

INSTITUTO DE ESPAÑA

**ANALES**  
de la  
**REAL ACADEMIA**  
**NACIONAL**  
**DE**  
**FARMACIA**



2002

VOLUMEN LXIX

Núm. 2

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

28004 MADRID



Anal. Real Acad. Farm. 2002, 68:

## **Fundamentos de las interacciones farmacocinéticas ( I )**

————— *Revisión* —————

EMILIA BARCIA HERNÁNDEZ Y SOFÍA NEGRO ALVAREZ.

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad De  
Farmacia. Universidad Complutense De Madrid.*

### **RESUMEN**

En la actualidad, es frecuente recurrir a la administración conjunta de más de un fármaco para el tratamiento de un estado patológico o de varios coexistentes. Ante esta situación, una de las cuestiones fundamentales que surgen es determinar si la combinación específica de fármacos administrada a un paciente da lugar a una interacción, entendiéndose por tal cualquier alteración de la respuesta previsible a la acción de un fármaco como consecuencia de la presencia de otro fármaco, alimentos u otros agentes químicos.

Aunque en algunas ocasiones la interacción medicamentosa puede ser beneficiosa desde el punto de vista terapéutico, como ocurre con la administración conjunta de agentes antihipertensivos y diuréticos que mejora la respuesta antihipertensiva, sin embargo, en la mayoría de los casos, presenta consecuencias adversas para el paciente. En general, los efectos adversos pueden ser controlados modificando la dosis, la pauta posológica o bien, recurriendo a la utilización de alguna sustancia que pueda paliar la interacción, aunque resulta mucho más seguro, siempre que sea posible, evitar la asociación de los agentes interactuantes.

En este trabajo se aborda el estudio de los fundamentos de las interacciones farmacocinéticas que afectan a los procesos de absorción y distribución de los fármacos en el organismo. Las primeras, se manifiestan fundamentalmente tras la administración de los fármacos por vía digestiva y pueden ocurrir por uno o más de los mecanismos que se indican a continuación: modificación del pH en el lugar de absorción, adsorción, ad-

sorción-intercambio iónico, formación de quelatos o complejos, procesos de competición por un portador, modificación del tránsito gastrointestinal, etc.

En las interacciones que afectan a la distribución de los fármacos por el organismo suelen estar implicados procesos de desplazamiento del compuesto unido a las proteínas plasmáticas. La consecuencia más importante de una interacción por desplazamiento sería el aumento de la respuesta farmacológica y, probablemente, también de la toxicidad del agente que es desplazado. Sin embargo, hay que tener en cuenta que dichos aumentos tienen carácter transitorio, debido a la acción compensatoria que supone la mayor eliminación del fármaco, por lo que las repercusiones clínicas de este tipo de interacciones son, en general, de escaso relieve y si se conocen los mecanismos, se pueden prever sus consecuencias.

**Palabras clave:** Interacciones farmacocinéticas. Absorción. Distribución.

## SUMMARY

### The basis of drug pharmacokinetic interactions ( I )

Nowadays, it is a very common practice to use simultaneously more than one drug for the treatment of one or more coexisting pathological states. Under these circumstances, it is of special interest to determine if the specific drug combination used produces an interaction, that is, if the effects of one drug are changed by the presence of another drug, food, drink or by some environmental chemical agent.

Sometimes a drug interaction can be beneficial and valuable, such as the deliberate co-prescription of antihypertensive drugs and diuretics in order to achieve antihypertensive effects possibly not obtainable with either drug alone. However, in the majority of cases, the consequences of a drug interaction are adverse and undesirable. A solution to this problem would be to adjust the doses or the dosage regimen although, if possible, the easiest solution would be to choose a non-interacting alternative.

The purpose of this work is to study the basis of the pharmacokinetic interactions which affect the processes by which drugs are absorbed and distributed in the body. The first ones arise mainly when the drugs are given orally and, very many drugs which interact do so, not by a single mechanism, but often by two or more of the following ones: modification of the gastrointestinal pH, adsorption, quelation and other complexing mechanisms, active transport competition, changes in gastrointestinal transit, etc.

When referring to those interactions which affect the process by which drugs are distributed within the body, the mechanism mainly involved is the displacement of the primary drug from its plasma binding site, leading to altered kinetics and in some instances changed drug effects in the patient and, possibly, toxicity. However, these

altered responses are transient probably due to the corresponding increase in the elimination of the drug. The clinical consequences of drug displacement interactions have generally been overstated and can be easily prevented.

**Key words:** Pharmacokinetic interactions. Absorption. Distribution.

En la actualidad es frecuente recurrir a la administración conjunta de más de un fármaco para el tratamiento de un estado patológico o de varios coexistentes. Los objetivos de la politerapia se orientan tanto a aumentar la eficacia terapéutica como a disminuir la toxicidad de los agentes medicamentosos (1). Así, es frecuente llevar a cabo la administración de más de un agente terapéutico en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, hipertensión, terapia antineoplásica, cuidados paliativos, etc.

Ante esta situación, una de las cuestiones fundamentales que surgen es determinar si la combinación específica de fármacos administrada a un paciente determinado da lugar a una interacción.

Una interacción medicamentosa se puede definir como cualquier alteración de la respuesta previsible a la acción de un fármaco como consecuencia de la presencia de otro fármaco, alimentos u otros agentes químicos.

Las interacciones medicamentosas pueden ser beneficiosas o perjudiciales. En el primer caso, la interacción resulta útil desde el punto de vista terapéutico, como ocurre con las intoxicaciones por analgésicos opiáceos, levodopa y anticolinesterásicos que pueden ser antagonizadas por la administración conjunta de naloxona, piridoxina y atropina, respectivamente. Asimismo, la administración de antihipertensivos y diuréticos mejora de forma acusada la terapia antihipertensiva (2).

Sin embargo, en la mayoría de los casos, el resultado de la interacción presenta consecuencias adversas para el paciente. Así por ejemplo, en pacientes tratados y controlados con warfarina, se pueden producir procesos hemorrágicos si se les administra fenilbutazona (3) o azapropazona (4,5), sin llevar a cabo una reducción adecuada de la dosis del anti-coagulante. La pérdida de eficacia terapéutica producida por una posible interacción puede convertir en vulnerables a pacientes cuyo bienestar depende del uso profiláctico de un fármaco determinado. Un caso de este

tipo se manifiesta cuando se produce una pérdida del efecto anticonceptivo hormonal como consecuencia de la administración conjunta de fármacos que estimulan su metabolismo como la griseofulvina (6), barbitúricos (7), carbamazepina (8,9), fenitoina (9), felbamato (10), rifampicina (11), ritonavir (12), etc.

En general, los efectos adversos de una interacción medicamento-sa pueden ser controlados modificando la dosis, la pauta posológica o bien recurriendo a la utilización de alguna sustancia que pueda paliar la interacción aunque resulta mucho más seguro, siempre que sea posible, evitar la asociación de los agentes que interaccionan. Así, la administración de diuréticos del tipo de la furosemida (13) o la clorotiazida (14) en pacientes digitalizados puede provocar toxicidad del agente cardiotónico, posiblemente debido a la pérdida de potasio que producen este tipo de diuréticos. Para evitar dicha interacción se recomienda administrar dichos diuréticos con suplemento de potasio o bien sustituirlos por diuréticos ahorradores de potasio tales como triamtereno o espironolactona.

Una disminución en la eficacia, consecuencia de una interacción, puede a veces ser tan peligrosa como una aumento de la acción terapéutica. Así ocurre cuando a un paciente que está siendo tratado con warfarina se le administra rifampicina, agente que estimula el metabolismo del primero, con lo que es necesario reajustar, en este caso incrementar, la dosis del compuesto anticoagulante para mantener su efecto terapéutico (15).

La frecuencia de las interacciones beneficiosas o adversas de cierta importancia se desconoce, si bien, la probabilidad de que se manifiesten es tanto mayor cuanto mayor sea el número de fármacos que se administren conjuntamente. Hay estimaciones que aportan valores de entre un 3 y un 5%, en pacientes tratados con un número reducido de fármacos, y hasta un 20%, en aquellos pacientes que reciben más de 10 fármacos. Como la mayoría de los pacientes hospitalizados suelen estar tratados con varios agentes terapéuticos, la importancia del problema es claramente significativa (1,16).

Finalmente, debemos indicar que en la mayoría casos, aunque se produzca una interacción, los agentes interactuantes, si son necesarios, pueden seguir administrándose conjuntamente con el fin de controlar la patología, siempre que se realice una evaluación exhaustiva de las res-

puestas obtenidas, y se proceda a reajustar adecuadamente las dosis de los agentes terapéuticos.

Atendiendo a su naturaleza, las interacciones se pueden clasificar en:

1) Interacciones farmacotécnicas: se refieren a incompatibilidades de tipo físico-químico que afectan a la liberación del principio activo. Su conocimiento atañe al responsable de la preparación, ya que se engloban dentro de los aspectos puramente tecnológicos, y es por lo que no serán tratadas aquí.

2) Interacciones farmacodinámicas: son aquellas en las que los efectos de un fármaco son modificados por la presencia de otro agente que interacciona en el lugar de acción. En ocasiones, los fármacos compiten por receptores específicos aunque, generalmente, se trata de un proceso indirecto que supone la interferencia con distintos mecanismos fisiológicos.

La modificación producida como consecuencia de este tipo de interacción puede suponer la exaltación, adición o disminución de la intensidad de la respuesta.

Cuando se produce un aumento del efecto, consecuencia de la interacción, éste puede ser debido a la suma de los efectos individuales de los fármacos implicados y se le denomina sinergismo aditivo. Se habla de sinergismo de potenciación cuando el efecto resultante es superior a la suma de los efectos individuales. Por último, si lo que se manifiesta es una reducción del efecto, consecuencia de la interacción, se le denomina antagonismo.

