizar este tipo de determinaciones con otros modelos, como las celdas de Franz con membranas extraídas de intestino de cerdo.

2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

La industria farmacéutica y los laboratorios dedican gran parte de su tiempo a realizar investigaciones, con el fin de determinar si las potenciales moléculas activas pueden comercializarse de forma rentable en el mercado. Aunque parezca sencillo, llevar a cabo este tipo de investigaciones es costoso y cualquier aporte en reducción de gastos, *sin perder la calidad de los resultados*, resulta favorable para un laboratorio farmacéutico. Cuando se habla de realizar pruebas de absorción intestinal, las primeras herramientas que son tenidas en cuenta son los ensayos *in vivo/in situ*, los cuales requieren una inversión grande en costos de acondicionamiento técnico, en donde se hace necesario el uso de modelos animales, tema que está debatido actualmente por la bioética. En un artículo publicado en la Revista Colombiana de Bioética, se señala la importancia de valorar la investigación en animales, y verlo como un problema que nos compete a todos los investigadores (Mrad de Osorio, 2006).

Si bien, existen laboratorios que se encuentran equipados con altas tecnologías para realizar este tipo de ensayos, muchos otros en Colombia no cuentan con esta infraestructura, lo que limita el trabajo de muchos investigadores. Si entramos a revisar las metodologías aplicadas para la determinación de la constante de permeabilidad en antibióticos y su clasificación biofarmacéutica, son pocos los que usan el ensayo *in vitro* con Caco-2. A pesar de sus eficientes resultados y de su correlación con las otras metodologías, (P Artursson et al., 2001) la técnica ha sido estandarizada por pocos en Colombia, incluyendo a la Doctora Martha Fontanilla en Bogotá, la Universidad de Antioquia en Medellín y hace poco en el CIDEIM en Cali.

Con la implementación de un modelo *in vitro* para la evaluación de absorción intestinal de fármacos, se reduciría considerablemente el costo por ensayo y adicionalmente no sería necesaria la utilización de modelos animales. En las Ilustraciones 1 y 2, se observa y compara el nivel de complejidad técnica de las metodologías *in vivo e in vitro*.

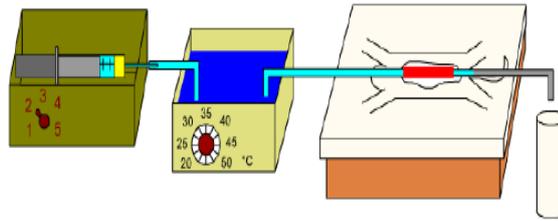


Ilustración 1 - Esquema de la técnica de perfusión de un solo paso en ratita *in situ*, (Oltra, 2010)

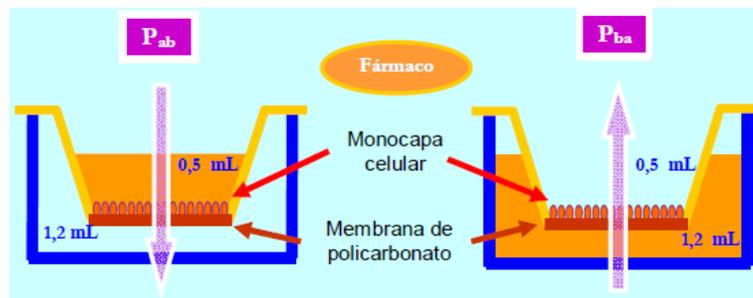


Ilustración 2 - Esquema de la técnica de estudio del transporte transepitelial de un compuesto *in vitro* con monocapas de Caco-2, (Oltra, 2010)

Aunque realizar ensayos de permeabilidad *in vitro* generará cierto costo para la empresa, es posible realizar un mayor número de pruebas al mismo tiempo, obteniendo resultados más rápidos que las otras metodologías. Las células Caco-2 son menos complejas de manipular que otras líneas celulares, y se ha demostrado que realizan diferenciación morfológica, enzimática y funcional, de manera espontánea (Chantret et al., 1988).

Por lo anteriormente descrito, y con el fin de dar una solución viable para llevar a cabo ensayos de permeabilidad, se busca con estos resultados aportar a la implementación de una metodología de absorción intestinal *in vitro* utilizando células Caco-2, aplicado a la Ampicilina liberada por el polímero PAM 18 sódico (Sal sódica del Poli (ácido maléico-alt-octadeceno)). Con esto, se logra incrementar el conocimiento en el área biofarmacéutica y presentar una metodología interesante para las empresas que requieran realizar estos ensayos.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

Para que un fármaco o molécula activa ejerza su efecto terapéutico, es necesario que éste se absorba y se distribuya, alcanzando la diana farmacológica. Para ello, es necesario conocer los diferentes lugares en donde se pueden dar estos procesos y de esta manera, enfocar las condiciones experimentales necesarias para recrear los escenarios fisiológicos. Los procesos de absorción de fármacos se dan mayoritariamente en el intestino delgado, aunque se pueden presentar también a lo largo del tracto intestinal (Oltra, 2010). El por qué de este fenómeno, se debe a que el intestino delgado presenta un diseño morfológico de alta área superficial. Se encuentra reportada un área aproximada de 200 m² de superficie expuesta (Stoll et al, 2000) que le permite al intestino una mayor interacción con los componentes del medio apical, y finalmente incrementar las posibilidades de absorción mediante difusión pasiva. En la Ilustración 3 se muestra la morfología del enterocito y su organización a lo largo del intestino delgado.

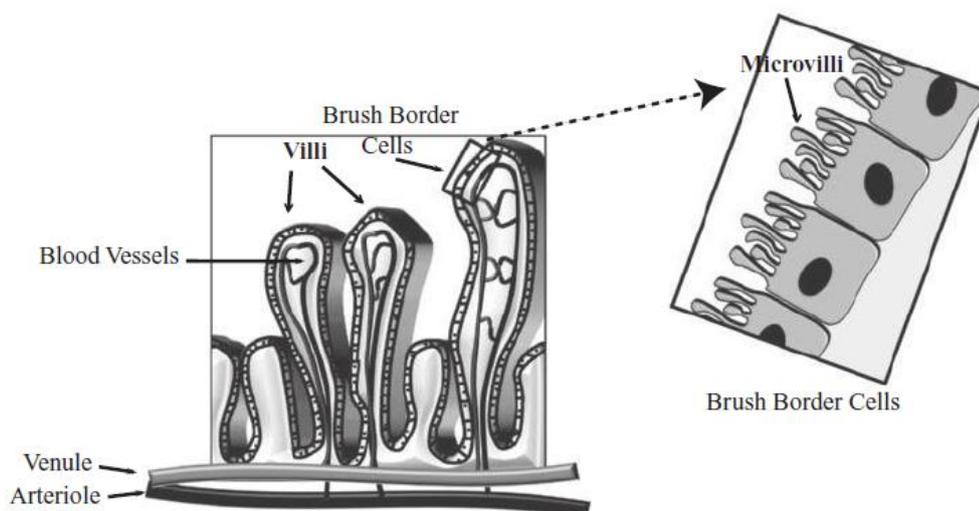


Ilustración 3 - Esquema morfológico del enterocito y su distribución en el intestino delgado (Rosenbaum, 2011)

Adicional a la elevada área superficial que caracteriza al intestino delgado, deben presentarse otros factores característicos de la molécula activa, para que esta sea capaz de atravesar la membrana formada por los enterocitos. Es aquí, donde se proponen varios mecanismos de difusión o paso a través de la bicapa lipídica.

- Difusión Pasiva: es la más común y más sencilla vía de difusión de fármacos a través de las membranas. La fuerza capaz de hacer este

impulso se denomina *gradiente de concentración o diferencia de potencial químico* y se basa en el paso de un soluto por una membrana, del compartimento más concentrado al menos concentrado. Como resultado, hay un movimiento neto del fármaco del lado más concentrado al lado menos concentrado, los fármacos capaces de unirse a las proteínas plasmáticas o algún otro tejido son descartados del gradiente. Dependiendo del tamaño y el carácter lipofílico o hidrofílico de la molécula, esta podrá difundir pasando a través del contenido celular o entre las uniones acuosas de enterocitos (Rosenbaum, 2011).

- Difusión mediada por transportadores: esta vía de difusión es utilizada en casos donde la molécula, por su tamaño o carácter, es incapaz de difundir por sí sola. Los transportadores son *proteínas* que residen en las membranas celulares y sirven para facilitar el paso de los productos químicos entre los lados de la membrana. Estos transportadores se han visto implicados además en los mecanismos tóxicos y terapéuticos de los fármacos (Rosenbaum, 2011). Dependiendo de la función y el direccionamiento del transportador, pueden ser “Uptake” (entrada) e “Efflux”(salida). En la Ilustración 4 se esquematizan los procesos de difusión por esta vía.

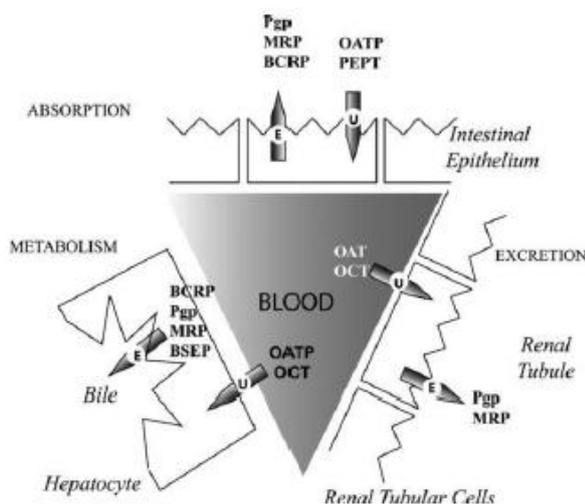


Ilustración 4 - Esquema del proceso de absorción de fármacos que involucran proteínas de transporte de membrana (Rosenbaum, 2011).

Debido a la alta complejidad descrita para los procesos de absorción de fármacos, se deben buscar soluciones experimentales que sean capaces de predecir la cinética de éstos, controlando todas las variables implicadas en los procesos farmacocinéticos. Los estudios de permeabilidad *in vitro* buscan suplir estas necesidades de manera sencilla y con un poco menos de rigor técnico, comparados con las metodologías *in situ* e *in vivo*.

El modelo *in vitro* basado en monocapas, pretende hacer la cuantificación en un compartimento receptor, de un compuesto (en nuestro caso un fármaco) que ha pasado de un compartimento dador. Este paso es a través de monocapas celulares, permitiendo calcular un coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) (Castillo et al, 2006). El coeficiente de permeabilidad aparente se expresa en $\text{cm}/\text{seg}^{-1}$; para modelos de cultivo celular Caco-2 se utiliza la siguiente ecuación (P. Artursson & Karlsson, 1991):

$$P_{ap} = \left(\frac{V}{A * C_i} \right) * \left(\frac{C_f}{T} \right)$$

Donde:

V es el volumen del compartimento basolateral en mL.

A es el área efectiva de siembra en cm^2

C_i es la concentración inicial de analíto en el compartimento apical en $\mu\text{g}/\text{mL}$.

C_f es la concentración final de analíto permeado en el tiempo *T*

T es el tiempo total del ensayo en segundos.

Esta ecuación, vista en términos de la derivada de la concentración, respecto al tiempo, puede reescribirse como:

$$P_{ap} = \left(\frac{dq}{dt} \right) \left(\frac{V}{A * C_i} \right) * \left(\frac{1}{60} \right)$$

Existen otro tipo de estudios *in vitro* de permeabilidad denominados PAMPA (“parallel artificial membrane permeation assay”), que consisten en la utilización de placas de microvaloración con numerosos insertos de naturaleza hidrofóbica como soporte y una membrana de permeación compuesta por una mezcla de lecitina y un disolvente orgánico inerte (Oltra, 2010). Estos ensayos aunque permiten disminuir los tiempos del ensayo, no dan un acercamiento tan directo como cuando se emplean líneas celulares, sin embargo siguen trabajando en el modelo experimental, buscando oportunidades de mejora.

La línea celular utilizada en nuestro ensayo corresponde a Caco-2. Estas células pertenecen a una línea continua de adenocarcinoma colorectal epitelial humano heterogéneo, de un paciente con síndrome praneoplásico de eritrocitosis. Fue descubierto por el Instituto Sloan-Kettering para la Investigación del Cáncer en cabeza de una investigación realizada por el Dr.

Jorgen Fogh. En el estudio se identificó que la patología era dependiente de la edad del paciente y mostraron un tiempo de duplicación *in vitro* de 48 a 72 horas. “Presentan un cariotipo modal de 45, XX con anomalías en cromosomas 3 y 9, y una ausencia en el cromosoma 17, secreta además la actividad eritropoyética en su medio de crecimiento, consecuentemente con la biología del tumor *in vivo*”. Se predijo que sería una herramienta de investigación en la fisiología celular de carcinoma (Sytkowski et al.). Después de muchos años, se han evidenciado las ventajas de utilizar Caco 2 en determinaciones farmacocinéticas, debido a que esta línea celular es capaz de hacer una diferenciación morfológica eficiente y espontánea. Desde sus primeros estudios, la línea celular Caco 2 ha presentado una expresión de polaridad celular, presencia de micro-vellosidades y diferenciación enterocítica, mucho más eficiente que otras líneas celulares (Chantret et al., 1988).

A pesar de las ventajas que presenta el comportamiento *in vitro* de Caco-2, como toda línea celular tiene conductas que no favorecen su utilización. A medida que se van realizando pases de la línea celular y se subcultiva, la capacidad para diferenciarse y expresar características morfológicas se va perdiendo, lo que limita calidad a las mediciones y a la linealidad del método; además las líneas clonadas contra los padres presentan diferencias (Sambuy et al., 2005). Aunque el montaje de los ensayos con Caco 2 no es complicado ni muy costoso comparados con estudios *in-vivo* en humanos, se requiere un nivel alto de dominio en técnicas de cultivo celular animal, este tipo de monocapas son muy susceptibles a daños mecánicos por mala manipulación, por lo que es necesario hacer control de integridad de membrana, ya sea de forma indirecta, midiendo resistencia transepitelial (TEER) o llevando a cabo ensayos directos con el reactivo Amarillo de Lucifer. La técnica que utiliza el reactivo Amarillo de Lucifer es bastante eficiente para este tipo de determinaciones, después de cada ensayo es recomendable aplicar la prueba y verificar que se ha realizado la medición bajo condiciones de integridad de membrana (Foster, Avery, Yazdanian, & Audus, 2000).