El sinergismo y el antagonismo se pueden manifestar tanto en los efectos terapéuticos como en los efectos colaterales o secundarios.

La actividad antimicrobiana de la combinación de trimetoprima y sulfametoxazol es superior a la suma de las acciones que tienen ambos por separado. Se produce por tanto, una interacción por sinergismo de

potenciación, que resulta útil desde el punto de vista terapéutico. Dicho efecto sinérgico es consecuencia de sus acciones sobre dos pasos de la vía enzimática para la síntesis de ácido tetrahidrofólico. La sulfonamida inhibe la incorporación de PABA en el ácido fólico y la trimetopima previene la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato (2).

La administración conjunta de gentamicina (17) o tobramicina (18) y cefalotina da lugar a una interacción por sinergismo aditivo de efectos adversos, que se manifiesta con un aumento de la nefrotoxicidad causada por el aminoglucósido.

Los anticoagulantes orales compiten con la vitamina K para reducir la síntesis hepática de factores de la coagulación. Si se administran cantidades apreciables de vitamina K se aumenta la síntesis de los factores de la coagulación, con lo que se disminuye el efecto del agente anti-coagulante. En este caso, se trata de una interacción por antagonismo (19).

3) Interacciones farmacocinéticas: se deben a modificaciones producidas por el agente desencadenante sobre los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco cuyo efecto se ve modificado.

Dependiendo del proceso afectado las podemos clasificar en cuatro grupos:

- Interacciones farmacocinéticas que afectan al proceso de absorción.
- Interacciones farmacocinéticas que afectan al proceso de distribución.
- Interacciones farmacocinéticas que afectan al metabolismo.
- Interacciones farmacocinéticas que afectan a la excreción.

En esta primera parte se aborda el estudio de las interacciones farmacocinéticas que afectan a los procesos de absorción y distribución de los fármacos.

## INTERACCIONES FARMACOCINÉTICAS QUE AFECTAN AL PROCESO DE ABSORCIÓN

Para que un fármaco ejerza su efecto terapéutico es necesario que alcance la circulación general. Este proceso está condicionado por la vía de administración, de manera que, salvo en aquellos casos en que se deposita en el torrente circulatorio o en el lugar de acción (administración intravenosa, intra-arterial, intra-raquídea), en el resto de las situaciones es necesario que el fármaco atraviese una o más membranas biológicas para alcanzar la circulación sistémica. A este paso a través de membranas se le denomina absorción.

En general, durante el proceso de absorción, el paso de los fármacos a través de las barreras biológicas tiene lugar por los siguientes mecanismos (20-24):

**1. Difusión pasiva.** Puede tratarse de una difusión a través de membranas lipídicas o bien a través de poros acuosos. En el primer caso, tiene lugar a favor de gradiente de concentración y depende, fundamentalmente, de la diferencia de concentración de fármaco a ambos lados de la membrana, de las características de la misma, del pH del medio biológico en cuyo seno se encuentra el principio activo y de características fisicoquímicas del agente terapéutico, como son su pKa y liposolubilidad.

Las moléculas polares e ionizadas no se absorben o lo hacen muy lentamente, mientras que moléculas lipófilas atraviesan las membranas muy rápidamente, como consecuencia de su disolución en las regiones apolares de la bicapa lipídica. Además, la forma no ionizada de algunos compuestos es capaz de difundir a través de la bicapa lipídica de la membrana, mientras que la forma ionizada no lo es, a no ser que su lipofilia sea elevada. Como la mayoría de los fármacos son ácidos o bases débiles parcialmente ionizados, es por lo que se absorben fundamentalmente por difusión pasiva a través de membranas lipídicas.

La difusión pasiva por poros se logra gracias a la existencia de unos canales o poros acuosos que atraviesan la membrana y comunican las partes acuosas que hay a ambos lados de la misma. En este tipo de transporte se produce una transferencia de agua a través de la membrana capaz de arrastrar a los solutos disueltos en ella, siempre que sean capaces de atravesar los poros. El paso tiene lugar a favor de gradiente y está condicionado por el tamaño de los poros, el cual varía en función del lugar de absorción que se considere.

El tamaño molecular de la mayoría de los fármacos sugiere que la difusión por poros es poco importante en la absorción por vía oral, al contrario de lo que ocurre cuando se administran por vía intramuscular o subcutánea.

**2. Transporte mediado.** En el transporte mediado, el fármaco se une a un componente de la membrana (portador) que permite su paso a través de la misma. El portador es una proteína que forma parte de la membrana, de manera que, en primer lugar, se une el fármaco a la proteína, a continuación se produce un cambio conformacional en dicho portador y por último, se realiza el paso del fármaco al otro lado de la membrana al liberarse de su unión al portador.

Este tipo de transporte es selectivo, ya que el portador tiene afinidad por determinados compuestos y, además, es saturable, cuando la concentración de fármaco es muy elevada.

El transporte mediado puede ser activo o facilitado. En el transporte activo, el paso se realiza en contra de gradiente y por tanto, requiere de un consumo de energía que proviene de procesos metabólicos. Por el contrario, la difusión facilitada se realiza a favor de gradiente sin consumo energético.

**3. Transporte por pares de iones.** Existen fármacos que son electrólitos fuertes o moléculas altamente ionizadas, que mantienen su carga a cualquier pH fisiológico. Estos principios activos, cuando se unen a compuestos de carga contraria, forman un par iónico cuya carga global es nu-

la, de manera que el complejo neutro resultante difunde a través de la membrana, mediante transporte por par iónico.

**4. Transporte por endocitosis.** En el proceso de endocitosis, la membrana forma una vesícula hacia el interior, englobando al fármaco y transportándolo a través de ella. Dentro de la endocitosis, si el material transportado es sólido se llama fagocitosis y, cuando se captan moléculas solubles, pinocitosis.

De todos estos mecanismos señalados, la mayor parte de los fármacos se absorben por difusión pasiva a través de membranas lipídicas, el transporte por difusión a través de poros lo utilizan sustancias polares de tamaño pequeño, normalmente inferior a 250 dáltones.

El transporte activo lo utilizan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, la levodopa, el baclofeno y algunos antitumorales. Las vitaminas, como la riboflavina y la tiamina, se absorben por difusión facilitada y, los compuestos con cargas positivas, como el propranolol y la quinina, por pares de iones. El mecanismo de endocitosis lo utilizan moléculas de gran tamaño como las vitaminas liposolubles.

Cuando el medicamento se administra por vía intramuscular o subcutánea, la absorción se realiza por difusión pasiva, prevaleciendo la difusión por poros. En la mucosa gástrica se produce difusión pasiva, aunque también los fármacos pueden absorberse por transporte activo. En el intestino delgado, lugar idóneo de absorción, ésta se puede realizar por cualquiera de los mecanismos indicados. Por lo que se refiere a la absorción a través de las mucosas del intestino grueso y del recto, el proceso fundamental que interviene es la difusión pasiva y, en menor proporción, la pinocitosis. A través de piel y otras mucosas, como la bucal, sublingual, nasal, ocular y pulmonar, la absorción se realiza mayoritariamente por difusión pasiva.

De todas las vías de administración de medicamentos, las vías digestiva, intramuscular e intravenosa son las más utilizadas. En la vía intravenosa no existe proceso de absorción por tanto, no se producirán interacciones a este nivel. La vía intramuscular ofrece pocas posibilidades de interacción, ya que normalmente la modificación del proceso de absor-

ción corresponde más bien a recursos farmacotécnicos orientados a modificar la absorción que a interacciones propiamente dichas.

Finalmente, hay que indicar que las interacciones que afectan al proceso de absorción se manifiestan fundamentalmente, tras la administración de los medicamentos por vía digestiva, siendo éstas las que van a ser tratadas a continuación.

Las interacciones farmacocinéticas que cursan con modificación de la absorción se pueden producir por uno o más de los mecanismos siguientes:

1. Modificación del pH en el lugar de absorción.
2. Adsorción, adsorción-intercambio iónico y formación de quelatos o complejos.
3. Procesos de competición por un transportador.
4. Modificación de la motilidad gastrointestinal
5. Alteración de la membrana de absorción.

Independientemente del mecanismo implicado en el proceso, el resultado final de la interacción puede originar una modificación en la cantidad de principio activo absorbido, con disminución o aumento de la biodisponibilidad en magnitud, y/o bien una modificación en la velocidad de absorción, con modificación de la biodisponibilidad en velocidad, que puede aumentar o disminuir.

Las interacciones que cursan con una modificación en la cantidad de principio activo absorbido tendrán gran importancia desde el punto de vista terapéutico, cuando la interacción de lugar a concentraciones plasmáticas que se encuentren siempre por debajo de la concentración mínima eficaz (CME) o por encima de la concentración máxima tolerada (CMT) (Figura 1). La modificación de la biodisponibilidad en magnitud puede causar ineficacia terapéutica, efectos tóxicos o bien, una modificación en la duración de los efectos observados.

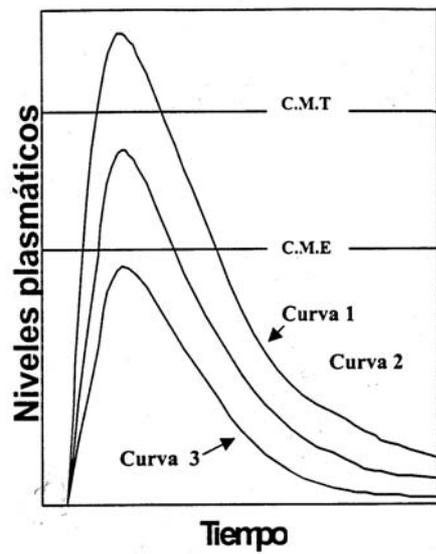


Figura 1. Curva 1: interacción que cursa con aumento de la cantidad absorbida con obtención de concentraciones superiores a la concentración máxima tolerada. Curva 2: evolución teórica de niveles plasmáticos-tiempo del fármaco de referencia. Curva 3: interacción que cursa con disminución de la cantidad absorbida. C.M.T. (concentración máxima tolerada) y C.M.E.: (concentración mínima eficaz).

Cuando la interacción cursa con variación en la velocidad de absorción y el fármaco presenta un valor de semi-vida prolongada, la repercusión clínica es mínima. Sin embargo, cuando se desea una respuesta rápida (analgésicos, hipnóticos, terapia antibacteriana, etc.) la interacción puede tener mayor relevancia.

### **1. Modificación del pH en el lugar de absorción**

La absorción de fármacos administrados por vía oral, tanto en formas sólidas como líquidas, depende de valor de pH que exista en el lugar de absorción. Si éste se modifica, la absorción puede verse comprometida por los siguientes motivos:

#### *1. 1. Modificación de la estabilidad del fármaco*

Algunos agentes terapéuticos sufren una descomposición no metabólica, pH dependiente, total o parcialmente, en contacto con los fluidos gástricos, debido a su reactividad química. Ello supone una modificación de la cantidad absorbida, dependiendo del pH en el lugar de absorción.

La biodisponibilidad oral de la ampicilina es del orden de 45 %, debido a que sufre descomposición parcial cuando se encuentra en medio ácido gástrico. Un incremento del pH en el lugar de absorción origina una disminución de la degradación de la ampicilina. Del mismo modo, la eritromicina, por ser un fármaco lábil en medio ácido, puede sufrir una menor degradación si se produce una discreta elevación del pH en el lugar de absorción. Por este motivo, la utilización de ésteres de eritromicina evita la degradación del fármaco en el medio gástrico y una vez que alcanza el intestino delgado, por acción de las esterasas se produce la liberación del antibiótico.

La didanosina sufre un proceso de degradación hidrolítica en medio ácido, de tal manera que cuando se administra con agentes modificadores del pH gastrointestinal, como son los antihistamínicos  $H_2$ , puede

aumentar su absorción. Así, se ha observado un incremento de la biodisponibilidad en magnitud de un 14%, en pacientes que tomaban ranitidina (25), si bien la interacción no presenta relevancia clínica. Por ello, este compuesto antirretroviral se formula con agentes tamponantes, con objeto de mantener el pH tan alto como sea posible con el fin minimizar la hidrólisis provocada por el ácido gástrico.

### *1.2. Modificación del coeficiente de solubilidad*

La solubilidad de fármacos de carácter ácido, tales como el ácido acetilsalicílico se puede incrementar al aumentar el pH, mientras que disminuye en aquellos que presentan carácter básico, como el meprobramato. Si únicamente es susceptible de absorberse el fármaco disuelto, se comprende que la modificación del pH puede modificar la cantidad absorbida.

El saquinavir presenta una biodisponibilidad por vía oral baja debido a su escasa solubilidad y a que sufre un efecto de primer paso intenso. Su biodisponibilidad oral puede aumentar cuando se administra con ciertos alimentos como zumo de pomelo y comidas con un alto contenido graso, que favorecen su disolución y posterior absorción. Además, la presencia de alimentos disminuye el efecto de primer paso, por lo que se recomienda administrar saquinavir con la dieta (26,27).

La administración de neutralizantes con preparados no micronizados de glibenclamina triplica la biodisponibilidad en magnitud de ésta e incrementa ligeramente su velocidad de absorción. Dicho aumento se debe a que la elevación del pH gástrico aumenta la solubilidad de los fármacos de carácter ácido y la velocidad de absorción (28).

El ketoconazol es una base poco soluble que debe transformarse en un clorhidrato fácilmente soluble. Sus niveles plasmáticos disminuyen notablemente cuando se administra con antiseoretos o neutralizantes del jugo gástrico, debido a que un aumento del pH gástrico disminuye la disolución y absorción del agente antifúngico. La solubilidad del ketoconazol depende por tanto, del pH, de manera que al aumentar éste disminuye su biodisponibilidad en más de un 90% (29-31).

### 1.3. *Modificación de la liberación del principio activo a partir de su forma farmacéutica (20-24)*

La liberación selectiva de fármacos en una zona determinada del tracto gastrointestinal puede modularse mediante la utilización de excipientes cuya solubilidad sea pH dependiente. Así ocurre con ciertos recubrimientos de formas sólidas, fundamentalmente derivados celulósicos y acrílicos. Estos polímeros son insolubles a pH ácido y no liberan el principio activo, haciéndolo a partir de un determinado valor del mismo.

En estos casos, una modificación del pH en el lugar de absorción puede ser suficiente para modificar la liberación del principio activo y por consiguiente, su absorción.

### 1.4. *Modificación de la fracción de fármaco no ionizada (20-24)*

La absorción, para la mayor parte de los fármacos, tiene lugar como consecuencia de un proceso de transporte por difusión pasiva, donde el paso está claramente condicionado, entre otros factores, por el pH.

El pH que existe en cada tramo de la luz intestinal condiciona la mayor o menor ionización de los fármacos de carácter ácido o básico débil.

Los fármacos básicos de pKa del orden de 7,5 se ionizan alrededor de un 100% en el estómago, un 99% en las fracciones proximales del intestino delgado y, en cambio, en el ileón y el colon están ionizados tan solo en una proporción de aproximadamente, un 24%. La elevación del pH en el lugar de absorción conduce, en este tipo de fármacos, a una disminución de la fracción ionizada con aumento de la no ionizada, que es como se absorben los principios activos mediante procesos de difusión pasiva a través de membranas lipídicas.

El caso inverso es el de los fármacos ácidos débiles de pKa del orden de 4-5. Estos fármacos están ionizados en un 10% en estómago, un 70% en duodeno y en un 100% en ileón y colon. El aumento del pH en el

lugar de absorción origina una disminución de la forma no ionizada, que tal como indicamos, es la forma en la que el fármaco se absorbe por difusión pasiva.

Los agentes antiácidos, antihistamínicos  $H_2$ , anticolinérgicos, así como los modificadores de la bomba de protones, incrementan el pH en el lugar de absorción de la mayor parte de los fármacos, por tanto, son susceptibles de producir interacciones por modificación del proceso de absorción. De forma análoga, la ingesta de alimentos incrementa el pH, con la misma repercusión en los procesos de absorción.

## **2. Adsorción, adsorción- intercambio iónico y formación de complejos**

### *2.1. Adsorción*

Interacción de tipo físico-químico en la que una sustancia exógena (adsorbente) administrada conjuntamente con un fármaco (adsorbato) es capaz de adsorberlo, produciendo una disminución de la cantidad absorbida.

Cuando se produce este tipo de interacción, la fracción de fármaco administrada no está disponible para absorberse, porque el sólido adsorbente-adsorbato es insoluble en los fluidos gástricos y/o intestinales, y por lo tanto, transitará por el tracto gastrointestinal y se eliminará a través de las heces, provocando una disminución de la biodisponibilidad en magnitud.

El agente adsorbente puede interaccionar con el fármaco en las siguientes fases:

- a. Fase de absorción. Tras la administración de ambos agentes por vía oral (adsorbente y adsorbato), el efecto observado es una disminución de la cantidad absorbida.
- b. Fase de reabsorción. El fármaco implicado en este tipo de interacción debe sufrir ciclo entero-hepático y puede haber sido adminis-

trado por vía oral, parenteral o rectal. La interacción cursa con la ruptura del ciclo entero-hepático, de tal manera que se impide de nuevo la reabsorción, lo que cursa con disminución de la semi-vida plasmática, favoreciéndose su eliminación a través de las heces.

Entre las sustancias exógenas capaces de interaccionar con los fármacos por un mecanismo de adsorción se encuentran, componentes de la dieta, excipientes de la formulación, así como otros fármacos.

Interacciones que cursan con este mecanismo son las que se producen cuando el carbón activo, la bentonita, el caolín o el caolín-pectina, que son potentes adsorbentes, fijan a fármacos tales como la lincomicina (32), carbamazepina, tolbutamida, ácido valproico (34), digoxina, fenitoina, ácido acetilsalicílico (35), fenobarbital (36), cloroquina (37), pirimetamina (38), etc.

Desde el punto de vista terapéutico, las consecuencias de este tipo de interacción son muy diversas. En ocasiones se observa una ineficacia terapéutica, mientras que en otras, este tipo de interacción resulta interesante por la posibilidad de paliar los efectos de ciertos fármacos después de una intoxicación.

El tiempo que media entre la administración de ambos agentes, así como la velocidad de absorción del fármaco son factores que condicionan este tipo de interacción. Así, la biodisponibilidad oral del fenobarbital se reduce a valores del orden del 10% con respecto a la situación control (sin agente adsorbente), cuando se administra carbón activo a los 5 minutos de la administración del fármaco y, al 70%, cuando el tiempo que transcurre entre ambas administraciones es de 1 hora (36). Si la absorción es rápida y el tiempo que media entre la administración del fármaco y el agente adsorbente es del orden de 1 hora, el fármaco se absorberá antes de que el agente adsorbente alcance el lugar de absorción y entonces, su efecto será casi imperceptible. En contraposición, si el fármaco se absorbe muy lentamente, el agente adsorbente coincidirá físicamente en el lugar de absorción con el remanente de fármaco no absorbido, impidiendo su absorción (Figura 2).