La técnica con el reactivo Amarillo de Lucifer, consiste en medir la cantidad de analito que atraviesa la membrana, partiendo del principio que la molécula viaja a través de la monocapa de Caco-2 por difusión paracelular pasiva (por los espacios entre las células) y además tiene baja permeabilidad. Por lo anterior, no atraviesa la membrana, si existen uniones estrechas entre las células. Es decir, que se determina la cantidad de Amarillo de Lucifer que atraviesa la membrana en un tiempo determinado, estos valores no deben superar el 5% de analito adicionado y su valor de permeabilidad aparente no debe superar los 12 nm/s.

Por otro lado, el ensayo se llevará a cabo sobre el fármaco Ampicilina que es un antibiótico Betalactámico, correspondiente a la familia de las penicilinas. Todos los antibióticos Betalactámico interfieren en la síntesis de peptidoglucano de la pared celular bacteriana, después de unirse al sitio activo, inhibe la enzima de transpeptidación que establece puentes cruzados entre las cadenas peptídicas que están unidas al esqueleto del peptidoglucano; el acontecimiento bactericida final es inhibición de la enzima autolítica de la pared, con posterior lisis bacteriana. Este fármaco es de primera elección en patologías como infecciones respiratorias, óticas y sinusales, así como el tratamiento de la meningitis. Por su estructura química, la Ampicilina tiene una absorción reducida en el intestino lo que ha generado una preocupación de la industria farmacéutica por realizar mejoras en la formulación, adicionando a las formulaciones componentes poliméricos que ejerzan un efecto sobre la absorción del principio activo (Rang et al, 2008). El polímero que se estudiará como posible implicado en el proceso de absorción intestinal, corresponde a una sal de sodio de poli ácido maléico (PAM 18 Na). El PAM 18 Na, es un polímero capaz de formar micelas y se ha probado como un ayudante en la solubilización y absorción de nitroimidazoles. En los estudios con estas moléculas activas, se ha visto que la solubilización depende moderadamente de la longitud de la cadena alquílica y en gran medida del grupo heterociclo del polímero (SALAMANCA et al, 2007).

Actualmente se conocen muchos estudios publicados a nivel nacional e internacional sobre la utilización de modelos *in vitro* con la línea celular Caco 2. En Colombia recientemente se han hecho investigaciones publicadas, en donde se evidencia la estandarización de este tipo de metodologías, en la Revista Colombiana de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional, se reportó la estandarización de una metodología a base de células Caco-2, donde se evidencia la importancia de utilizar estas líneas celulares y donde se pone en manifiesto las grandes ventajas que presenta la diferenciación espontánea de la línea. En el estudio, se evalúa la permeabilidad de rantidina y teofilina contra un blanco de PBS, finalmente el experimento mostró una correlación alta entre el comportamiento farmacocinético experimental y el reportado para cada una de las moléculas (Castillo et al., 2006). En la misma revista se publicó en el 2008, una revisión de la importancia del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), como herramienta robusta para la correlación de las condiciones *in vitro-in vivo*. El autor hace énfasis en la importancia de este sistema de clasificación para predecir los comportamientos farmacocinéticos de las moléculas, incluso de las nuevas entidades químicas que se piensan desarrollar; adicionalmente, expresa la necesidad de que las metodologías utilizadas para hacer estas determinaciones recreen al máximo, las condiciones *in vivo* para que la caracterización de las moléculas activas sea la adecuada (Baena & Ponce D' León, 2008).

Según la legislación Colombiana vigente, en la Resolución 1400 de 2001 se establece la Guía Biodisponibilidad y de Bioequivalencia de Medicamentos que trata el Decreto 677 de 1995. En este documento, se hace obligatorio realizar pruebas de bioequivalencia y biodisponibilidad para los fármacos que quieren ser comercializados, y si son genéricos esto es más crítico aún. Por esta razón, es que las industrias deben buscar soluciones eficientes para reportar al INVIMA los resultados que se piden. Aunque los estudios reportados concluyen que los resultados obtenidos por la metodología *in vitro* con Caco 2, no difieren de la realidad, es una metodología que aún no es muy conocida en Colombia. Los laboratorios Colombianos siguen realizando ensayos con técnicas *in situ* e *in vivo*, técnicas mucho más costosas y con implicaciones severas en la parte bioética, si se lograra implementar una metodología reproducible con líneas Caco 2, serían muchos más los ensayos de bioequivalencia para los fármacos altamente permeables y altamente solubles (Clase I), que se podrían hacer en menos tiempo y a menor costo. La misma FDA, acepta estos ensayos como efectivo en la predicción farmacocinética *in vivo* de fármacos (Castillo et al., 2006).

A nivel internacional, se han realizado publicaciones más profundas sobre la utilización de líneas Caco 2 en predicciones farmacocinéticas. En 2010 la Doctora Davinia Maria Oltra Noguera, publica una tesis de doctorado en la Universidad de Valencia, en donde describe detalladamente las consideraciones farmacocinéticas que se deben tener en cuenta para llevar a cabo ensayos *in vitro*. Ella se planteó como objetivos hacer una comparación de la variabilidad entre las metodologías *in vitro* e *in situ*, dentro de sus conclusiones hace énfasis en la gran utilidad que tienen los ensayos *in vitro* para predecir la permeabilidad de fármacos, adicionalmente no comenta alguna diferencia significativa entre el coeficiente de permeabilidad calculado por estas dos metodologías, y atribuye la poca variabilidad al desgaste de la línea debido al número de pases. Sugiere un máximo de 10 pases para un cultivo de células Caco 2 (Oltra, 2010). En otras publicaciones recientes a nivel internacional, se retoma la utilización de las líneas Caco 2 para la predicción de absorción intestinal, debido a la alta expresión de factores diferenciadores por parte de esta línea. En presencia de complejos enzimáticos, transportadores y morfologías intestinales, las mediciones son adecuadas y se recrean las condiciones intestinales. Así como este autor, muchos de los que trabajan con estas monocapas, resaltan la necesidad de medir la TEER de la monocapa y comprobar que ésta se encuentre en un número de pase adecuado (I. J. Hidalgo, Raub, & Borchardt, 2011).

Finalmente, aunque se han hecho esfuerzos por resaltar la importancia de esta metodología, se ponen en evidencia dos aspectos. No se ha establecido del todo la utilización de modelos *in vitro* con Caco 2 en Colombia, para predecir la permeabilidad intestinal y el coeficiente de permeabilidad aparente. Por otro lado, después de una revisión bibliográfica no se han encontrado reportes de

clasificación de antibióticos, entre ellos Ampicilina, por esta metodología *in vitro*. Tan sólo fue posible encontrar un reporte de 1999, en donde se pone en manifiesto el uso de Caco 2 para caracterizar el perfil de absorción intestinal de 13 antibióticos. El coeficiente de permeabilidad de estos antibióticos, especialmente cefaloridina y rifampicina, correspondió al reportado en la literatura (Biganzoli et al., 1999). Muchos grupos de investigación apuntan a la mejora de absorción intestinal de antibióticos como Ampicilina, utilizando matrices poliméricas como las que se mostraron anteriormente, pero no han utilizado metodologías estandarizadas con Caco 2, que les permita a estos investigadores determinar alguna diferencia significativa en las modificaciones. Por esta razón es que se pretende realizar la estandarización de un modelo *in vitro* con Caco 2, que conserve las ventajas farmacocinéticas descritas y que pueda ser aplicado al fármaco Ampicilina, como estándar y en presencia del polímero PAM 18 Na. Concluyendo sobre el efecto que tiene la inclusión de la matriz polimérica, en el perfil de absorción intestinal de la Ampicilina.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar una metodología *in vitro* que permita medir la absorción intestinal de antibióticos asociados al polímero PAM 18Na. El modelo *in vitro* se estandarizará con la línea de células intestinales Caco-2.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la línea celular Caco 2 en el laboratorio y los parámetros del ensayo.
- Estandarizar la metodología para evaluar la integridad de la membrana celular en Caco 2.
- Evaluar el nivel de absorción del antibiótico Ampicilina solo o asociado al polímero PAM-18Na en Caco 2.

5. METODOLOGÍA

5.1 ESTABLECER LA LÍNEA CELULAR CACO-2 EN EL LABORATORIO Y LAS CONDICIONES DEL ENSAYO

Como punto de partida, se inició con placas de 12 insertos o pozos (de marca Corning Costar®) en los que se tenían sembradas monocapas diferenciadas de células Caco 2, sobre una membrana específica de policarbonato de 0,4 micras de poro. Las células habían sido previamente descongeladas, sembradas y mantenidas bajo condiciones y protocolos definidos por el proveedor; éste entregó un certificado en donde garantiza la calidad de la monocapa y la integridad de la misma (certificado de evaluación del valor de Resistencia Trans Epitelial TEER). Las placas fueron compradas a La Unidad de Estudios Biofarmacéuticos y Toxicológicos de CIDEIM y fue el investigador Ricardo Rojas quien realizó la siembra.

El proveedor entregó las placas con 15 días de siembra e ingresaron al laboratorio para ser mantenidas. Las células permanecieron en medio DMEM (medio Eagle modificado por Dubelcco®) suplementado con L-Glutamina 1%, solución de penicilina/estreptomicina 1% y 10% de suero fetal bovino inactivado (56°C por 30 min), y fue este medio, el que se utilizó como mantenimiento hasta el día 25. Para la reposición del medio, con mucho cuidado, se descartó el medio de cada inserto con una micropipeta y se puso una alícuota suficiente de DMEM suplementado. Se realizó reposición cada tres días, por lo que fue necesario realizar esta actividad 3 veces antes de llevar a cabo los ensayos. Los medios de cultivo, durante estos estudios fueron proporcionados por la unidad de preparación de medios del centro de investigaciones CIDEIM, el cual entregó certificado de calidad del producto y garantía de esterilidad con filtración terminal.

Las células se mantuvieron durante este tiempo bajo condiciones de completa esterilidad, manipulándolas bajo cabina de flujo laminar marca ESCO Clase II BSC, y en un cuarto con control estricto de limpieza y de aire independiente (con diferencial de presión). La incubadora donde permanecieron las células, marca Binder, cuenta con un sistema de entrada de CO₂ y control de temperatura. Se establecieron, para el mantenimiento de las células, las siguientes condiciones:

Temperatura: 37°C +/- 0,5 °C

%CO₂: 5% +/- 0,5%

Humedad Relativa: 80-90%

Una vez las células cumplieron los 25 días de sembradas, se retiraron de la incubadora y se descartó con micropipeta de 1000 µl el medio DMEM suplementado. Posteriormente se realizaron 3 lavados con solución PBS, adicionando la cantidad suficiente y dejando en la incubadora por 3 minutos. Se realizó agitación mecánica y se descartó la solución.

Finalmente, se adicionó en cada pozo medio HBSS con HEPES (Hank's Balanced Salt Solution) sin rojo de fenol, con calcio y magnesio (25 mmol), medio establecido para llevar a cabo el ensayo. En el compartimento basolateral se adicionaron 1,5 ml del medio descrito y en el compartimento apical 500 µl. El HEPES, es un agente tampón altamente utilizado en el cultivo celular, debido a que es capaz de mantener el pH fisiológico del medio, a pesar de los cambios en las condiciones. Fue necesario verificar el pH, ya que este varía en cada lado del plato de cultivo. El plato se coloca en un equipo con agitación y control de temperatura, de nombre Incubating Orbital Shaker marca VWR. Lo anterior, con el fin de simular las condiciones del movimiento peristáltico humano. La velocidad establecida para el shaker fue de 80 RPM. En este punto se puede llevar a cabo el ensayo.

5.2 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA CACO-2

La integridad de la monocapa fue comprobada utilizando el reactivo Amarillo de Lucifer, el cual se cuantificó en un Lector Jasco – FMP 825 proporcionado por la Universidad de Valle, midiendo la fluorescencia del reactivo. Este ensayo se aplicó cada vez que se finalizaba una ronda de medidas, con el fin de garantizar que los resultados fueron adecuados y tomados en una monocapa estable. Inicialmente se hizo una preparación de los reactivos, ya que el Amarillo de Lucifer viene en polvo para reconstituir por 25 mg.

Se adicionó 1 ml de agua estéril al vial que contiene el polvo, llegando a una concentración inicial de 25 mg/ml. Posteriormente se realizó una dilución, tomando 100 µl de la solución de 25 mg/ml, y llevándolo a 500 µl con agua estéril. De la dilución anterior se tomaron 100 µl, completando a 500 µl, con

agua estéril y en un tubo eppendorf. Finalmente se llegó a la concertación de ensayo que corresponde a 500 µg/ml.

Seguidamente, se preparó una curva de calibración de 7 puntos y un blanco, se incluyeron concentraciones de 1, 5, 10, 15, 20, 30 y 50 µM. La curva fue preparada en el mismo medio y bajo las mismas condiciones.

Para cada ensayo con el reactivo, se aplicó la siguiente metodología:

- Se lavaron cuidadosamente los insertos dos veces con PBS precalentado a 37°C, evitando tocar la monocapa celular. En el último lavado se incubó por 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se eliminó por completo el PBS de los insertos en ambas cámaras, apical y basolateral. Se adicionó el volumen de buffer de transporte (HBSS/ HEPES 25 mmol) a la cámara basolateral de todos los pozos.

Finalmente, se adicionó a la cámara apical, 500 µl de HBSS/HEPES 25 mmol con Amarillo de Lucifer a una concentración de 500 µg/ml. Posteriormente se incubó a 37°C y a 80 rpm, por 60 minutos. Pasado este tiempo se tomó la muestra de 1000 µl del lado basolateral y se congelaron a -20°C hasta su análisis.

Se realizaron las mediciones en el equipo Jasco – FMP 825 proporcionado por la Universidad de Valle, bajo las siguientes condiciones:

Longitud de onda excitación	428 nm
Longitud de onda emisión	536 nm

5.3 ENSAYOS DE PERMEABILIDAD DE AMPICILINA SOLA O ASOCIADA AL POLÍMERO PAM 18NA.

Para llevar a cabo el ensayo, se tuvo en cuenta un diseño experimental donde se buscaba recolectar datos de la cantidad del compuesto que atravesaba la monocapa de células Caco 2, en presencia de Metoprolol como estándar interno de alta permeabilidad. Se evaluaron cuatro sistemas distribuidos de la siguiente manera:

- Sistema I: Ampicilina, Metoprolol, PAM 18 Na.
- Sistema II: Metoprolol, Ampicilina
- Sistema III: PAM 18 Na, Ampicilina
- Sistema IV: PAM 18 Na, Metoprolol

Donde cada compuesto mencionado se preparó a una concentración final de trabajo de 1 mM.

Para la preparación de las soluciones se calculó la cantidad en miligramos, necesaria para obtener la concentración deseada. Posteriormente, bajo cabina de flujo EBSCO Clase II, se pesó dicha cantidad y se preparó un tubo ependorff de 1,5 ml que tuviera la cantidad exacta de cada compuesto, correspondiente a cada sistema. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada uno de los cuatro sistemas, en tres ensayos realizados en días diferentes.

El procedimiento que se siguió corresponde al siguiente:

Se tenía el sistema con los compuestos disueltos (concentración de 1mM), en una solución acuosa de HBSS con HEPES (25 mM). Se tomó una alícuota de 500 µl de cada sistema y se adicionó del lado apical de la monocapa en los doce pozos de cultivo, lo anterior bajo cabina de flujo laminar. Posteriormente se llenó el lado basolateral del pozo con 1,5 ml de HBSS/ HEPES 25 mM, y se llevó al equipo Incubating Orbital Shaker, el cual fue configurado a una temperatura de 37°C y una velocidad de 80 RPM. Se encendió el equipo y después del tiempo establecido, se realizó la toma de 1 ml de muestra del lado basolateral.

Se determinó tomar muestras en un lapso de tiempo de 2,5 horas, para cada uno de los doce pozos de la palca, quedando los tiempos de la siguiente manera 15, 30, 60, 90, 120, 150 minutos:

- 2 muestras cada 15 minutos.
- 4 muestras cada 30 minutos.

Finalmente después de cada ensayo, se realizó el lavado de la membrana (descrito anteriormente) y se llevó a cabo el ensayo de integridad de membrana con el Amarillo de Lucifer. Las muestras tomadas se cuantificaron mediante la metodología UHPLC estandarizada y validada.

5.4 MATRIZ DE MARCO LÓGICO

Objetivo General: Estandarizar una metodología <i>in vitro</i> que permita medir la absorción intestinal de antibióticos liberados por el polímero PAM 18Na. El modelo <i>in vitro</i> se estandarizará con la línea de células intestinales Caco-2.			
Objetivos Específicos	Actividad	Indicadores	Supuestos
Establecer la línea celular CaCo2 en el laboratorio y condiciones del ensayo	Establecer los medios de cultivo necesarios para llevar a cabo el ensayo y mantener la monocapa adecuada evaluar la permeabilidad.	POSITIVO: las monocapas son capaces de realizar la absorción del compuesto y éste atraviesa adecuadamente la membrana confluyente.	Están a disposición las monocapas de Caco 2 diferenciadas proporcionadas por el CIDEIM. Las células de Caco 2 han sido ampliamente utilizadas y se conoce su mecanismo de adaptación. Se cuenta con los medios de cultivo necesarios para llevar a cabo estos ensayos.
		NEGATIVO: no se evidencia paso ni disolución del fármaco en el medio establecido.	

	<p>Establecer los medios de cultivo necesarios para mantener la integridad de la monocapa de Caco 2, los cuales servirán como matriz para su posterior cuantificación.</p>	<p>POSITIVO: el medio de cultivo utilizado es capaz de mantener la integridad de las células y proporcionarle los nutrientes para la supervivencia. Las células sobreviven</p>	<p>Se tiene el conocimiento de cultivos estandarizados para mantener estas células en condiciones normales y diferenciadas.</p>
	<p>Establecer las condiciones de ambiente celular relacionadas al mantenimiento de las células, entre las que se encuentran el pH, la humedad relativa, concentración de CO₂, temperatura, condiciones de movimiento.</p>	<p>POSITIVO: después de un tiempo establecido, el medio de cultivo no cambia de pH y las células logran sobrevivir y mantenerse vivas. El medio no cambia de color en el tiempo.</p>	<p>Se disponen de condiciones estandarizadas para mantener estas células diferenciadas, así mismo se disponen de los equipos para mantener estas condiciones de cultivo.</p>
		<p>NEGATIVO: el medio de cultivo cambia de color con el tiempo, basificando o acidificando las condiciones ambientales de las células.</p>	

Estandarizar la metodología para evaluar la integridad de la membrana celular en Caco2.	Búsqueda de metodología para evaluar la integridad de la membrana utilizando el reactivo amarillo de Lucifer.	<p>POSITIVO: la membrana se encuentra íntegra en el tiempo y las células responden a la tinción por el reactivo.</p> <p>NEGATIVO: la membrana no se encuentra íntegra en el tiempo y muestra un resultado negativo en la integridad de membrana.</p>	<p>No se dispone del reactivo en la universidad pero si disponemos del presupuesto para comprarlo.</p> <p>El tiempo de entrega del reactivo desde el proveedor es óptimo.</p>
	Realizar el ensayo de integridad de membrana con el reactivo amarillo de Lucifer y determinar la integridad de la membrana		
Evaluar el nivel de absorción del antibiótico Ampicilina solo o liberado por el polímero PAM-18Na en CaCo2.	Realizar los ensayos con las monocapas de Caco 2 íntegras para el principio activo Ampicilina sin ninguna modificación para su posterior cuantificación.	<p>POSITIVO: Se recolectan muestras del lado basolateral de la monocapa y es posible realizar la cuantificación de la cantidad de Ampicilina que atravesó la membrana. Es posible calcular con las concentraciones encontradas los parámetros farmacocinéticos de biodisponibilidad y factor de permeabilidad.</p> <p>NEGATIVO: El principio activo no atraviesa la monocapa o esta no hace la</p>	
	Realizar los ensayos con las monocapas de Caco 2 íntegras para el principio activo Ampicilina asociada al polímero PAM18 Na.		

		función barrera intestinal.	
--	--	-----------------------------	--

6. IMPACTO AMBIENTAL

Para la ejecución del proyecto se han tenido en cuenta reactivos que puedan ser usados para el mantenimiento de tejidos. Estos reactivos NO DEBEN ser tóxicos para el cultivo celular, debido a que podría perjudicar la integridad del ensayo. Por lo anterior se considera que el potencial impacto ambiental generado por la propuesta, no es negativo. En este tipo de estudios la generación de reactivos de desecho es muy baja, ya que los volúmenes son del orden de microlitros, adicionalmente los lavados que se hacen a las monocapas, generan desechos que pueden perfectamente ser descartados. Debido a que se trabajan con sustancias como solución salina, suero fetal bovino, medio DMEM, medio HBSS y HEPES, es cuestión de realizar una neutralización del pH y descartar.

El único reactivo que podría llegar a necesitar un paso extra en el descarte, es el Amarillo de Lucifer. Este reactivo esta en concentraciones mínimas, y las diluciones que se hacen sobre el patrón son muy grandes, por lo que no genera una preocupación tóxica para el ambiente. En términos de reactivos, cabe aclarar, que nuestro proyecto está asociado con el plan de riesgo químico del Almacén de la Universidad Icesi. Este almacén, se encarga de deshacerse de manera segura y sostenible, de los desechos químicos que puedan llegar a ser potencialmente contaminantes para el ambiente.

Si bien, la generación de desechos químicos no es muy alta, existe un volumen más grande de desecho de material plástico. Todos los materiales que se utilizan en el laboratorio y en el ensayo, deben ser estériles y no son reutilizables para los ensayos, por lo anterior es posible que se presenten altos volúmenes de plástico. Para este tipo de materiales, la Universidad Icesi también tiene un plan de desecho, pero se intentará realizar ensayos de corrido y seguidos que permitan realizar alícuotas simultáneas, con un mismo material plástico, sin realizar un gasto exagerado de éstos.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de la integridad de la membrana Caco-2 – Resistencia Transepitelial (TEER) y Amarillo de Lucifer.

Los tres platos de cultivo, con monocapas diferenciadas de Caco 2, fueron entregados con certificado bajo las siguientes condiciones.

Células: Caco-2, ATCC Código HTB-37.

Inserto: Policarbonato, 12 mm, 1.12 cm², 0.4 µm de poro, Costar ref. 3401.

Medio de cultivo: DMEM, 10% SFB inactivado, 1X Penicilina/Estreptomicina, 1X aminoácidos no esenciales.

En la Tabla 1, se muestran los tiempos de cultivo y el número de pase de cada plato.

Tabla 1 - Tiempo de cultivo y número de pase de los tres platos de cultivo

Número de Plato	Pase	Tiempo de Cultivo (días)
1	40	25
2	44	25
3	46	25

En las Tablas 1- 4, se muestran los resultados diligenciados en el certificado de cada plato de cultivo. Los valores corresponden a las mediciones de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las monocapas de células Caco 2 diferenciadas, de los tres platos de cultivo utilizados para los tres ensayos.

Tabla 2 - Medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial Plato ensayo 1

Monocapa No.	TEER 1 ($\Omega \text{ cm}^2$)	TEER 2 ($\Omega \text{ cm}^2$)	TEER 3 ($\Omega \text{ cm}^2$)	Promedio	Desviación Estándar	CV%
1	448	434	443	442	7,1	1,6
2	449	438	443	443	5,5	1,2
3	439	456	448	448	8,5	1,9
4	459	460	463	461	2,1	0,5
5	457	465	461	461	4,0	0,9
6	460	455	456	457	2,6	0,6
7	470	464	473	469	4,6	1,0
8	462	461	465	463	2,1	0,4
9	460	464	475	466	7,8	1,7
10	472	471	480	474	4,9	1,0
11	469	486	473	469	3,5	0,7
12	484	481	480	482	2,1	0,4

Tabla 3 - Medición de la Resistencia eléctrica Transepitelial Plato ensayo 2

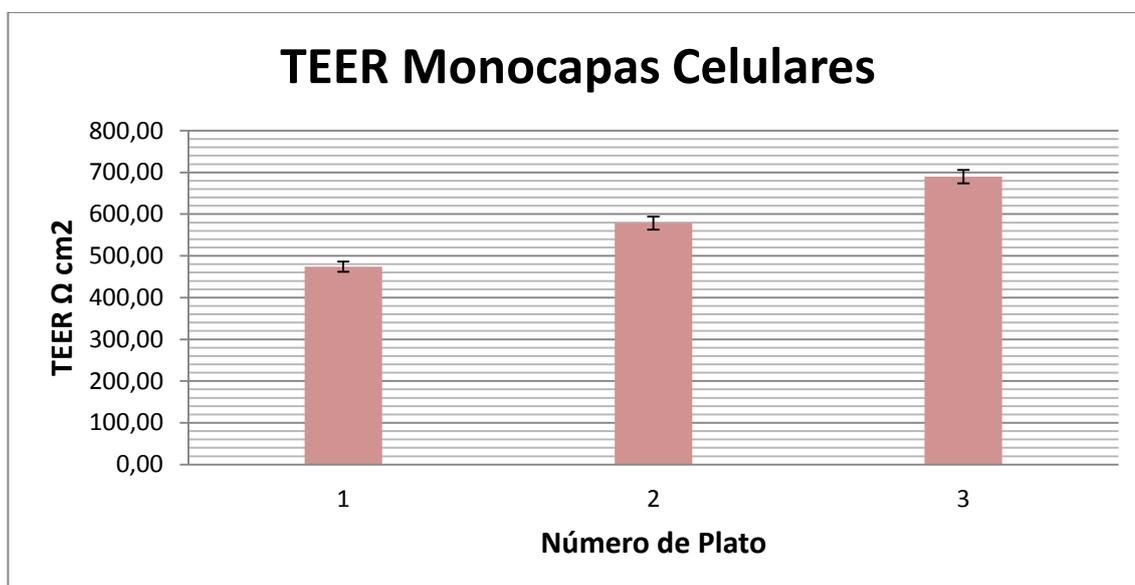
Monocapa No	TEER 1 ($\Omega \text{ cm}^2$)	TEER 2 ($\Omega \text{ cm}^2$)	TEER 3 ($\Omega \text{ cm}^2$)	Promedio	Desviación Estándar	CV%
1	566	575	578	573	6,2	1,1
2	593	592	592	592	0,6	0,1
3	579	599	595	591	10,6	1,8
4	572	579	580	577	4,4	0,8
5	577	573	581	577	4,0	0,7
6	602	605	602	603	1,7	0,3
7	595	606	602	601	5,6	0,9
8	589	581	573	581	8,0	1,4
9	563	572	573	569	5,5	1,0
10	562	554	561	559	4,4	0,8
11	553	554	558	555	2,6	0,5
12	567	553	575	565	11,1	2,0

Tabla 4 - Medición de la Resistencia Transepitelial Plato ensayo 3

Monocapa No	TEER 1 ($\Omega \text{ cm}^2$)	TEER 2 ($\Omega \text{ cm}^2$)	TEER 3 ($\Omega \text{ cm}^2$)	Promedio	Desviación Estándar	CV%
1	596	589	619	601	15,7	2,6
2	598	575	612	595	18,7	3,1
3	580	588	589	586	4,9	0,8
4	625	615	627	622	6,4	1,0
5	583	595	581	586	7,6	1,3
6	601	604	596	600	4,0	0,7