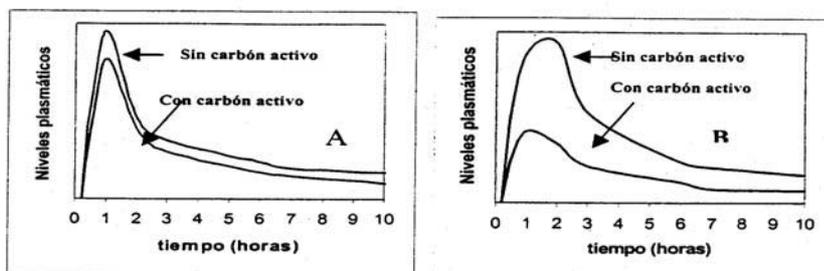


Figura 2. Simulación de niveles plasmáticos de dos fármaco con absorción rápida (A) y lenta (B) respectivamente, cuando se administran con y sin carbón activo.

l-  
l-

Tal como se indicó anteriormente, este tipo de interacción puede ser interesante en el tratamiento de algunas intoxicaciones agudas por fármacos. Así por ejemplo, la eficacia del carbón activo es tanto mayor cuanto menor es el tiempo transcurrido entre la intoxicación y el tratamiento y, a igualdad de tiempo, resulta más eficaz cuanto más lentamente tenga lugar el proceso de absorción del fármaco.

Además, el agente adsorbente puede interactuar con el fármaco impidiendo su reabsorción cuando se trate de fármacos que sufren ciclo entero-hepático. En estos casos, para que se produzca la rotura de dicho

ciclo, el tiempo transcurrido entre la administración del fármaco y el agente adsorbente habrá de ser de más de una hora.

## *2.2. Adsorción-intercambio iónico*

La colestiramina y el colestipol son agentes antihiperlipémicos, capaces de reducir los niveles de colesterol y ácidos biliares, disminuyendo la lipidemia y colesterolemia. Estas resinas, cuando se administran por vía oral, no se absorben, pero son capaces de fijar sustancias de carácter aniónico que se encuentren en la luz intestinal, como los metabolitos del colesterol y los ácidos biliares, impidiendo la absorción de lípidos y disminuyendo los niveles de lípidos circulantes.

Por este mismo mecanismo, las resinas de intercambio iónico pueden interaccionar con numerosos fármacos como fenilbutazona, warfarina (39), digitoxina, digoxina (40,41), etc., originando una disminución de la cantidad de fármaco absorbido y/o una rotura del ciclo entero-hepático, cuando la interacción se produzca con fármacos capaces de eliminarse significativamente a través de la bilis, sufriendo reabsorción posteriormente.

Esta interacción puede tener relevancia desde el punto de vista clínico ya que se origina una disminución de los efectos terapéuticos.

Las interacciones por adsorción-intercambio iónico se pueden prevenir y evitar cuando cursan con disminución de la cantidad absorbida, si la colestiramina o el colestipol, así como otras resinas de intercambio iónico, se administran una hora antes o al menos tres horas después de la administración del fármaco con el que interaccionan.

Las interacciones que obedecen a una modificación del ciclo entero-hepático y que podrían producirse con fármacos que se eliminan en un porcentaje importante por vía biliar y que necesitan de las secreciones biliares para su absorción, no son susceptibles de evitarse, si bien deben tenerse en cuenta por la posible significación clínica que pudieran tener. La administración de colestiramina y digitoxina provoca un aumento de la eliminación del cardiotónico por vía biliar debido a la ro-

tura del ciclo entero-hepático. Dicha interacción puede tener significación clínica.

Si se produce este tipo de interacción al administrar conjuntamente warfarina y colestiramina, será necesario controlar el tiempo de protrombina y aumentar la dosis del agente anticoagulante, a no ser que se retrase la administración de la resina de 3 a 6 horas.

### *2.3. Formación de complejos*

En este tipo de interacción, una sustancia exógena y/o endógena puede unirse a un principio activo, originando un complejo. Si el complejo que se forma es más soluble que el fármaco que se administra, se puede aumentar su biodisponibilidad en magnitud. Mientras que, si es menos soluble, se puede producir una disminución de la cantidad de fármaco absorbida.

Dentro de este tipo de interacciones, se pueden citar aquellas en las que intervienen iones metálicos como calcio, hierro, magnesio, bismuto, aluminio, etc.

Una de las interacciones más conocidas que cursa con formación de complejos es la que se produce entre el calcio y la tetraciclina (42). Ésta puede interaccionar, también, con todos los cationes di y trivalentes (hierro, cobre, níquel, zinc, magnesio, aluminio, etc.) siempre que ambos agentes se encuentren en cantidad suficiente para formar un complejo. La interacción con cobre, zinc y níquel carece de importancia, ya que estos metales se suelen encontrar en cantidades de trazas en el lugar de absorción. No ocurre lo mismo con el calcio, hierro, magnesio o aluminio que pueden encontrarse en cantidades suficientes para formar un complejo. Como consecuencia de esta interacción la tetraciclina no solo ve disminuida su absorción, sino que también se produce una disminución de sus efectos antibacterianos.

La ciprofloxacina (43-45), ofloxacina (46), penicilamina (47), son otros fármacos que también ven reducida su biodisponibilidad, cuando se administran con antiácidos que contienen hidróxido de aluminio o magne-

sio u otros cationes divalentes (calcio y hierro), debido a la formación de complejos insolubles.

El sucralfato reduce de forma acusada la absorción de ciprofloxacina, enoxacina, levofloxacina, ofloxacina y norfloxacina, cuando se administran conjuntamente por vía oral. Así, se ha observado una disminución de la biodisponibilidad del 88% para la enoxacina y del 70% para la ciprofloxacina, debido a la formación de quelatos insolubles entre el hidróxido de aluminio del sucralfato y los grupos 4-ceto y 3- carboxilo de la quinolona en el tracto gastrointestinal (48-50).

Habitualmente, para disminuir los efectos de este tipo de interacción se recomienda espaciar la administración de ambos agentes como mínimo 2 horas.

En la mayoría de las ocasiones la interacción cursa con la formación de un complejo menos soluble que el fármaco aunque a veces, el complejo es más soluble. Así, anticoagulantes orales como dicumarol y warfarina, cuando se administran de forma conjunta con hidróxido de magnesio y trisilicato de magnesio, respectivamente, forman un complejo de quelación más fácilmente absorbible, ocasionando un incremento de los niveles plasmáticos y por tanto, del efecto terapéutico (51,52).

### **3. Procesos de competición por un portador**

Los azúcares (glucosa), aminoácidos (leucina, arginina, metionina, alanina), vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, piridoxina), así como algunos biocatalizadores, como el hierro, requieren de la presencia de un portador para su absorción.

Determinados fármacos con analogía estructural a las sustancias naturales indicadas se absorben utilizando los mismos transportadores. Tal es el caso de levodopa, aminopenicilinas, corticosteroides, baclofeno, etc.

Si ambos agentes, fármaco y sustancia natural, se administran conjuntamente por vía oral y compiten por el mismo portador en su proceso de absorción, se puede producir una interacción farmacocinética con disminución de la biodisponibilidad del fármaco.

La levodopa es un agente antiparkinsoniano que, cuando se administra con una dieta rica en fenilalanina, puede producirse por competición por el mismo transportador una reducción considerable de la biodisponibilidad oral del antiparkinsoniano por ello, en los casos en que no sea posible administrar la levodopa distanciada de las comidas, la dieta debe estar prácticamente exenta de proteínas que contengan fenilalanina.

#### **4. Modificación de la motilidad gastrointestinal (22-24)**

El proceso fisiológico que regula el paso del contenido gástrico hacia el duodeno a través del píloro se denomina vaciamiento gástrico. Dicho proceso puede condicionar la velocidad de absorción de los principios activos, ya que el intestino delgado es el lugar de absorción por excelencia para la mayor parte de los fármacos.

La presencia de alimentos y de ciertos fármacos puede modificar la velocidad de vaciamiento gástrico.

En general, se considera que la ingesta de alimentos disminuye la velocidad de vaciamiento gástrico. Por lo que se refiere al volumen de alimento, su influencia se traduce en un incremento de la semivida de vaciado. Así, las comidas frugales vacían más rápidamente que las copiosas.

La influencia del volumen administrado adquiere una significación especial para fármacos poco solubles, cuando se administran en ayunas con volúmenes variables de agua o líquidos acuosos. Si no se logra la disolución completa del fármaco en el estómago, consecuencia de haber ingerido un volumen insuficiente, su absorción puede estar condicionada por la disolución de éste a lo largo de su tránsito intestinal. Por el contrario, si el fármaco se ha disuelto completamente en el estómago, la absorción podrá ser inmediata, o por lo menos, mucho más rápida, pudiendo incluso hallarse limitada por la velocidad de vaciamiento gástrico si el fármaco es muy absorbible. Con el fin de favorecer la absorción, se recomienda ingerir un volumen de líquido (agua, zumos) no inferior a 100 ml por toma oral.

En función de la consistencia del alimento ingerido, el acceso del contenido gástrico al duodeno se produce de acuerdo al orden siguiente:

Fluidos > semisólidos > sólidos

Los componentes químicos de la dieta humana inhiben la velocidad de vaciamiento por dos mecanismos, nervioso y hormonal. Así, por mecanismo hormonal actúan los glúcidos, que se comportan como inhibidores moderados y los lípidos, que actúan como inhibidores potentes. Las proteínas, por mecanismo nervioso, producen una inhibición intermedia entre los dos anteriores.