7	640	645	644	643	2,6	0,4
8	569	570	576	572	3,8	0,7
9	655	636	654	648	10,7	1,6
10	590	582	580	584	5,3	0,9
11	607	607	605	606	1,2	0,2
12	654	653	650	652	2,1	0,3

Se graficaron los promedios de TEER de los tres platos de cultivos, medidos en ($\Omega \text{ cm}^2$), para cada uno de los numero de pase de las monocapas. Los resultados se muestran en la Grafica 1



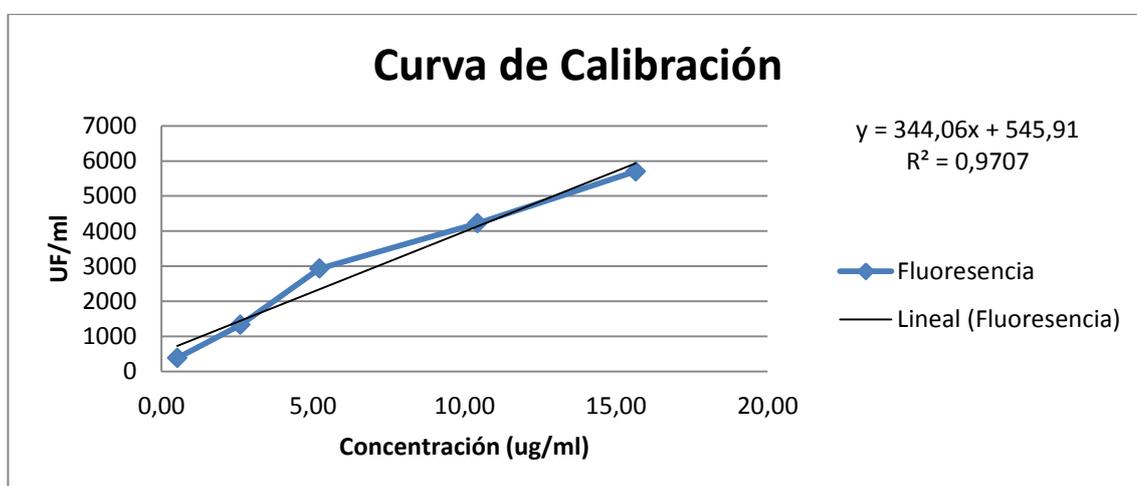
Grafica 1 - TEER promedio en los tres platos de cultivo

Para garantizar la integridad de la monocapa finalizado cada ensayo, se realizó la medición de permeabilidad del reactivo amarillo de lucifer. Este reactivo es permeable en cantidades mínimas cuando la monocapa está integra.

Se realizó una curva de calibración del reactivo amarillo de lucifer, en donde se evaluaron concentraciones de 1, 5, 10, 20, 30 μM contra la fluorescencia de las muestras. Para efectos de cálculo, se utilizarán unidades de $\mu\text{g/mL}$ en todas las determinaciones. En la Tabla 5 se muestran los datos de la curva de calibración y en la Gráfica 2 se muestra la curva y la ecuación de la recta.

Tabla 5 - Curva de calibración del marcador de permeabilidad Amarillo de Lucifer

Concentración (ug/ml)	Fluorescencia
0,52	384,1176
2,61	1329,2006
5,22	2933,3466
10,43	4223,5682
15,65	5703,0571



Grafica 2 - Curva de calibración marcador de permeabilidad Amarillo de Lucifer

Se realizó la lectura de las muestras después del ensayo de integridad de membrana, utilizando un lector de fluorescencia marca Jasco – FMP 825 proporcionado por la Universidad de Valle, y con una longitud de onda de excitación de 428nm y una de emisión de 536nm. En la Tabla 6 se muestran los resultados de las lecturas, para los tres platos de cultivo, nombrados como Plato 1,2 y 3.

Tabla 6 - Resultado lecturas ensayo de integridad de membrana Platos 1, 2, 3, estándar y blanco.

Numero Pozo	Unidades de fluorescencia				
	<i>Plato 1</i>	<i>Plato 2</i>	<i>Plato 3</i>	<i>Blanco</i>	<i>Estándar</i>
1	209,913	143,804	55,826	301,647	8207,635
2	91,364	24,374	-7,463	-	-
3	114,326	24,927	154,888	-	-
4	33,082	135,039	123,349	-	-
5	69,813	143,415	120,209	-	-
6	184,128	156,017	98,656	-	-
7	30,400	99,374	40,308	-	-
8	31,889	165,236	46,652	-	-
9	122,854	20,465	147,936	-	-
10	32,521	65,494	127,292	-	-
11	16,368	44,552	178,441	-	-
12	120,811	89,277	169,020	-	-

A partir de los resultados de la Tabla 6, se calculó el porcentaje de reactivo permeado (Ecuación 1), respecto a un estándar de cantidad adicionada y un blanco. Este porcentaje se halló para los tres platos de cultivo, utilizando la siguiente metodología:

$$\% \text{ Permeabilidad} = \frac{\text{Fluorescencia de la muestra} - \text{Blanco}}{\text{Fluorescencia del estándar} - \text{Blanco}} * 100 \quad (1)$$

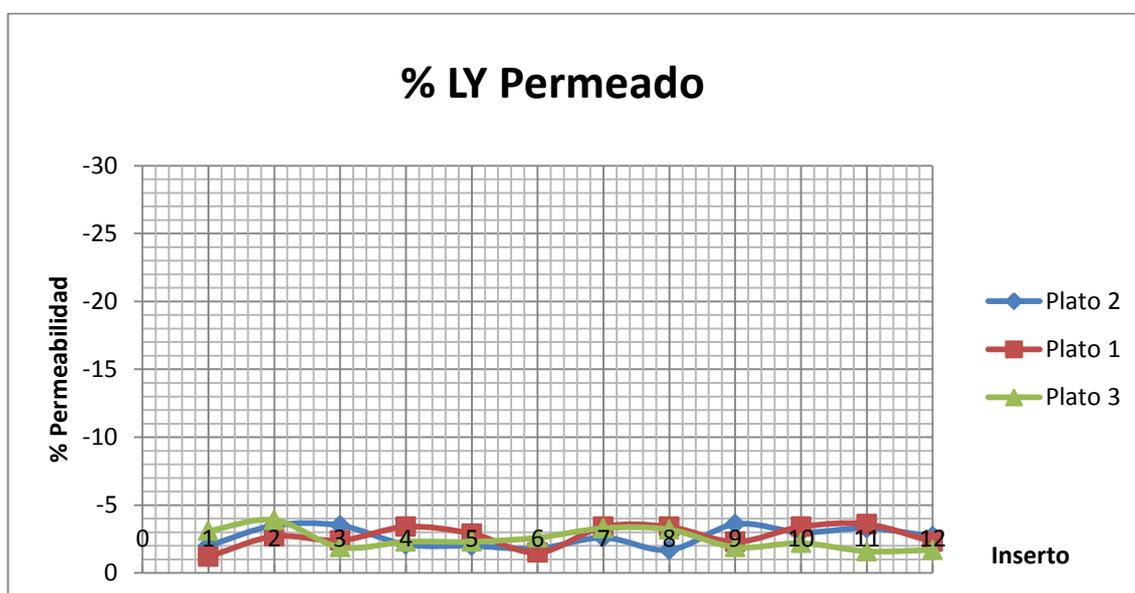
$$\% \text{ Permeabilidad} = \frac{(209,913) - (301,647)}{(8207,635) - (301,647)} * 100 = -1,16\%$$

En la Tabla 7 se muestran los porcentajes calculados para los tres platos de cultivo, utilizando el anterior procedimiento de cálculo.

Tabla 7 - Porcentaje de Amarillo de Lucifer permeado respecto a un estándar adicionado

Número Pozo	Plato 1	Plato 2	Plato 3
1	-1,2	-2,0	-3,1
2	-2,7	-3,5	-3,9
3	-2,4	-3,5	-1,9
4	-3,4	-2,1	-2,3
5	-2,9	-2,0	-2,3
6	-1,5	-1,8	-2,6
7	-3,4	-2,6	-3,3
8	-3,4	-1,7	-3,2
9	-2,3	-3,6	-1,9
10	-3,4	-3,0	-2,2
11	-3,6	-3,3	-1,6
12	-2,3	-2,7	-1,7

En la Grafica 3 se muestra el porcentaje de Amarillo de Lucifer permeado respecto al número de pozo, para los tres platos de cultivo.



Grafica 3 - Porcentaje de Amarillo de Lucifer Permeado en cada uno de los pozos

Por otro lado, a partir de la ecuación de la curva de calibración (Ecuación 2), se calculó la cantidad en $\mu\text{g/ml}$ de Amarillo de Lucifer permeado por la membrana.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de los tres platos. El siguiente procedimiento, muestra la ruta de cálculo teniendo en cuenta el pozo 1 del Plato 1 (209,913 UF):

$$y = 344,06X + 545,91 \quad (2)$$

$$X \left(\frac{ug}{ml} \right) = \frac{y \left(\frac{UF}{ml} \right) - 545,91}{344,06}$$

$$X \left(\frac{ug}{ml} \right) = \frac{209,913 \left(\frac{UF}{ml} \right) - 545,91}{344,06} = -0,98 \text{ ug/ml}$$

Tabla 8 - Cantidad de Amarillo de Lucifer permeado finalizado el ensayo
 $\mu\text{g/ml}$

Numero Pozo	Plato 1	Plato 2	Plato 3
1	-1,0	-1,2	-1,4
2	-1,3	-1,5	-1,6
3	-1,3	-1,5	-1,1
4	-1,5	-1,2	-1,2
5	-1,4	-1,2	-1,2
6	-1,1	-1,1	-1,3
7	-1,5	-1,3	-1,5
8	-1,5	-1,1	-1,5
9	-1,2	-1,5	-1,2
10	-1,5	-1,4	-1,2
11	-1,5	-1,5	-1,1
12	-1,2	-1,3	-1,1

Con el fin de evidenciar la permeabilidad del reactivo Amarillo de Lucifer, se calculó a partir de las concentraciones de la Tabla 8, el valor de permeabilidad aparente (P_{ap}) para este compuesto. A continuación, se muestra la forma de cálculo utilizada, teniendo en cuenta la Ecuación 3, y el resultado del pozo 1 Plato 1 (Tabla 8):

$$P_{ap} = \left(\frac{V}{A * Ci} \right) * \left(\frac{Cf}{T} \right) (3)$$

$$P_{ap} = \left(\frac{1,5ml}{1,12cm^2 * 45,72 ug/ml} \right) * \left(\frac{-0,98 ug/ml}{3600seg} \right)$$

$$P_{ap} = -8,1 \times 10^{-6} \frac{cm}{seg}$$

A continuación se muestran en la Tabla 9 los resultados de permeabilidad para el Amarillo de Lucifer, en las tres placas de cultivo.

Tabla 9 - Valores de P_{ap} en cm/seg del Amarillo de Lucifer

Número Pozo	P_{ap} Cm*seg ⁻¹		
	Plato 1	Plato 2	Plato 3
1	8,1E-06	8,6E-06	1,0E-05
2	9,3E-06	1,1E-05	1,1E-05
3	9,3E-06	1,1E-05	7,8E-06
4	1,1E-05	8,6E-06	8,6E-06
5	1,0E-05	8,6E-06	8,6E-06
6	7,8E-06	7,8E-06	9,3E-06
7	1,1E-05	9,3E-06	1,1E-05
8	1,1E-05	7,8E-06	1,1E-05
9	8,6E-06	1,1E-05	8,6E-06
10	1,1E-05	1,0E-05	8,6E-06
11	1,1E-05	1,1E-05	7,8E-06
12	8,6E-06	9,3E-06	7,8E-06

7.2 Cuantificación de fármacos y determinación de coeficientes de permeabilidad aparente (P_{ap}).

Después de realizado el ensayo de permeabilidad, sobre monocapas Caco-2 diferenciadas y en buen estado, se colectaron las muestras de los compartimentos basolateral y apical. Los viales con las muestras tomadas se congelaron a una temperatura de -20°C , debido a que la Ampicilina tiende a degradarse mientras esta en solución. Para evitar incremento de degradación de los fármacos analizados, no se utilizaban muestras con más de un día de preparación, si el análisis se extendía, se tomaba una nueva alícuota. Para el análisis de las muestras se empleó un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia ACQUITY UPLC H-CLASS (Waters) con detector de matriz de fotodiodos (PDA), columna de fase reversa C18 ACQUITY CSH 2.1 mm X 100 mm, $1,7\ \mu\text{m}$ (Waters) y software Empower 3. El método analítico desarrollado para la cuantificación de los activos Ampicilina y Metoprolol, fue de elución por gradiente, empleando como fase móvil acetonitrilo: buffer fosfato ajustado a pH 4.5 ± 0.1 con solución de ácido fosfórico al 5%.

El flujo de la fase móvil fue de $0.5\ \text{mL/min}$; volumen de inyección de $2\ \mu\text{L}$ (para muestras del lado basolateral) y $1\ \mu\text{L}$ (para muestras del lado apical); tiempo de corrido de 4 min; temperatura de columna de $35\ ^{\circ}\text{C}$, temperatura del automuestreador de 15°C y longitud de onda de 215 nm. Las muestras permanecieron en congelador a -20°C hasta el momento de ser analizadas, se descongelaron a temperatura ambiente, se tomaron $0.5\ \text{mL}$ de cada muestra y se filtraron con filtros de membrana Millipore de $0.22\ \mu\text{m}$, finalmente se dispusieron en viales y se analizaron bajo las condiciones descritas.

Después de los corridos cromatográficos se obtuvieron resultados de área de pico, para los dos fármacos evaluados, Metoprolol y Ampicilina sódica. En el Anexo 1, se muestran las áreas de los picos de Metoprolol y Ampicilina sódica cuantificados en los 3 ensayos y segregados en los 4 sistemas evaluados. En algunos casos, la señal emitida por el fármaco no pudo ser detectada, para ello se utilizó la connotación "No Reporta".

Para cada uno de los sistemas, se corrió una curva de calibración junto con las muestras analizadas, es decir, durante la cuantificación para cada día de análisis por UPLC se preparó una curva de calibración. Estas curvas de calibración se utilizaron para calcular la cantidad de fármaco permeado, en unidades de $\mu\text{g/ml}$. Finalmente se muestran las curvas de calibración, para Metoprolol y Ampicilina sódica, correspondientes a la corrida del Sistema I.

Cabe aclarar, que se utilizaron diferentes curvas para los cálculos en cada corrida.

Tabla 10 - Curvas de calibración Ampicilina (a) y Metoprolol (b)- Sistema I

Curva de Calibración Ampicilina (a)		Curva de Calibración Metoprolol (b)	
Concentración (ug/ml)	Área Amp	Concentración (ug/ml)	Área Met
0,1	204	0,1	No reportado
0,4	2094	0,3	943
1,9	21889	1,3	14452
3,7	47967	2,7	29505
11,1	151431	8,0	88881
18,6	289314	13,4	154826

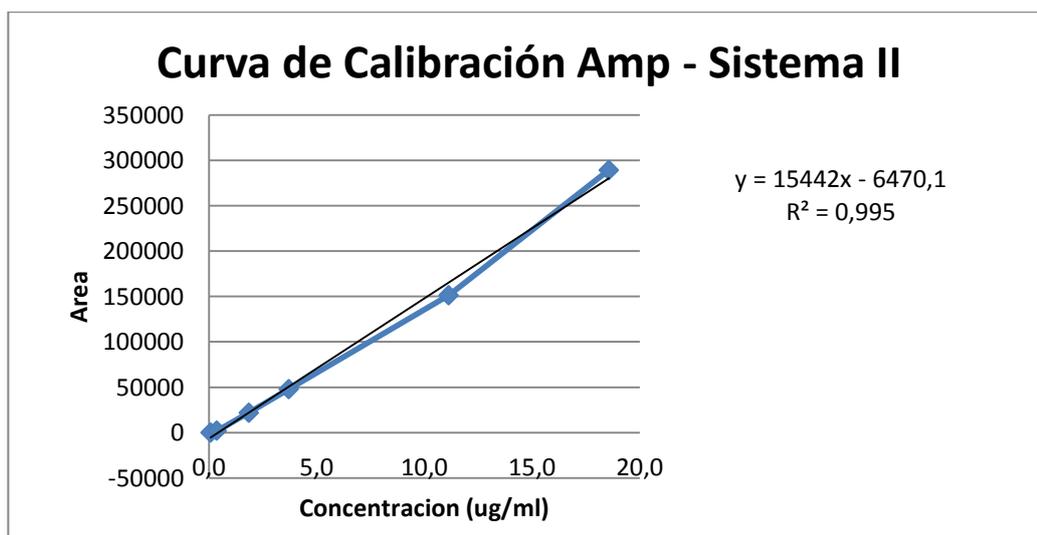


Gráfico 4 - Curva de calibración Ampicilina - Corrida Sistema I

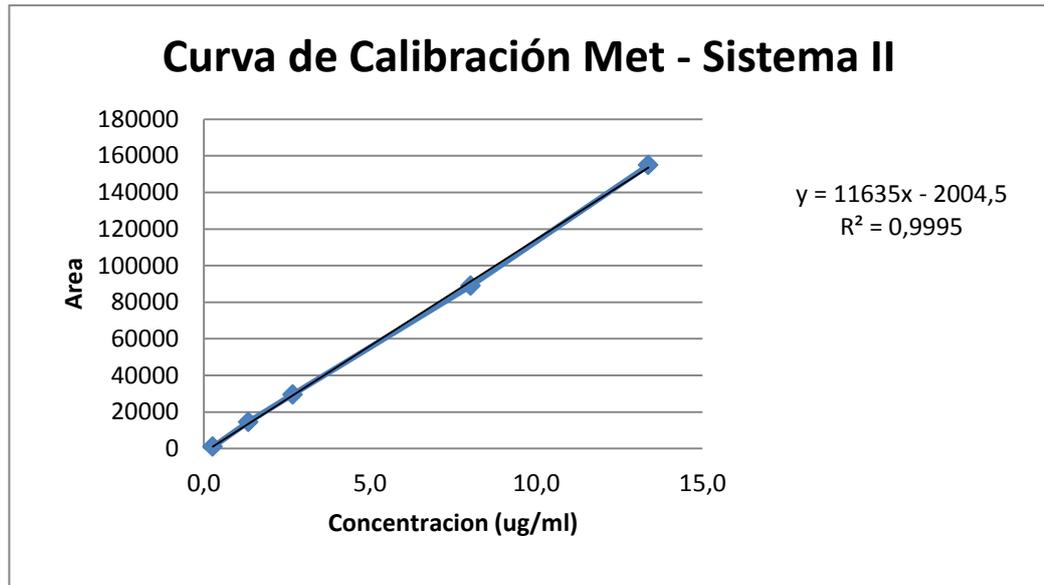


Gráfico 5 - Curva de calibración Metoprolol- Corrida Sistema I

Con las concentraciones determinadas, se procedió a realizar un ajuste en este valor. Esta corrección es muy importante porque la metodología utilizada en el ensayo fue con “reposición de medio” en la cámara basolateral, en la cual a cada tiempo de muestreo se tomaron 1000 µl de solución, permaneciendo 500 µl en la cámara. Generando un incremento progresivo de la concentración final.

Trabajar solamente con las cantidades determinadas en los viales de cada muestreo, generaría un desbalance de masas en los cálculos. Por lo anterior, fue necesario calcular la concentración acumulada en cada tiempo. De la Tabla 23 a la Tabla 26, se muestran las concentraciones acumuladas respecto al tiempo de ensayo en minutos. De la Gráfica 4 a 9 se muestran las gráficas correspondientes a estos resultados.

Tabla 11 - Concentración acumulada de Ampicilina y Metoprolol respecto al tiempo - Sistema I

Ensayo	Sistema	Fármaco	Tiempo (min)	Concentración acumulada promedio de los insertos (µg/ml)
1	1	Amp	0	0
			15	0,709
			30	1,123
			60	2,002
			90	1,813

			120	2,016
			150	2,223
1	1	Met	0	0
			15	8,042
			30	22,882
			60	29,383
			90	55,942
			120	67,917
			150	79,597
			2	1
15	0,699			
30	1,066			
60	1,427			
90	1,857			
120	2,257			
150	2,120			
62	1	Met		
			15	2,856
			30	13,414
			60	13,414
			90	26,037
			120	36,104
			150	66,175
			3	1
15	0,640			
30	0,776			
60	1,539			
90	1,502			
120	1,722			
150	2,750			
3	1	Met		
			15	17,979
			30	57,901
			60	93,871
			90	112,309
			120	129,330
			150	149,412

Tabla 12 - Concentración acumulada de Ampicilina y Metoprolol respecto al tiempo - Sistema II

Ensayo	Sistema	Fármaco	Tiempo (min)	Concentración acumulada promedio de los insertos (µg/ml)
1	2	Amp	0	0
			15	0
			30	0
			60	0
			90	6,140
			120	6,523
			150	7,637
1	2	Met	0	0
			15	0,208
			30	0,386
			60	0,676
			90	0,676
			120	1,352
			150	1,387
2	2	Amp	0	0
			15	0,449
			30	0,666
			60	0,917
			90	3,430
			120	38,988
			150	73,030
2	2	Met	0	0
			15	3,288
			30	3,442
			60	4,751
			90	17,327
			120	11,400
			150	12,025
3	2	Amp	0	0
			15	0,518
			30	1,286
			60	1,286
			90	1,286
			120	2,400
			150	46,491
3	2	Met	0	0

			15	3,044
			30	131,082
			60	180,889
			90	138,785
			120	132,338
			150	132,533

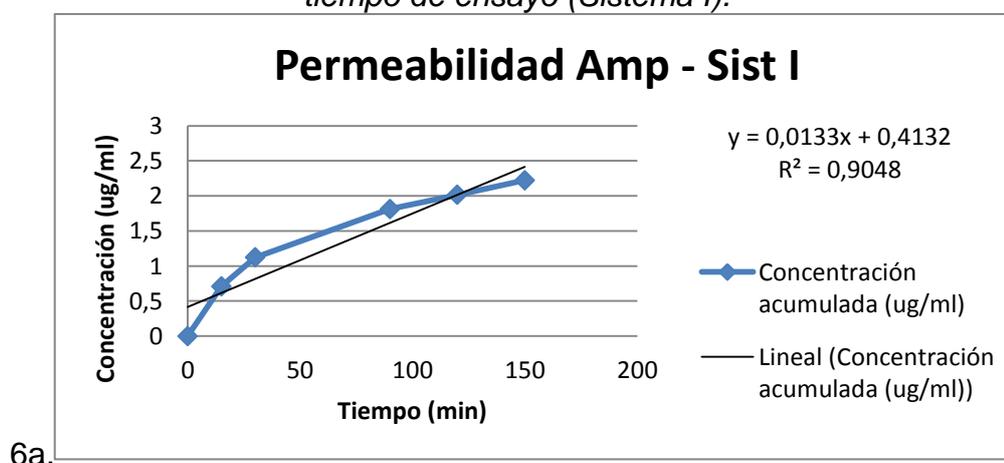
Tabla 13 - Concentración acumulada de Ampicilina respecto al tiempo - Sistema III

Ensayo	Sistema	Fármaco	Tiempo (min)	Concentración acumulada promedio de los insertos ($\mu\text{g/ml}$)
1	3	Amp	0	0
			15	0,000
			30	0,106
			60	0,209
			90	0,275
			120	0,434
			150	0,516
2	3	Amp	0	0
			15	0,000
			30	0,333
			60	0,341
			90	0,466
			120	0,662
			150	0,739
3	3	Amp	0	0
			15	0,000
			30	0,114
			60	1,565
			90	1,763
			120	1,644
			150	1,716

Tabla 14 - Concentración acumulada de Metoprolol respecto al tiempo - Sistema IV

Ensayo	Sistema	Fármaco	Tiempo (min)	Concentración acumulada promedio de los insertos (µg/ml)
1	4	Met	0	0
			15	12,986
			30	29,419
			60	54,507
			90	76,196
			120	92,675
			150	107,833
2	4	Met	0	0
			15	6,633
			30	17,703
			60	32,961
			90	46,558
			120	56,755
			150	63,438
3	4	Met	0	0
			15	12,548
			30	178,099
			60	192,836
			90	206,974
			120	219,492
			150	227,410

Gráfico 6 - Cantidad de Ampicilina (a) y Metoprolol (b) permeados respecto al tiempo de ensayo (Sistema I).



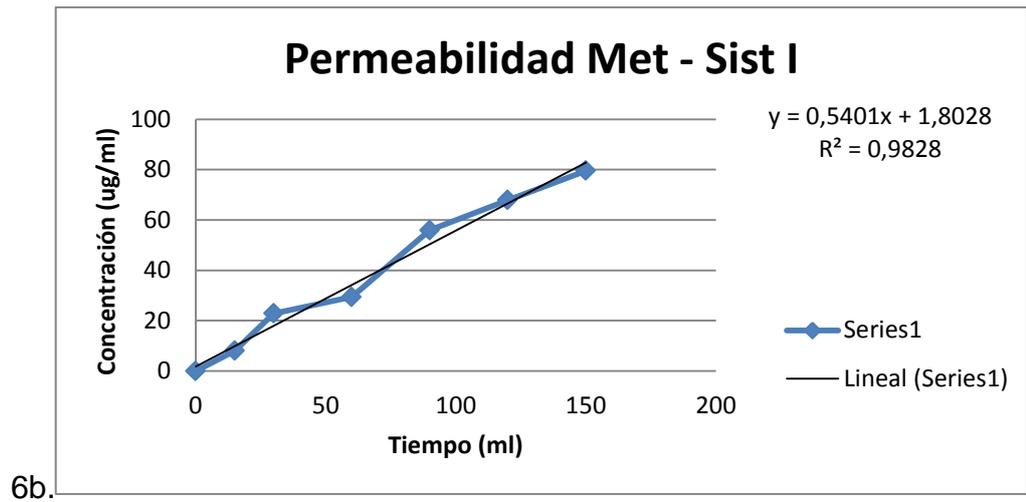


Gráfico 7- Cantidad de Ampicilina (a) y Metoprolol (b) permeados respecto al tiempo de ensayo (Sistema II).