Cuando el pH del contenido gástrico se mantiene dentro de los límites fisiológicos, su influencia en la velocidad de vaciamiento gástrico presenta poca relevancia. Sin embargo, en los estados de hiperclorhidria se produce retraso del vaciamiento gástrico, al igual que tras la administración de agentes antiácidos a dosis elevadas.

Otro de los factores que influyen en la velocidad de vaciamiento es la tonicidad del contenido gástrico. Iones como potasio, calcio, sulfato, etc, que son relativamente voluminosos, tienden a retrasar el vaciamiento tanto más cuanto mayor es su concentración en el medio, de la misma forma que ocurre con los azúcares (glucosa, sorbitol, etc.) En contraposición, iones como cloruro, sodio, bicarbonato, etc., y algunos compuestos de bajo peso molecular (urea, glicerina), cuando se encuentran a concentraciones bajas lo activan, y lo retardan a concentraciones claramente hipertónicas. El agua potable y las aguas minerales, al ser soluciones hipotónicas de iones cloruro, bicarbonato y sodio, actúan como activadores del vaciamiento gástrico.

La temperatura influye también en la velocidad de vaciamiento gástrico, de tal manera que las comidas frías vacían más rápidamente que las calientes.

La posición del cuerpo condiciona también la velocidad de vaciamiento gástrico y así, la posición de decúbito supino lateral derecho, favorece el vaciamiento, mientras que la decúbito supino lateral izquierdo lo retrasa.

Los agentes terapéuticos pueden, bien por su acción específica sobre el sistema nervioso autónomo o como consecuencia de sus efectos no específicos, modificar la velocidad de vaciamiento gástrico. De tal forma que los fármacos con actividad procinética, como los agentes colinérgicos y los simpaticolíticos, aumentan la velocidad de vaciamiento gástrico, mientras que los eucinéuticos, como son los anticolinérgicos, adrenérgicos, bloqueantes ganglionares o los analgésicos opiáceos, la disminuyen.

La metoclopramida y la propantelina son dos agentes terapéuticos con actividad antiemética y anticolinérgica, respectivamente y que tienen por tanto, efectos contrapuestos sobre el vaciamiento gástrico, de tal manera que son capaces de modificar la absorción de otros fármacos, como el paracetamol. La administración de metoclopramida y paracetamol da lugar a un aumento de la velocidad de absorción de este último, obteniéndose una concentración máxima ( $C_{\text{máx}}$ ) más alta que en la situación control (paracetamol solo) y una reducción del  $t_{\text{máx}}$ . La propantelina, como todos los anticolinérgicos, conduce a un efecto opuesto, aumenta el  $t_{\text{máx}}$  y descende el  $C_{\text{máx}}$  (Figura 3). Sin embargo, en ambos casos, la cantidad total absorbida de paracetamol es del mismo orden (53).

La cisaprida es una ortopramida análoga a la metoclopramida que produce efectos similares a ésta en cuanto a la modificación de la velocidad de absorción de otros fármacos, cuando éstos se administran conjuntamente por vía oral. Así, puede aumentar la velocidad de absorción del diazepam y la disopiramida (54,55).

Los opioides y sus análogos actúan retrasando considerablemente el vaciamiento gástrico y el tránsito intestinal, pudiendo retrasar la velocidad de absorción de los agentes terapéuticos que se administren conjuntamente por vía oral (56,57).

El intestino delgado es el lugar idóneo para la absorción de fármacos administrados por vía oral y su aprovechamiento por tanto, dependerá del tiempo que éstos permanezcan en dicha zona. Si el fármaco transita rápidamente por el tracto intestinal su absorción puede ser incompleta, disminuyendo su biodisponibilidad en magnitud. En contraposición, una velocidad de tránsito demasiado lenta puede favorecer la exposición del fármaco a enzimas, secreciones, flora bacteriana, etc., capaces de degradarlo, antes de su absorción. De ahí, la gran importancia que tiene el conocimiento de los factores que condicionan la motilidad intestinal.

La motilidad intestinal puede verse modificada por la presencia de alimentos y determinados fármacos. Así, los alimentos suelen activarla dependiendo del volumen, viscosidad, composición y tonicidad del contenido.

El volumen de alimento, contrariamente a lo que sucede en el caso del vaciamiento gástrico, aumenta el tránsito, de forma que las comidas copiosas transitan más rápidamente que las ligeras. A su vez, la viscosidad del contenido intestinal puede retrasar la disolución de los fármacos que se encuentren en forma sólida y la difusión del principio activo disuelto hacia la membrana de absorción, disminuyendo su absorción.

La composición de la dieta es otro factor que modifica la motilidad intestinal, de tal manera que los hidratos de carbono la exaltan, las proteínas lo hacen en menor proporción y los lípidos apenas la modifican. Además, la presencia de cantidades elevadas de sal en los alimentos estimula la motilidad intestinal.

Como ya hemos indicado, algunos fármacos pueden modificar la motilidad intestinal así, los agentes colinérgicos la incrementan y los anticolinérgicos la retrasan.

Debido al efecto anticolinérgico que presentan los antidepresivos tricíclicos, pueden aumentar la absorción del dicumarol, debido probablemente a que se prolonga el tiempo durante el cual está disponible para su disolución y posterior absorción. Por el contrario, la absorción de la levodopa se ve disminuida al estar expuesta durante más tiempo a la acción enzimática de la mucosa intestinal

Si se produce un aumento en la motilidad intestinal, ésta puede tener las siguientes consecuencias:

1- Absorción incompleta del fármaco, si el tránsito es demasiado rápido. Esta interacción puede afectar a los fármacos poco solubles (cuyo proceso de disolución puede ser incompleto), los hidrófilos (cuya baja constante de absorción no garantiza que ésta sea íntegra) y a aquellos que se absorben por mecanismos especializados de transporte en lugares muy específicos.

2- Aumento de la absorción de fármacos poco solubles en el estómago, ya que al aumentar la motilidad intestinal se favorece su mezcla con las secreciones digestivas, en definitiva su disolución.

## **5. Alteración de la membrana de absorción**

La integridad de la mucosa intestinal es indispensable para una correcta absorción de los fármacos, ya que si ésta se encuentra alterada, se puede producir una disminución en la absorción de los principios activos. Así, agentes antineoplásicos como cisplatino, metotrexato, vincristina y daunorubicina alteran la membrana intestinal, dificultando la absorción de la carbamazepina o el ácido valproico (58,59).

## **INTERACCIONES FARMACOCINÉTICAS QUE AFECTAN AL PROCESO DE DISTRIBUCIÓN (20-22,60)**

Tras la administración de un fármaco y una vez que alcanza la circulación sistémica, va a ser distribuido rápidamente por el organismo. La mayoría de los fármacos se distribuyen disueltos completa o parcialmente en el agua plasmática y unidos, en cierta proporción, a macromoléculas de naturaleza proteica, fundamentalmente a seroalbúmina. Por consiguiente, el proceso de distribución supone una transferencia reversible de fármaco desde la sangre a los diferentes espacios extravasculares (órganos, tejidos y fluidos corporales) así como a los distintos componentes celulares sanguíneos.

La distribución de fármacos por el organismo está condicionada por los factores siguientes:

- Características físico-químicas del principio activo, tales como liposolubilidad y unión a macromoléculas.
- Factores fisiológicos, tales como edad, sexo y peso corporal.
- Factores patológicos, como son los que modifican el flujo sanguíneo a los tejidos corporales, los que alteran la permeabilidad de las membranas biológicas o los que ocasionan cambios en la relación de volúmenes entre los distintos componentes acuosos y no acuosos del organismo.

El paso de los principios activos desde la sangre a las estructuras tisulares está regido por tres factores fundamentales como son: el flujo sanguíneo que llega al tejido, la masa del tejido y la afinidad que presente éste por el fármaco. Así, en estructuras altamente profundidas como cerebro, hígado o riñón, el equilibrio tisular del fármaco se alcanza antes que en aquellos tejidos escasamente profundidos, incluso aunque éstos presenten una mayor afinidad por el agente terapéutico.

Por ejemplo, el efecto hipnótico del tiopental desaparece al disminuir rápidamente sus niveles en líquido cefalorraquídeo, mientras que su

distribución a tejido adiposo, aunque siendo mucho más lenta, es mayoritaria. La captación tisular de fármaco se mantendrá hasta que se alcance el equilibrio entre sus niveles tisulares y plasmáticos (2).

La fracción libre de fármaco, no unida, es capaz de abandonar el espacio vascular durante el proceso de distribución, y así poder alcanzar los distintos órganos y tejidos donde se fijará, con mayor o menor intensidad, a proteínas u otros componentes tisulares.

Como el organismo es un sistema abierto y dinámico, el proceso de distribución se podría representar de acuerdo al esquema que se muestra en la Figura 4. En él aparecen tres compartimentos perfectamente diferenciados e interrelacionados entre sí: el espacio plasmático, que supone aproximadamente el 4% del peso corporal, el espacio intersticial y linfático, correspondiente al 12% del peso y, por último, los tejidos y el agua corporal, que representan el 42% del peso total de un individuo. En los tres espacios señalados se establece un equilibrio entre la fracción de fármaco libre y la unida, teniendo en cuenta que en el torrente circulatorio la interacción más importante se produce con las proteínas plasmáticas.