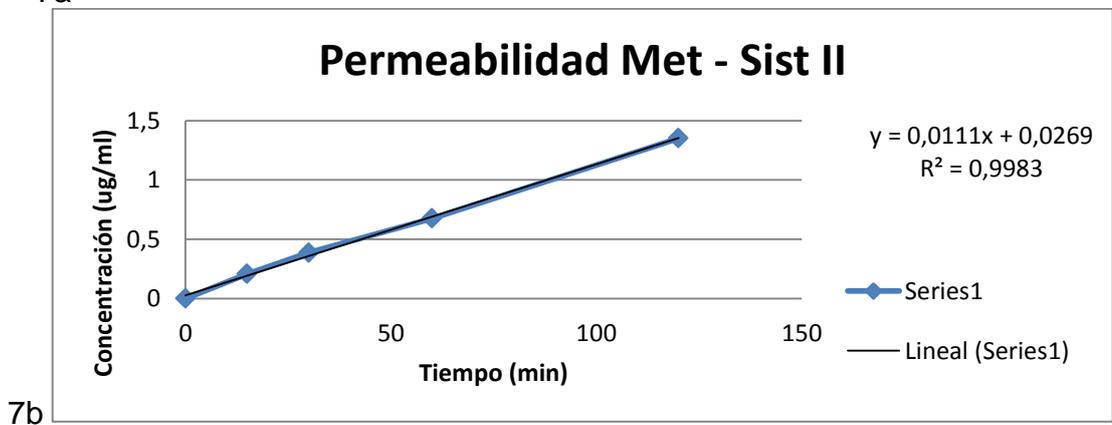
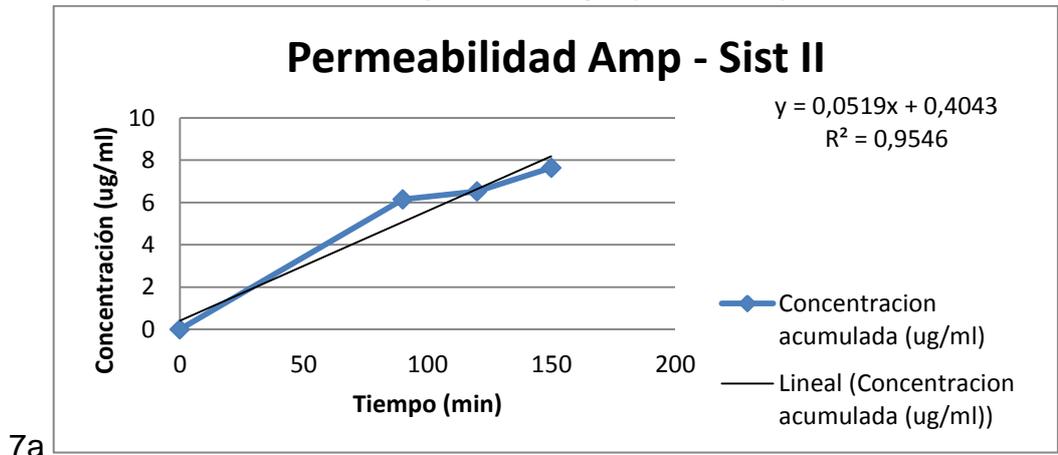


Gráfico 8 - Cantidad de Ampicilina permeado respecto al tiempo de ensayo (Sistema III).

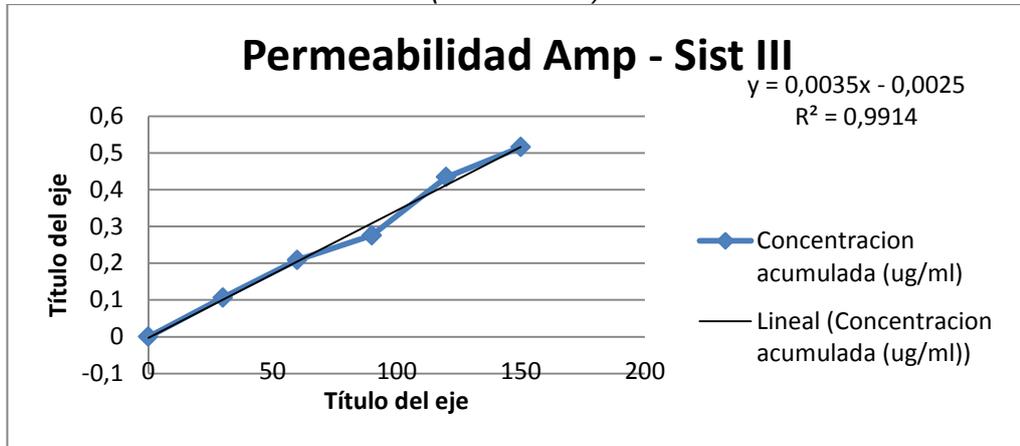
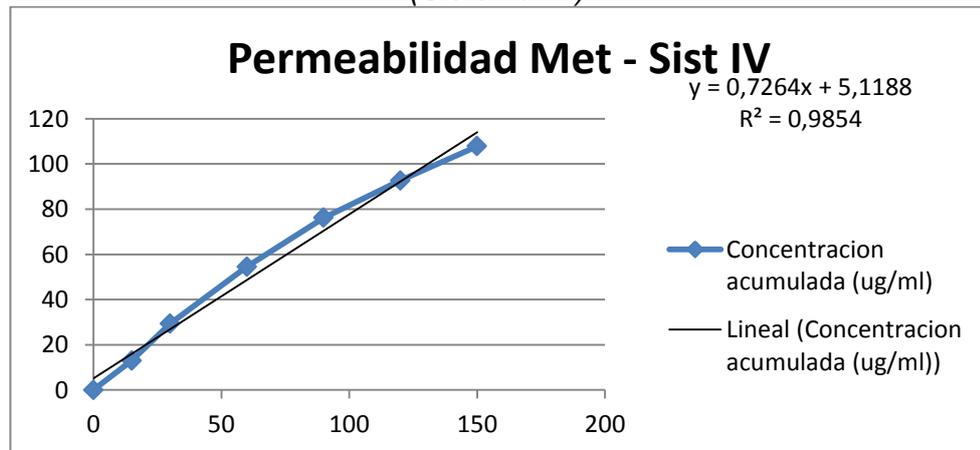


Gráfico 9 - Cantidad de Metoprolol permeado respecto al tiempo de ensayo (Sistema IV).



Con las concentraciones acumuladas, se calcularon los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{ap}) de cada uno de los fármacos. Debido a que algunos sistemas tenían presencia del polímero PAM 18Na, se obtuvieron coeficientes de permeabilidad de los fármacos individuales, y acomplejados con el polímero. Para el cálculo del P_{ap} , se utilizó la Ecuación 4

$$P_{ap} = \left(\frac{dq}{dt}\right) \left(\frac{V}{A * C_i}\right) * \left(\frac{1}{60}\right) \quad (4)$$

Dónde:

$\frac{dq}{dt}$ Corresponde a la pendiente de la gráfica de concentración acumulada del analito respecto al tiempo.

V corresponde al volumen de solución adicionada a la cámara basolateral en ml

A corresponde al área efectiva de crecimiento de la monocapa celular en cm^2

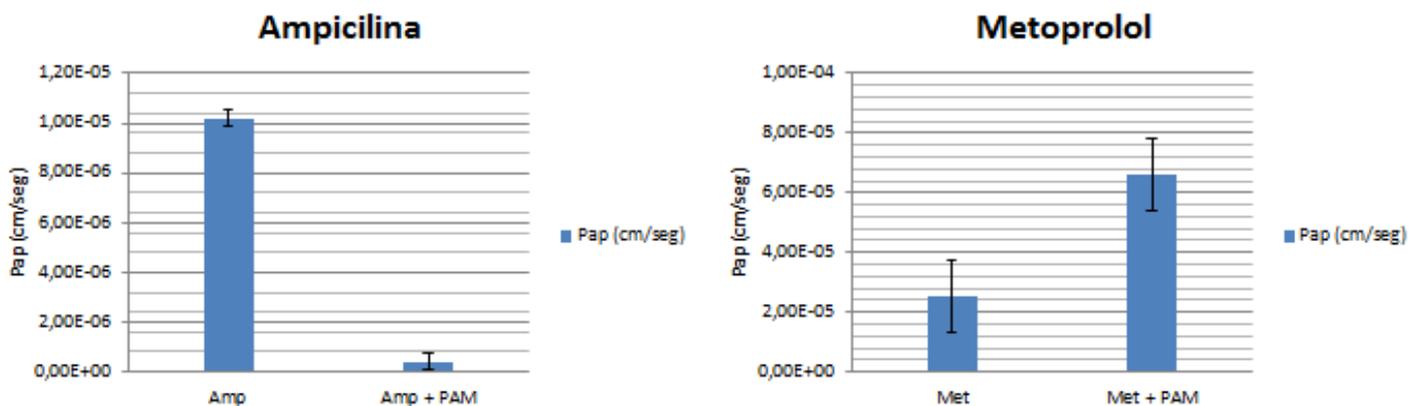
C_i corresponde a la concentración inicial del analito en $\mu\text{g/ml}$

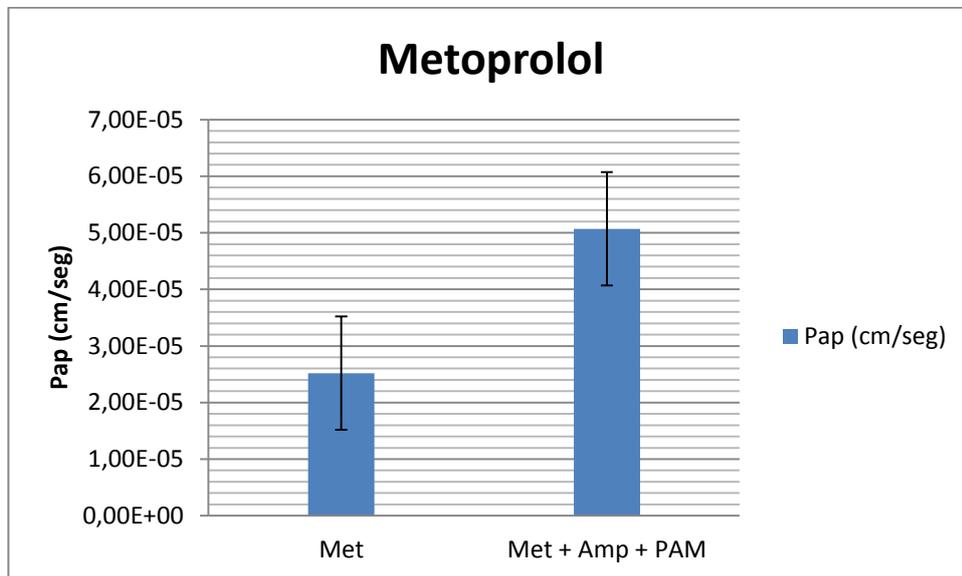
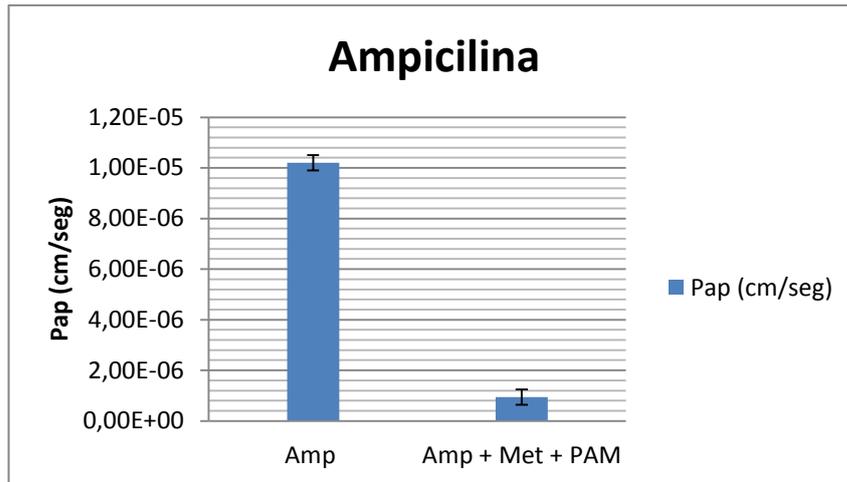
En la Tabla 15, se expresan los P_{ap} calculados a partir de la Ecuación 4 con sus réplicas correspondientes:

Tabla 15 - Coeficientes de permeabilidad aparente calculados para los fármacos

Sistema	Fármaco/Complejo	R1	R2	R3	Permeabilidad Aparente (cm/seg)
Sist 2	Amp	3,12E-06	2,62E-05	1,11E-06	1,02E-05 ± 1,4E-05
Sist 2	Met	9,27E-07	6,55E-06	6,80E-05	2,52E-05 ± 1,4E-05
Sist 1	Amp+Met+PAM	7,99E-07	1,03E-06	9,98E-07	9,42E-07 ± 1,2E-07
Sist 1	Met+Amp+ PAM	4,51E-05	2,45E-05	8,23E-05	5,07E-05 ± 2,9E-05
Sist 3	Amp + PAM	2,10E-07	2,76E-07	7,63E-07	4,17E-07 ± 3,0E-07
Sist 4	Met+PAM	6,06E-05	3,65E-05	1,01E-04	6,62E-05 ± 3,3E-05

En la Grafica 10 se muestran los coeficientes de permeabilidad aparente graficados con sus respectivas desviaciones estándar.





8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1 Establecer la línea celular Caco 2 en el laboratorio y los parámetros del ensayo.

Una vez recibidas las células por parte del proveedor, es necesario garantizar que éstas se encuentran en óptimas condiciones para su utilización. Para garantizar estas condiciones es importante fijarse en sus características morfológicas y fisiológicas. Para comprobar el estado de las monocapas, la revisión en microscopio es importante, dado que es posible detectar posibles averías en la integridad de la membrana (Rothen-Rutishauser et al., 2000). El aspecto de las monocapas bajo el microscopio, con un lente 10X y 40X, fue satisfactorio, y aunque no fue posible visualizarlas en otro tipo de microscopía por la limitante de recursos, el aspecto mostró adecuada confluencia y no se evidenciaron orificios que pusieran en riesgo el ensayo. Estas observaciones aplican para los tres platos de cultivo.

Uno de los factores más importantes en los ensayos de permeabilidad *in vitro* con líneas celulares, es la integridad de la monocapa que se va a utilizar, puesto que de esto dependerá la calidad del ensayo; para medir la integridad de la monocapa existen varias metodologías, este proyecto trabajará algunas de estas metodologías. La resistencia eléctrica transepitelial (TEER), es la metodología de integridad con mayor número de reportes después de la revisión bibliográfica (Castillo et al., 2006; Oltra, 2010), y consiste en estimar la cantidad de Ω (ohmios) por centímetro cuadrado de la monocapa, utilizando pequeños electrodos. Los valores reportados de la TEER en las Tablas 2 a 4, fueron tomados antes de realizar el ensayo, así que nos dieron un acercamiento de que las monocapas se encontraban en buen estado para su uso.