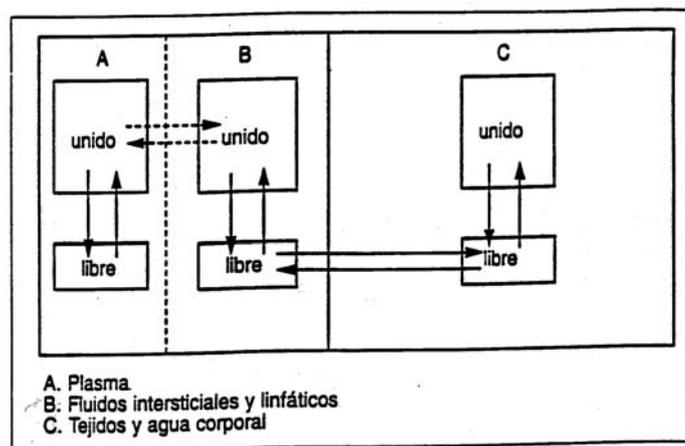


Figura 4. Compartimentos de agua en un organismo normal y distribución de la fracción libre y unida a proteínas de un fármaco.

Dentro de las proteínas plasmáticas, solamente un número reducido de ellas pueden ser consideradas proteínas de transporte. Algunas, aunque presentan una especificidad muy elevada, como por ejemplo la proteína de unión a la vitamina D, la globulina de unión al cortisol, la proteína de unión a hormonas sexuales o la globulina de unión a la tiroxina sin embargo, poseen la característica de saturarse con gran rapidez (24).

Existen otras proteínas de transporte, como son la albúmina, la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida, las lipoproteínas y las diversas globulinas, que presentan menor afinidad de unión a determinados ligandos y además, son mucho menos específicas por lo que puede haber competición de ligandos por los mismos puntos de unión. Estas proteínas transportadoras son las más interesantes a efectos de posibles interacciones medicamentosas (23).

La unión a proteínas plasmáticas es reversible y se lleva a cabo mediante la formación de puentes de hidrógeno o por fuerzas débiles del tipo de Van der Waals, que unen los restos carboxilo, hidroxilo, etc., que poseen los aminoácidos de las proteínas. Con mucha menos frecuencia puede establecerse una unión irreversible, por formación de un enlace covalente entre el fármaco y la proteína. Este tipo de unión es responsable de ciertas manifestaciones de toxicidad, como puede ser el efecto cancerígeno de ciertas sustancias químicas o la hepatotoxicidad que se manifiesta como consecuencia de la administración de dosis elevadas de acetaminofeno, debida a la formación de metabolitos intermedios que interaccionan con las proteínas hepáticas.

La albúmina sérica es, con diferencia, la proteína portadora más abundante e importante como responsable de la unión reversible de fármacos. A pesar de su elevado peso molecular, 69.000 daltons, no se encuentra confinada exclusivamente en el plasma, donde está el 40% del total de la proteína, sino que tiene una amplia distribución extravascular. En condiciones normales, los niveles plasmáticos de albúmina son de 35-

45 g/l. Aunque la albúmina fija una gran variedad de fármacos, desempeña un papel fundamental en la unión de compuestos neutros y de carácter ácido débil (Tabla 1).

### SUSTANCIAS QUE SE UNEN A LA ALBÚMINA

#### SITIO I

Aciclocilina  
 Acido salicílico  
 Acido valproico  
 Azapropazona  
 Bilirrubina  
 Clorazepato  
 Clorotiazida  
 Dicumarol \*  
 Diflunisal  
 Fenilbutazona  
 Fenitoina  
 Flucoxacilina \*  
 Flurbiprofeno \*  
 Furosemida  
 Glibenclamida  
 Indometacina  
 Ketoprofeno  
 Naproxeno  
 Oxifenbutazona

#### SITIO II

Diazepam  
 Dicloxacilina  
 Dicumarol  
 Flucoxacilina \*  
 Flurbiprofeno \*  
 Glibenclamida  
 Ibuprofeno \*  
 Indometacina  
 Ketoprofeno \*  
 Naproxeno  
 Probenecid  
 Tamoxifeno  
 Tolazomida  
 Tolbutamida  
 Triptófano

#### SITIO III

Acido acetilsalicílico  
 Clomifeno  
 Tamoxifeno

Salicilamida  
Sulfametizol  
Tolbutamida  
Warfarina

\* Sitio de unión principal para aquellos fármacos que se unen a más de un sitio.

**Tabla 1.-** Sustancias que se fijan a los distintos sitios de unión de la seroalbúmina.

En su estructura se ha señalado la existencia de diferentes lugares de unión a los que se pueden fijar los fármacos y, dentro de ellos, los sitios de unión más importantes son:

- Sitio I, donde se fijan compuestos de estructura tan diversa como son la warfarina, la fenilbutazona o el ácido valproico, entre otros.
- Sitio II, con mayor especificidad que el sitio I, y al que se unen moléculas como las benzodiazepinas, compuestos indólicos, y ácidos carboxílicos (ketoprofeno, naproxeno o ibuprofeno).
- Sitio III, con menor trascendencia clínica. A él se fijan la digitoxina, el ácido acetilsalicílico y los ácidos biliares.

La capacidad de unión que tienen las proteínas de transporte no se limita a fármacos y sustancias exógenas, sino que también se refiere a sustancias endógenas. Así ocurre, en el caso de la albúmina, con la bilirrubina que se une al sitio I o con el triptófano, unido al sitio II.

La más pequeña de las proteínas plasmáticas es la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida, que tiene un peso molecular de 41.000 daltons. Sus niveles plasmáticos normales oscilan entre 0,4 y 1,0 g/l, aunque se encuentran aumentados en procesos inflamatorios, malignos o ante situaciones de estrés. La  $\alpha_1$ -glicoproteína fija fundamentalmente fármacos de carácter básico, co-

mo los antidepresivos tricíclicos o el propranolol, aunque también puede unir algunos de tipo ácido (Tabla 2).

### **FÁRMACOS QUE SE UNEN A LA $\alpha_1$ -GLICOPROTEÍNA ÁCIDA**

Antiarrítmicos (aprindina, bupivacaina, disopiramida, lidocaina, quinidina, verapamilo).

Antidepresivos (amitriptilina, imipramina, nortriptilina).

$\beta$ -bloqueantes (alprenolol, oxprenolol, pindolol, propranolol, sotalol, timolol).

Analgésicos opiáceos (metadona, petidina).

Otros fármacos: clorpromacina, eritromicina, metoclopramida, dipyridamol, nicardipina, fenciclidina, prazosina, prednisona, progesterona, triazolam.

#### **Tabla 2.- Fármacos que se unen a la $\alpha_1$ -glicoproteína ácida.**

También son proteínas transportadoras las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  globulinas, cuyo peso molecular varía en función de la clase a la que pertenecen. Las  $\alpha$  y  $\beta$  globulinas presentan elevada especificidad para la unión con ciertos esteroides, como la prednisona o la transcortina. Sin embargo, la  $\gamma$ -globulina reacciona específicamente con antígenos, pero inapreciablemente con la mayoría de los fármacos, aunque es capaz de fijar compuestos como la metadona o el pancuronio (61).

Finalmente, las lipoproteínas son moléculas de gran tamaño, pudiendo llegar su peso molecular a 2.500.000 daltons y se caracterizan por

contener grandes cantidades de lípidos. Fijan fundamentalmente compuestos muy liposolubles, normalmente de naturaleza básica, por oclusión en su núcleo lipídico (Tabla 3).

### FÁRMACOS QUE SE UNEN A LIPOPROTEÍNAS

Acido glafenámico	Imipramina
Ciclosporina	Probucol
Clorpromacina	Quinidina
Diclofenaco	Tetraciclina

**Tabla 3.-** Fármacos que se unen a las lipoproteínas.

Las proteínas transportadoras son moléculas grandes, si las comparamos con el tamaño de los fármacos, y pueden presentar, como ya hemos indicado, más de una clase de sitios de unión, con lo que podría ocurrir que un fármaco se uniera a distintos sitios con diferentes constantes de afinidad por cada uno de ellos. La representación gráfica de este comportamiento parecería como un trazado hiperbólico, reflejo del carácter saturable que presenta la unión a proteínas.

A concentraciones bajas de fármaco, la mayoría de él puede fijarse a la proteína, sin embargo, si la concentración de fármaco es elevada, puede producirse la saturación de los sitios de unión a la proteína transportadora, con lo que se obtendría un rápido aumento en la concentración libre de fármaco.

Para fármacos con un elevado grado de fijación a proteínas, un pequeño cambio en el porcentaje unido supone grandes modificaciones en el porcentaje libre. Por ejemplo, si el porcentaje unido pasa del 99 al 98%, el porcentaje libre se duplicaría, pasando del 1 al 2%. El porcentaje de unión varía muchísimo de unos compuestos a otros y así nos encontramos

con compuestos como el dicumarol que, a concentraciones de 0,05 mg/l, presenta solamente 4 de cada 1000 moléculas libres en circulación (Tabla 4) (1).

### **FÁRMACOS CON ELEVADA UNIÓN A PROTEÍNAS**

Dicumarol	(99%)	Clorotiazida	(95%)
Eritromicina	(93%)	Dexametasona	(77%)
Fenilbutazona	(98%)	Clofibrato	(97%)
Acido salicílico	(81%)	Warfarina	(99%)
Furosemida	(98%)	Indometacina	(97%)
Clorpromazina	(90%)	Naproxeno	(99%)
Rifampicina	(89%)	Propranolol	(93%)
Fenitoina	(93%)	Tolbutamida	(98%)
Probenecid	(93%)	Imipramina	(96%)
Digitoxina	(91%)	Nortriptilina	(95%)

### **FÁRMACOS CON UNIÓN INTERMEDIA A PROTEÍNAS**

Penicilina G	(52%)	Betametasona	(63%)
Cloranfenicol	(70%)	Petidina	(60%)
Acido acetilsalicílico	(61%)	Fenobarbital	(50%)
Quinidina	(75%)	Glutetimida	(55%)
Sulfadiazina	(45%)	Estreptomina	(35%)
Metotrexato	(63%)	Teofilina	(59%)

## FÁRMACOS CON UNIÓN BAJA A PROTEÍNAS

Ampicilina	(13%)	Tetraciclina	(24%)
Digoxina	(29%)	Anfetamina	(22%)
Oxitetraciclina	(31%)	Gentamicina	(10%)
Paracetamol	(4%)	Morfina	(35%)
Cefalexina	(9%)		

**Tabla 4.-** Porcentajes de unión a proteínas plasmáticas de diversos fármacos.

La posible existencia de una interacción por desplazamiento de la unión a proteínas, se puede estudiar *in vivo* determinando el porcentaje de fármaco que circula unido a la proteína transportadora. En el proceso de distribución se establece un equilibrio entre la fracción libre y la unida, de manera que esta última se puede considerar como un reservorio de fármaco en el torrente circulatorio, siendo la fracción libre la única que es susceptible de extravasarse, alcanzar su biofase, metabolizarse y excretarse. A medida que disminuyen los niveles de fármaco libre, parte de las moléculas unidas se van liberando de la unión, para ejercer su acción farmacológica, antes de ser eliminadas.

El porcentaje de fármaco unido (o libre) va a depender de las concentraciones plasmáticas de fármaco y proteína, del número de sitios de unión en la molécula del portador y de la constante de asociación a dicha proteína transportadora. Así, un compuesto que presente una constante de asociación elevada a seroalbúmina, puede desplazar de sus puntos de unión a otros agentes cuya afinidad por la unión sea menor, originando un aumento de la fracción libre en plasma del fármaco desplazado, con las consecuencias que de ello se derivarían.

Además, hay que tener en cuenta que la unión fármaco-proteína puede tener carácter restrictivo o permisivo. En el primer caso, el fármaco está retenido casi exclusivamente en el compartimento donde se encuentra la proteína responsable de la unión. En esta situación, el volumen aparente de distribución es bajo, al ser más elevada la concentración total de fármaco en plasma. Por el contrario, cuando la unión es permisiva, los volúmenes aparentes de distribución son más elevados, con valores superiores a 0,6 l/kg.

El desplazamiento de sustancias endógenas unidas a proteínas por fármacos que compiten por los mismos puntos de unión puede ocurrir, si bien estas interacciones no presentan gran repercusión. Así por ejemplo, un pequeño desplazamiento de la hormona tiroidea o el cortisol, que se unen específicamente a proteínas plasmáticas, no suele tener consecuencias importantes, ya que los mecanismos fisiológicos de control contrarrestan la perturbación ocasionada.

En otras ocasiones, la interacción resulta más relevante desde el punto de vista clínico. Así ocurre con el desplazamiento de la bilirrubina unida a la seroalbúmina por la administración de fármacos como el sulfisoxazol, en la que se produce un incremento de la fracción libre de bilirrubina en plasma, que accede a distintos compartimentos. Este aumento de la fracción libre puede ocasionar retraso mental en niños e incluso la muerte, debido a la dificultad que presentan los recién nacidos para eliminar dicha sustancia endógena, como consecuencia de la escasa madurez de sus equipos enzimáticos (Figura 5) (62).

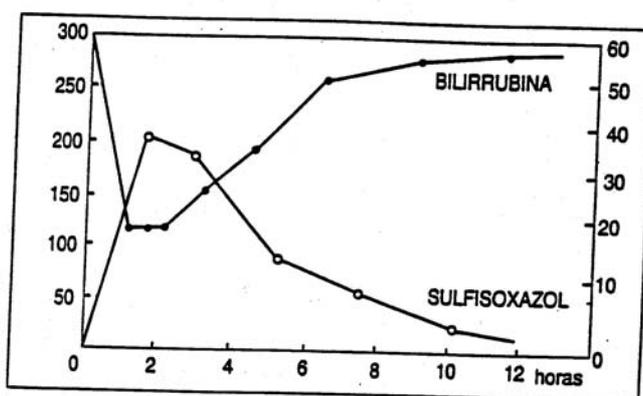


Figura 5. Evolución de los niveles plasmáticos de bilirrubina y sulfisoxazol en el curso de una interacción por desplazamiento (tomado de Oie y col., J. Pharm. Sci. 1979).

La causa más frecuente de modificación de la fracción libre de un fármaco es la interacción por desplazamiento de los sitios de unión al administrarlo simultáneamente con uno o más fármacos. La consecuencia más importante de esta interacción es el aumento de la respuesta farmacológica y, probablemente, también de la toxicidad del agente que es desplazado. Sin embargo, hay que tener en cuenta que dicho aumento tiene

carácter transitorio, debido a la acción compensatoria que supone su mayor aclaramiento metabólico y excreción renal.

Resumiendo lo indicado hasta ahora podemos considerar que para que una interacción por desplazamiento sea significativa, es necesario que concurren las siguientes circunstancias:

- Unión elevada a proteínas del agente que es desplazado.
- Competición de ambos fármacos por los mismos sitios de unión a la proteína transportadora.
- La adición de las concentraciones molares de ambos fármacos, desplazante y desplazado, debe aproximarse a la capacidad de fijación que presenta la proteína a la cual se unen.
- El compuesto desplazante debe presentar mayor afinidad por la unión que el desplazado y/o mayor concentración libre.

Se puede considerar que, normalmente, sólo los fármacos de carácter ácido cumplen esta última condición, ya que los compuestos básicos, en general, suelen tener volúmenes de distribución más elevados, se administran a dosis más bajas y presentan concentraciones plasmáticas menores.

La mayoría de los analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos se encuentran en el grupo de fármacos que reúnen las características adecuadas para dar lugar a interacciones por desplazamiento, ya que se trata de compuestos que circulan fuertemente unidos a proteínas y que además, presentan aclaramientos bajos. Por ejemplo, la fenilbutazona circula unida en un 98% a concentraciones terapéuticas, siendo capaz de desplazar de su unión a hipoglucemiantes orales (63,64) y anticoagulantes orales (65,66), entre otros. Aunque, en general, las dos primeras interacciones no revisten importancia, sí que puede ser significativa la potenciación del efecto anticoagulante de la warfarina.

La warfarina habitualmente utilizada en terapéutica es la mezcla racémica formada por los enantiómeros R y S, presentando el S un efecto hipoprotrombinémico varias veces superior al R. Pues bien, la fenilbuta-

zona es capaz de inhibir el metabolismo de la forma S e inducir el del R obteniéndose, como resultado, la acumulación del enantiómero S y, en consecuencia, un aumento importante del efecto anticoagulante. Además, la fenilbutazona es capaz de desplazar a la warfarina de sus puntos de unión a proteínas con el consiguiente aumento de su fracción libre en plasma (65,66).

En la Tabla 5 se citan otros fármacos que circulan unidos a proteínas en elevada proporción y que por tanto, pueden dar lugar a interacciones por desplazamiento.

<b>FÁRMACOS DESPLAZADOS</b>	<b>FÁRMACOS DESPLAZANTES</b>
Acenocumarina	Clofibrato
Acido valproico	Fenitoina
Antidepresivos tricíclicos	Fenitoina
Metotrexato	Sulfamidas
Tolbutamida	Fenilbutazona Salicilatos Sulfafenazol

Warfarina	Acido mefenámico
	Acido nalidíxico
	Clofibrato
	Fenilbutazona

**Tabla 5.-** Interacciones por desplazamiento de la unión a proteínas

A veces, la interacción puede ser producida por un metabolito del fármaco administrado, como es el caso de la interacción que se manifiesta en pacientes estabilizados con warfarina a los que se administra hidrato de cloral, ya que su metabolito mayoritario, el ácido tricloroacético, es un compuesto con fuerte unión, capaz de desplazar a la warfarina, lo que conduce a un aumento del efecto anticoagulante. Sin embargo, la duración del efecto es muy corta, ya que las moléculas libres del anticoagulante son rápidamente metabolizadas y eliminadas. Por ello, en un espacio corto de tiempo, 5 días aproximadamente, se restaura el equilibrio, no siendo necesario tener que reajustar la dosis del agente anticoagulante (67).

Aunque *in vitro* la mayoría de los fármacos utilizados corrientemente son capaces de ser desplazados por otros sin embargo, *in vivo*, los efectos de esta interacción son rápidamente contrarrestados, por lo que el resultado suele carecer de importancia clínica. Por ello, la mayor parte de las interacciones por desplazamiento, hasta ahora descritas, deberían ser revisadas ya que, en muchos casos, se ha exagerado su significación y riesgo. Hoy día es difícil encontrar ejemplos, clínicamente importantes, de interacciones producidas exclusivamente como consecuencia del desplazamiento de la unión a proteínas. Entre ellas, se podría citar quizás, la marcada diuresis que se ha observado en pacientes con síndrome nefrótico tratados con furosemida a los que se administró clofibrato (68).

Las consecuencias de una interacción farmacocinética por desplazamiento dependerán de si el fármaco desplazado presenta o no aclaramiento restrictivo. Fármacos con aclaramiento restrictivo son aquellos

que presentan una capacidad de extracción pequeña, generalmente inferior a 0,3. Dentro de este grupo se encuentran compuestos como la warfarina, fenitoina, ácido valproico o diazepam, que se caracterizan porque su aclaramiento está condicionado por la unión a proteínas y, en consecuencia, cualquier modificación en la misma afectará a su eliminación. Si el fármaco es desplazado se producirá un aumento transitorio de la fracción libre en plasma ya que, al haber más fármaco disponible para su eliminación, esto se traducirá en un incremento proporcional de su aclaramiento.