Se encontró que los valores de TEER para los tres platos de cultivo, fueron adecuados para el tiempo y el estado de las monocapas, con valores superiores o cercanos a $450 \Omega \text{ cm}^2$, se ha reportado en otras publicaciones, que estos valores son predictivos, para monocapas con adecuada confluencia (Yamashita et al., 2002). Adicionalmente se evidenció que la variación entre las tres repeticiones, en la mayoría de los pozos, no excedió del 2% el coeficiente de variación (CV), valor adecuado para incluir la medición como ajustada y predictiva de la calidad de la monocapa. Como se puede observar en las Tablas 2, 3 y 4, existe una marcada variación entre los valores de TEER en los tres platos de cultivo, se observaron cambios que van desde 442 hasta 652Ω

cm². Cabe aclarar, que el anterior planteamiento responde a que el número de pase de las células en los tres platos fue diferente, encontrándose en un rango que va del pase 40 al 46. Con esto, se confirma que a medida que se incrementa este parámetro, los valores de TEER tienden a aumentar, lo que sugiere una influencia directa en las características de la monocapa, incluyendo sus valores de TEER (P. Artursson y Karlsson, 1991).

De otro lado, se utilizó el número de pase y el tiempo de cultivo para corroborar el buen estado de las monocapas. Estudios similares con esta línea celular, han evidenciado que a medida que se incrementa el número de pase, la diferenciación eficiente y espontánea de Caco-2 se va perdiendo. Adicionalmente, el tiempo de cultivo superior a 25 días, compromete la función de la monocapa por muerte celular y formación de multicapas. (P. Artursson & Karlsson, 1991)

Se evidencia que las condiciones establecidas para el mantenimiento de las células, fueron adecuadas y permitieron culminar el proceso de crecimiento eficientemente. Lo anterior se pudo comprobar, por el estado del medio DMEM, el cual tiene entre sus componentes un marcador de color rojo (rojo de fenol), el cual cambia dependiendo de la acidez del medio. Durante los días en los que se mantuvieron las células en crecimiento, el medio no presentó cambios de coloración que evidenciaran un desbalance ácido-base, es importante aclarar que la incubadora contaba con suministro de CO₂ el cual tiene una función tampón, que equilibra la acidez del medio de cultivo. En la Ilustración 5 se muestra la coloración del medio, de uno de los platos de cultivo.



Ilustración 5 - Reemplazo de medio de cultivo DMEM durante el mantenimiento en el laboratorio

Las condiciones establecidas para la ejecución del ensayo fueron adecuadas, tomando como base su referenciación en otros documentos (Castillo et al., 2006), y que corresponden a las condiciones fisiológicas del tracto intestinal (lugar donde se lleva a cabo la absorción intestinal de los fármacos); las revoluciones por minuto utilizadas, fueron adecuadas ya que permitieron simular las condiciones del movimiento peristáltico, sin ocasionar derrame o pérdida de fármaco; adicionalmente el equipo utilizado controló la temperatura y la humedad del ambiente permitiendo garantizar condiciones fisiológicas. En la Ilustración 7 se muestra la ejecución del ensayo de permeabilidad de uno de los platos de cultivo.



Ilustración 6 - Ejecución ensayo de permeabilidad bajo condiciones fisiológicas.

8.2 Estandarizar la metodología para evaluar la integridad de la membrana celular en Caco 2.

Ya que se contó con monocapas diferenciadas, en un pase adecuado y con valores de TEER acordes a una monocapa estable, fue necesario comprobar que después de cada ensayo no hubo daño o rompimiento de la misma inherente a las condiciones del ensayo o debido a la manipulación. Para lo anterior, se estandarizó una metodología para determinar la confluencia de la membrana con el reactivo Amarillo de Lucifer. Este compuesto, también llamado Lucifer Yellow (LY), se desplaza a través de las monocapas de Caco-2

por difusión paracelular pasiva (a través de los espacios entre las células) y tiene una baja permeabilidad (Ver Ilustración 8). Por lo tanto, no es capaz de pasar a través de monocapas de células cuando se mantienen uniones estrechas entre ellas. Se ha visto que la permeabilidad (Papp) para LY de 5 a 12 nm/s, es un indicativo de monocapas bien establecidas, se ha reportado además, que es un indicativo para monocapas de Caco-2 bien establecidas (Costar, 2007). Adicionalmente, si la monocapa permanece en buen estado, la cantidad de LY que atraviesa la monocapa no debe ser mayor del 3% de la cantidad total añadida en el compartimiento apical.

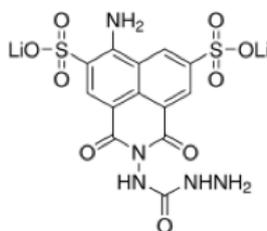


Ilustración 7 - Estructura química del reactivo fluorescente Amarillo de Lucifer

El Amarillo de Lucifer es un reactivo adecuado para evaluar la integridad de la membrana, ya que posee dos características que lo hacen muy eficiente, es poco permeable y dentro de su estructura tiene grupos fluorescentes. Se ha reportado en varios artículos la utilización de la técnica con Amarillo de Lucifer (I. Hidalgo, 1989).

Para la estandarización de la metodología, se utilizó un lector de fluorescencia marca Jasco – FMP 825 proporcionado por la Universidad de Valle. Las muestras fueron conservadas a una temperatura de -20°C y protegidas de la luz, debido a que el compuesto es fotosensible, adicionalmente se analizaron todas las muestras el mismo día, evitando procesos de congelación y descongelación de las mismas. De lo anterior podemos decir que existió un buen manejo y conservación de las muestras, evitando de esta manera degradación del compuesto de interés.

En la Tabla 6, se muestran los resultados de las lecturas para los tres platos de cultivo, cabe recordar que las muestras fueron tomadas una vez se terminó el análisis de permeabilidad de los fármacos. Los resultados se expresan en unidades de fluorescencia. Se corrió también una muestra de estándar, con la cantidad adicionada en el lado apical y un blanco, donde se pretendía identificar algún compuesto del medio de cultivo que pudiera emitir en la

longitud de onda de lectura, generando interferencias y errores. Para comprobar que efectivamente la integridad de la monocapa se conservó durante el ensayo, se analizaron los datos desde dos perspectivas. Porcentaje de permeabilidad y permeabilidad aparente (P_{ap}).

En la Tabla 7, se muestran los porcentajes calculados de Amarillo de Lucifer, después de llevado a cabo el ensayo. Para lo anterior fue necesario utilizar el resultado de blanco y de estándar. Los datos muestran porcentajes negativos, lo que corresponde a que la cantidad que permeó la membrana, respecto a la cantidad adicionada inicialmente es despreciable. En trabajos anteriores se ha visto que porcentajes hasta del 3% son aceptados como adecuados, valores por encima del 3% evidencian ruptura de la membrana y los datos de ese pozo, no deberían ser utilizados en las determinaciones.

Para nuestro ensayo, los resultados de porcentaje de Amarillo de Lucifer muestran monocapas íntegras, aun después de llevado a cabo el ensayo, donde el riesgo de romper alguna es bastante alto. Cuando no existe una adecuada manipulación de las micropipetas, en la succión de la muestra, es posible dañar la monocapa. En este caso se obtendrían resultados por encima del 3%. Con lo anterior podemos decir que en términos de porcentaje, los resultados que arrojen los ensayos pueden ser utilizados y no se descarta alguno de ellos.

Por otro lado, se muestra en la Tabla 9 los resultados de permeabilidad aparente calculados por mediante la Ecuación 3. Se ha reportado que valores cercanos a 1×10^{-7} cm/segeg son aceptados como adecuados para predecir una correcta confluencia. Los resultados obtenidos arrojan valores negativos, que se acercan exponencialmente al rango establecido, sin embargo el hecho de que sean valores menores que cero, establecen que no se detectó fluorescencia en la cámara basolateral, por ende la confluencia de la monocapa es adecuada y los resultados del ensayo de permeabilidad, pueden utilizarse para el análisis.

Desde las dos perspectivas y procedimiento de cálculo, fue posible establecer que los tres platos de cultivo contenían monocapas íntegras antes y después del ensayo, por lo que es posible decir que los resultados obtenidos en la cuantificación de los fármacos, están fundamentados en una metodología sólida y son adecuados para predicciones farmacocinéticas. TEER, como los ensayos con Amarillo de Lucifer soportan este supuesto.

8.3 Evaluar el nivel de absorción del antibiótico Ampicilina sólo o liberado por el polímero PAM-18Na en Caco 2.

Se realizaron curvas de calibración para cada uno de los días de ensayo, para evitar que el fármaco en solución entrara en proceso de degradación; al observar en los Gráficos 1 y 2, los coeficientes de correlación (R^2) son satisfactorios para este tipo de ensayos donde los medios de cultivo en los que se disuelven los fármacos son complejos. En los resultados se muestran las curvas de calibración para el Sistema I, y los coeficientes de correlación reportaron 0,995 y 0,9995, los cuales se acercan a 1 y por ende puede utilizarse la ecuación para determinaciones lineales.

Para los otros sistemas, se evidenció que las curvas de calibración arrojaron coeficientes de correlación por el orden de 0,999, como los reportados anteriormente. Se infiere entonces que las cantidades calculadas en $\mu\text{g/ml}$ son adecuadas y responden de manera lineal con la concentración de fármaco. Para los tiempos donde el equipo no reporta el resultado, la concentración acumulada se deja con el mismo valor que el dato del tiempo anterior. Como se puede observar en las Tablas 11 a 14, es necesario realizar la corrección de la concentración, para no incluir un error de concentración dentro de las mediciones.

En el Anexo 1, se puede evidenciar que las cantidades NO corregidas tienden a tener comportamientos fuera de lo esperado; lo anterior es debido a que no se está teniendo en cuenta la concentración remanente, acumulada de la muestra anterior. Una vez corregida la concentración, podemos estar seguros que la cantidad calculada corresponde a la que realmente se encontraba en el compartimiento.

Cuando se grafican todos los datos de concentración acumulada en cada uno de los compartimientos, para cada uno de los sistemas, vemos se observa que el comportamiento concuerda más con lo reportado en otros artículos (Oltra, 2010), en donde la cantidad de fármaco tiende a aumentar a medida que el tiempo aumenta. Se evidenció este comportamiento pero es importante ratificar que cada fármaco tiene una rata de permeabilidad diferente, que se encuentra condicionada netamente por el carácter químico de los grupos que conforman la molécula. En los ensayos se utilizó Metoprolol como estándar interno, dada su naturaleza química, es un fármaco capaz de atravesar las membranas celulares de manera eficiente, éste es considerado un fármaco de alta permeabilidad con valores de P_{ap} del orden de 1×10^{-5} cm/seg (Oltra, 2010).

Otros estudios reportan la permeabilidad del Metoprolol de la misma manera. Para la comparación de los resultados del presente estudio, se utilizarán las predicciones realizadas por la Doctora Diana M. Oltra en su tesis doctoral.

Una vez graficadas las concentraciones corregidas respecto al tiempo de ensayo, se pudo determinar la pendiente de la gráfica que corresponde a la derivada de la cantidad permeada respecto al tiempo, como ya se ha mencionado esta derivada corresponde a una de las variables de la siguiente ecuación:

$$P_{ap} = \left(\frac{dq}{dt}\right) \left(\frac{V}{A * Ci}\right) * \left(\frac{1}{60}\right)$$

Las otras variables de la ecuación, son constantes determinadas por el investigador o el proveedor de las monocapas. Para nuestro ensayo el volumen del compartimento basolateral fue de 1,5 ml, el área efectiva de crecimiento de la monocapa fue de 1,12 cm² y la concentración adicionada de cada sistema de fármacos fue de 371,39 µg/ml para Ampicilina y 267,36 µg/ml de Metoprolol.

Con estos datos, se calcularon los coeficientes de permeabilidad aparente de los fármacos Ampicilina y Metoprolol en presencia o ausencia del polímero PAM 18 Na (Poli ácido maléico). Los datos reportados en la Tabla 16 muestran que la P_{ap} para el Metoprolol en ausencia del polímero, fue de 2,52x10⁻⁵ ± 3,7x10⁻⁵ cm/seg, este valor corresponde a lo reportado en la tesis doctoral de la Doctora Diana Oltra, en donde ella determina un coeficiente de 4,17x10⁻⁵ cm/seg para este mismo fármaco en monocapas de Caco-2.

Para la Ampicilina no se encontraron valores de permeabilidad por estas metodologías, de otros antibióticos sí se tienen reportes pero este particularmente no ha sido muy bien estudiado en estos ensayos. De la Ampicilina se sabe que tiene baja permeabilidad a nivel intestinal, por lo que es necesario que se requieran dosis suficientes para llegar a una concentración plasmática terapéutica. Según los resultados obtenidos en la Tabla 16 vemos que el P_{ap} para la Ampicilina no difiere mucho del de Metoprolol. Si observamos las tres repeticiones del valor de P_{ap} para la Ampicilina, vemos que dos de ellos están alrededor de 1x10⁻⁶ cm/seg y uno de ellos se muestra atípico respecto a los demás con un valor de 2,62E-05±1,4E-05 cm/seg.

Debido a que estadísticamente es necesario tener las tres repeticiones, para que el ensayo sea representativo, este dato se incluyó en el cálculo del promedio, sin embargo los coeficientes determinados, $3,12 \times 10^{-6}$ cm/seg y $1,11 \times 10^{-6}$ cm/seg coinciden más con el comportamiento de la Ampicilina. A las repeticiones obtenidas se les determinó la desviación estándar. Los resultados obtenidos (reportados en la Tabla 16) coinciden con las desviaciones de la Doctora Diana Oltra.

Respecto a la interacción que se da entre el polímero y el fármaco Ampicilina, se pudo observar que el PAM 18 Na (Poli ácido maléico) no generó un efecto de aumento de permeabilidad de Ampicilina y/o Metoprolol. En Ampicilina el coeficiente de permeabilidad paso de $1,02 \times 10^{-5} \pm 1,4 \times 10^{-5}$ cm/seg a ser $9,42 \times 10^{-7} \pm 1,2 \times 10^{-7}$ cm/seg, lo anterior refleja una disminución de la permeabilidad en presencia del polímero. Este comportamiento puede presentarse por el complejo formado por ampicilina y PAM 18 Na, es posible que el polímero este generando un complejo fármaco-polímero que no es permeable a la membrana. Según lo reportado respecto al PAM 18 Na, es posible que sus grupos químicos estén ionizados y desionizados en algún momento de la interacción, haciendo que no atraviese la membrana celular (Salamanca et al., 2007).

Para el Metoprolol se observó un comportamiento similar, en donde el polímero no generó ningún efecto sobre la permeabilidad del fármaco. En presencia de PAM 18 Na el coeficiente de permeabilidad paso a ser $5,07 \times 10^{-5} \pm 2,9 \times 10^{-5}$ cm/seg. Con estos valores, no se evidenció un cambio considerable en los P_{ap} por lo que podríamos decir que no fue posible evidenciar un efecto de aumento de permeabilidad en el complejo fármaco-polímero, respecto al fármaco. Cabe aclarar que estos resultados están sujetos a la naturaleza química de las moléculas, sin embargo no es posible decir con certeza que el polímero PAM 18 Na, no tiene un efecto de aumento de permeabilidad.

Finalmente después de analizar el conjunto de datos, fue posible evidenciar una discrepancia en los datos del Ensayo 3. Hasta el momento no fue posible determinar el causal de esta situación, debido a que los porcentajes de permeabilidad de Amarillo de Lucifer fueron satisfactorios para este ensayo. Sin embargo fue posible notar que los datos del ensayo 3, son atípicos al estudiarlos con las otras dos repeticiones. Debido a que estadísticamente es necesario realizar mediciones de mínimo 3 datos, éste se incluyó dentro de los cálculos.

9. CONCLUSIONES

- Se logró estandarizar la metodología de integridad de la membrana celular de la línea Caco-2 y además se comprobó la correlación que existe entre las determinaciones directas e indirectas de la integridad de membrana; tanto las mediciones de TEER como los porcentajes de permeabilidad de Amarillo de Lucifer, muestran resultados satisfactorios para monocapas en buen estado para los ensayos de permeabilidad. Adicionalmente, se confirma la necesidad de utilizar las dos metodologías para asegurar la integridad de las membranas antes y después del estudio
- Se logró establecer de manera eficiente la línea celular Caco-2 en el laboratorio de farmacocinética y Biofarmacia de la Universidad Icesi. Los resultados obtenidos evidencian el logro de la confluencia de la membrana y el correcto funcionamiento de esta durante los ensayos de permeabilidad.
- De acuerdo con el análisis, no se evidencia un aumento en la permeabilidad de la Ampicilina sódica en presencia del polímero PAM 18 Na (Poli ácido maléico), este comportamiento también se observa para el Metoprolol. Los valores de P_{ap} no muestran que una mayor cantidad de fármaco pase por la membrana cuando se forma el complejo fármaco-polímero.
- Es prudente afirmar que no es posible realizar una correlación *in vivo* – *in vitro* en su totalidad, no obstante los resultados muestran que si existe una correlación de las predicciones que se hacen sobre monocapas de Caco-2; los resultados nos ofrecen grandes similitudes con otras publicaciones científicas reconocidas.
- Se concluye, por medio de la correlación de la metodología, que esta estandarización funciona para la determinación de coeficientes de permeabilidad (P_{ap}) de fármacos; resaltando que el resultado está sujeto a las condiciones químicas de los grupos funcionales de las moléculas estudiadas.

10.RECOMENDACIONES

- Para minimizar el riesgo de contaminación debida a la manipulación durante los ensayos, se recomienda contar con todos los elementos de trabajo a la mano, adicionalmente contar con todo los reactivos alicuotados con anterioridad, dentro de la cabina de flujo laminar. Se observó durante la realización de los ensayos, que a medida que se realizan las actividades en tiempos más cortos y de manera más eficiente, el riesgo de contaminación disminuye al mínimo.
- Se recomienda realizar ensayos previos a los de permeabilidad, en donde el investigador genere la destreza de manipular la micropipeta. Se evidenció el alto riesgo de dañar la monocapa celular con la punta de la micropipeta.
- Para próximos ensayos, se recomienda contar con estándares preparados el mismo día del ensayo, debido a que las moléculas analizadas son susceptibles de degradación mientras están en solución. Si existen muestras que han estado descongeladas por un periodo mayor o igual a 4 horas, se aconseja descartar la muestra para el análisis.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Artursson, P., & Karlsson, J. (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells.
- Artursson, P., Palma, K., & Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport (Vol. 46, pp. 27-43): *Adv Drug Deliv Rev*.
- Baena, Y., & Ponce D' León, L. (2008). Importancia y fundamentación del sistema de clasificación biofarmacéutico, con base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia *in vivo* (Vol. 37 (1), pp. 18-32). Bogotá, Colombia: Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.
- Biganzoli, E., Rossi, R., Brunati, & Nolli, M. L. (1999). Use of a Caco-2 cell culture model for the characterization of intestinal absorption of antibiotics (Vol. 54, Issue 9, pp. 594-599). Gerenzano (VA), Italy: ELSEVIER.
- Castillo, R., Chiriboga, C., & Fontanilla, M. R. (2006). Estandarización de un modelo basado en monocapas de células Caco-2 con aplicación en estudios de absorción de fármacos. (Vol. 35(2), pp. 177-191). Bogotá D.C, Colombia: Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.
- Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M. G., & Zweibaum, A. (1988). Epithelial Polarity, Villin Expression, and Enterocytic Differentiation of Cultured Human Colon Carcinoma Cells: A Survey of Twenty Cell Lines (Vol. 48, pp. 1936-1942). Houston, Texas: Cancer Research.
- Costar, C. (2007). Corning® HTS Transwell®-96 Permeable Support Protocols for Drug Transport - Application Note (pp. pp 1-4). NY: Corning Incorporated.
- FDA, U. S. D. O. H. a. H. S. F. a. D. A. (2000). Guidance for Industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutical classification system. (pp. 1-16). Rockville MD, USA: CDER-FDA.
- Foster, K. A., Avery, M. L., Yazdanian, M., & Audus, K. L. (2000). Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery (Vol. 208, pp. 1-11): ELSEVIER.
- Hidalgo, I. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability (Vol. 96(3), pp. 736-749.): *Gastroenterology*.

- Hidalgo, I. J., Raub, T. J., & Borchardt, R. T. (2011). Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability (Vol. 13, pp. 323-327): The AAPS Journal.
- Mrad de Osorio, A. (2006). Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos. (Vol. 1, pp. 163-183). Colombia: Revista Colombiana de Bioética.
- Oltra, D. M. (2010). *Estudio de la variabilidad de la permeabilidad intestinal de fármacos. Estudios in vitro e in situ.* (PhD), Universidad de Valencia, Valencia, España.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Flower, R. J. (2008). *Farmacología* (6 ed.). Barcelona, España: Elseiver.
- Rosenbaum, S. (2011). *Basic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.* New Jersey: John Wiley & Sons.
- Rothen-Rutishauser, B., Braun, A., Günthert, M., & Wunderli-Allenspach, H. (2000). Formation of Multilayers in the Caco-2 Cell Culture Model: A Confocal Laser Scanning Microscopy Study (Vol. 17, pp. pp 460-465): Pharmaceutical Research
- SALAMANCA, C. H., BARRAZA, R. G., ACEVEDO, B., & OLEA, A. F. (2007). HYDROPHOBICALLY MODIFIED POLYELECTROLYTES AS POTENTIAL DRUGS RESERVOIRS OF N-ALKYL-NITROIMIDAZOLES (Vol. 52, pp. 1-12). Santiago de Chile: J. Chil. Chem. Soc.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M., Stammati, A., & Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics (Vol. 21, pp. 1-26). Roma, Italy: *Cell Biology and Toxicology*.
- Stoll, B. R., Batycky, R. P., Leipold, H. R., Milstein, S., & Edwards, D. A. (2000). A theory of molecular absorption from the small intestine (Vol. 55, pp. 473-489). Edmonton, Alberta, Canada: PERGAMON.
- Sytkowski, A. J., Richie, J. P., & Bicknell, K. A. (1983). New Human Renal Carcinoma Cell Line Established from a Patient with Erythrocytosis (Vol. 43, pp. 1415-1419). Boston, Massachusetts CANCER RESEARCH.
- Yamashita, S., Konishi, K., Yamazaki, Y., Taki, Y., Sakane, T., Sezaki, H., & Furuyama, Y. (2002). **New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system** (Vol. 91, Issue 3, pp. 669-679): Journal of Pharmaceutical Sciences.

12. ANEXOS

12.1 Anexo 1 – Cantidades promedio en µg/ml de Ampicilina y Metoprolol, de cada inserto, sin corrección

Ensayo	Sistema	Fármaco	Tiempo (min)	Concentración ug/ml	Corrección de la concentración	Concentración acumulada promedio de los insertos (µg/ml)
1	1	Amp	0	0	0	0
			15	0,709	0,709	0,709
			30	0,768	0,414	1,123
			60	1,263	0,879	2,002
			90	0,443	-0,189	1,813
			120	0,424	0,203	2,016
			150	0,419	0,207	2,223
1	1	Met	0	0	0	0
			15	8,042	8,042	8,042
			30	18,861	14,840	22,882
			60	15,931	6,501	29,383
			90	34,525	26,560	55,942
			120	29,237	11,975	67,917
			150	26,299	11,681	79,597
2	1	Amp	0	0	0	0
			15	0,699	0,699	0,699
			30	0,716	0,367	1,066
			60	0,719	0,361	1,427
			90	0,79	0,431	1,857
			120	0,795	0,400	2,257
			150	0,26	-0,138	2,120
2	1	Met	0	0	0	0
			15	2,856	2,856	2,856
			30	11,986	10,558	13,414
			90	18,616	12,623	26,037
			120	19,375	10,067	36,104
			150	39,758	30,071	66,175
3	1	Amp	0	0	0	0
			15	0,640	0,640	0,640
			30	0,456	0,135	0,776
			60	0,991	0,763	1,539

			90	0,459	-0,037	1,502
			120	0,449	0,220	1,722
			150	1,252	1,028	2,750
3	1	Met	0	0	0	0
			15	17,979	17,979	17,979
			30	48,911	39,922	57,901
			60	60,426	35,970	93,871
			90	48,651	18,438	112,309
			120	41,347	17,022	129,330
			150	40,755	20,081	149,412

Ensayo	Sistema	Fármaco	Tiempo (min)	Concentración ug/ml	Corrección de la concentración	Concentración acumulada promedio de los insertos (µg/ml)
1	2	Amp	0	0	0	0
			90	6,14	6,140	6,140
			120	3,453	0,383	6,523
			150	1,305	1,114	7,637
1	2	Met	0	0	0	0
			15	0,208	0,208	0,208
			30	0,282	0,178	0,386
			60	0,431	0,290	0,676
			120	0,891	0,676	1,352
			150	0,481	0,036	1,387
2	2	Amp	0	0	0	0
			15	0,449	0,449	0,449
			30	0,441	0,217	0,666
			60	0,472	0,252	0,917
			90	2,749	2,513	3,430
			120	36,932	35,558	38,988
			150	52,508	34,042	73,030
2	2	Met	0	0	0	0
			15	3,288	3,288	3,288
			30	1,798	0,154	3,442
			60	2,208	1,310	4,751
			90	13,680	12,576	17,327
			120	0,913	-5,927	11,400
			150	1,082	0,625	12,025
3	2	Amp	0	0	0	0
			15	0,518	0,518	0,518

			30	1,027	0,768	1,286
			120	1,627	1,114	2,400
			150	44,905	44,092	46,491
3	2	Met	0	0	0	0
			15	3,044	3,044	3,044
			30	129,560	128,038	131,082
			60	114,587	49,807	180,889
			90	15,189	-42,105	138,785
			120	1,148	-6,447	132,338
			150	0,769	0,195	132,533

Ensayo	Sistema	Fármaco	Tiempo (min)	Concentración ug/ml	Corrección de la concentración	Concentración acumulada promedio de los insertos (µg/ml)
1	3	Amp	0	0	0	0
			15	0	0,000	0,000
			30	0,106	0,106	0,106
			60	0,156	0,103	0,209
			90	0,144	0,066	0,275
			120	0,231	0,159	0,434
			150	0,197	0,082	0,516
2	3	Amp	0	0	0	0
			15	0	0,000	0,000
			30	0,333	0,333	0,333
			60	0,175	0,008	0,341
			90	0,213	0,125	0,466
			120	0,302	0,195	0,662
			150	0,228	0,077	0,739
3	3	Amp	0	0	0	0
			15	0	0,000	0,000
			30	0,114	0,114	0,114
			60	1,508	1,451	1,565
			90	0,952	0,198	1,763
			120	0,357	-0,119	1,644
			150	0,251	0,072	1,716

Ensayo	Sistema	Fármaco	Tiempo (min)	Concentración ug/ml	Corrección de la concentración	Concentración acumulada promedio de los insertos (µg/ml)
1	4	Met	0	0	0	0
			15	12,986	12,986	12,986
			30	22,926	16,433	29,419
			60	36,550	25,087	54,507
			90	39,964	21,689	76,196
			120	36,461	16,479	92,675
			150	33,389	15,159	107,833
2	4	Met	0	0	0	0
			15	6,633	6,633	6,633
			30	14,386	11,069	17,703
			60	22,451	15,258	32,961
			90	24,823	13,597	46,558
			120	22,608	10,197	56,755
			150	17,987	6,683	63,438
3	4	Met	0	0	0	0
			15	12,548	12,548	12,548
			30	171,825	165,551	178,099
			60	100,649	14,737	192,836
			90	64,463	14,138	206,974
			120	44,750	12,518	219,492
			150	30,293	7,918	227,410