Como ya hemos indicado, la fenitoina es un compuesto con aclaramiento restrictivo que se une en elevada proporción a seroalbúmina. Si se administra conjuntamente con ácido valproico, éste es capaz de desplazar, dentro del rango de concentraciones terapéuticas, a la fenitoina de sus puntos de unión, obteniéndose concentraciones libres de esta última terapéuticas con concentraciones totales subterapéuticas, mientras que sin embargo, concentraciones totales de fenitoina terapéuticas podrían traducirse en toxicidad (69,70).

Agentes como lidocaina o propranolol presentan aclaramiento no restrictivo. Se trata de compuestos con una elevada capacidad de extracción, cuyo aclaramiento es independiente del grado de unión a proteínas, ya que en su paso a través de un órgano de eliminación se va a eliminar tanto el fármaco libre como el unido. En este caso, las consecuencias de una interacción por desplazamiento podrían tener mayor relevancia clínica, ya que debido a que el aclaramiento no se ve afectado por cambios en la unión a proteínas, cualquier aumento en la fracción libre, consecuencia de la interacción, debería traducirse también en un incremento de la concentración de fármaco libre en estado estacionario, durante el tiempo que el agente desplazante estuviera presente. A pesar de ello, es difícil encontrar ejemplos en la literatura de interacciones de este tipo que revistan importancia clínica debido en parte, a que existen muy pocos fármacos con aclaramiento no restrictivo.

Dentro de los factores que pueden modificar la fracción de fármaco unido a proteínas se encuentra la modificación de las concentraciones plasmáticas de dichos portadores, hecho que podría aconsejar un cambio en las pautas posológicas establecidas. La edad es uno de los factores fisiológicos que condicionan dicha concentración. Se ha demostrado que

como consecuencia de la menor concentración de proteínas plasmáticas que existe en el neonato, la fracción libre de fármacos como el ácido acetilsalicílico, la fenitoina o el ácido valproico es bastante más elevada que en adultos.

Con la edad se modifica la relación corporal agua/grasa, disminuyen los flujos sanguíneos hepático y renal, disminuye la albúmina plasmática, se altera la perfusión tisular y se produce una profunda perturbación de los procesos metabólicos.

A medida que avanza la edad se produce por tanto, una disminución de la unión de fármacos que se fijan a la albúmina, paralela al grado de hipoalbuminemia existente. Por el contrario, los fármacos que se unen a la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida experimentan un aumento en su grado de unión (71).

La gestación es un estado fisiológico que también supone una modificación en las concentraciones de proteínas así, por ejemplo, a medida que avanza el estado de gestación se produce una disminución en las concentraciones de seroalbúmina y de  $\gamma$ -globulinas, mientras que la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida aumenta al llegar al tramo final del embarazo.

Dentro de los factores patológicos, se ha comprobado que los niveles de seroalbúmina están disminuidos y, aumentados los de las  $\gamma$ -globulinas, en procesos de tipo agudo, como consecuencia de la reacción propia del organismo ante el estado patológico. Los procesos tumorales malignos, las quemaduras, las insuficiencias hepática y renal, el infarto de miocardio, etc., cursan también con hipoalbuminemia. Incluso enfermedades mentales como son la esquizofrenia y las psicosis dan lugar a una modificación de las concentraciones de albúmina sérica que, sin embargo, en estos casos, se manifiesta como hiperalbuminemia (72,73).

En general, una disminución en la concentración plasmática de proteínas será significativa solamente para el caso de fármacos que se unen en alta proporción a proteínas (U.P. > 90%). Consideremos dos casos; la warfarina con una unión del 95% y el fenobarbital, que se une en un 50%. Si el 5% de la warfarina sufre desplazamiento, la concentración libre disponible para acceder a biofase se incrementaría al doble es decir, pasaría del 5 al 10%. Sin embargo, en el caso del fenobarbital, un despla-

zamiento de igual magnitud supondría un incremento de la fracción libre en plasma de tan solo un 10% (del 50 al 55%), incremento que probablemente, no tendría mayor relevancia.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) STOCKLEY, I.H. (1999). Drug Interactions. 5<sup>th</sup> edition. Pharmaceutical Press. London.
- (2) GOODMAN & GILMAN (2001). Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10<sup>a</sup> edición. McGraw-Hill Interamericana. México.
- (3) LEWIS, R.J., TRAGER, W.F., CHAN, K.K., BRECKENRIDGE, A., ORME, M., ROWLAND, M., SCHARY, W. (1974): Warfarin. Stereochemical aspects of its metabolism and the interaction with phenylbutazone. *J. Clin. Invest.* 53:1607.
- (4) MCELNAY, J.C., D'ARCY, P.F. (1977): Interaction between azapropazone and warfarin. *Br. Med. J.* 2:773.
- (5) MCELNAY, J.C., D'ARCY, P.F. (1978): The effect of azapropazone on the binding of warfarin in human serum proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* 30:73.
- (6) MCCANN, M.F., POTTER, L.S. (1994): Progestin-only contraception: a comprehensive review. *Contraception.* 50:51-198.
- (7) BELAISCH, J., DRIGUEZ, P., JANAUD, A. (1976): Influence de certains médicaments due l'action des pilules contraceptives. *Nouv. Presse Med.* 5:1645.
- (8) RAPPORT, D.J., CALABRESE, J.R. (1989): Interactions between carbamazepine and birth control pills. *Psychosomatics.* 30:462-464.
- (9) ORME, M., BACK, D.J., CHADWICK, D.J., CRADFORD, P., MARTIN, C., TJIA, J. (1990): The interaction of phenytoin and carbamazepine with oral contraceptive steroids. *Eur. J. Pharmacol.* 183:1029.
- (10) BANFIELD, C., SAANO, V., GLUE, P., REICHENBERG, P., COLUCCI, R., MEEHAN, J., NOMEIR, A., LIN, C. (1995): Effects of felbamate on oral contraceptive pharmacokinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 57:207.
- (11) BARDICH-CROVO, P., TRAPNELL, C.B., ETTE, E., ZACUR, H., FLEXNER, C. (1998): A pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the effect of rifampin and rifabutin on combination oral contraceptives. *Clin. Pharmacol. Ther.* 63:180.
- (12) OUELLET, D., HSU, A., QIAN, J., LOCKE, C.S., EASON, C.J., CAVANAUGH, J.H., LEONARD, J.M., GRANNEMAN, G.R. (1998): Effect of ritonavir on the pharmacokinetics of ethinyl oestradiol in healthy female volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 46:111-116.

- (13) TSUTSUMI, E., FUJIKI, H., FUKUSHIMA, H. (1979): Effect of furosemide on serum clearance and renal excretion of digoxin. *J. Clin. Pharmacol.* 19:200.
- (14) JORGENSEN, A.W., SORENSEN, O.H. (1970): Digitalis intoxication: A comparative study on the incidence of digitalis intoxication during the periods 1950-1952 and 1964-1966. *Acta Med. Scand.* 188:179.
- (15) CASNER, P.R. (1996): Inability to attain oral anticoagulation: warfarin-rifampin interaction revisited. *South Med. J.* 89:1200-1203.
- (16) Avery's Drug Treatment (1985). 3<sup>rd</sup> edition. Williams and Wilkins. Baltimore.
- (17) HANSEN, M.M., KNUPP, C.A., PFEFFER, M., PITTMAN, K.A. (1977): Nephrotoxicity in combined cephalothin and gentamicin therapy. *Acta Med. Scand.* 201:463-467.
- (18) TOBIAS, J.S., WHITEHOUSE, J.M., WRIGLEY, P.F. (1976). Severe renal dysfunction after tobramycin/cephalothin therapy. *Lancet.* i:425.
- (19) PEDERSEN, F.M., HAMBERG, O., HESS, K., OVESEN, L. (1991). The effect of dietary vitamin K on warfarin-induced anticoagulation. *J. Intern. Med.* 229:517-520.
- (20) SHARGEL, L., YU, A.B.C. (1995). Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. 3rd edition. Appleton & Lange. Norwalk.
- (21) ROWLAND, M. (1995). Clinical pharmacokinetics: concepts and applications. 3rd ed. Lea & Febiger. Baltimore.
- (22) DOMÉNECH BERROZPE, J., MARTÍNEZ LANAO, J., PLÁ DELFINA, J.M. eds.(1998). Biofarmacia y farmacocinética. Volumen II: Biofarmacia. Editorial Síntesis, S.A. Madrid.
- (23) BARCIA HERNÁNDEZ, E., NEGRO ALVAREZ, S. COORDS.(2001). Curso de interacciones de los medicamentos. Fundación de Estudios y Formación Sanitaria. Vigo.
- (24) CADÓRNIGA CARRO, R. (1999). Interacciones medicamentosas (y otros factores modificadores de la respuesta). Fundación S.B. Madrid.
- (25) KNUPP, C.A., DIXON, R.M., GRACIANO, F., DUNKLE, L.M., BARBHAIYA, R.H. (1992): Pharmacokinetic interaction study of didanosine and ranitidine in patients seropositive for human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 36:2975-2079.
- (26) BARRY, M., GIBBONS, S., BACK, D. (1997): Protease inhibitors in patients with HIV disease. *Clin. Pharmacokinet.* 32(3):194-209.
- (27) NOBLE, S., FAULDS, D. (1996): Saquinavir: a review of its pharmacology and clinical potential in the management of HIV infection. *Drugs.* 52:93-112.
- (28) KIVISTO, K.T., LEHTO, P., NEUVONEN, P.J. (1993): The effects of different doses of sodium bicarbonate on the absorption and activity of non-micronized glibenclamide. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 31:236-240.
- (29) BLUM, R.A., D'ANDREA, D.T., FLORENTINO, B.M., WILTON, J.H., HILLIGOSS, D.M., GARDNER, M.J., HENRY, E.B., GOLDSTEIN, H., ACHENTAG, J.J. (1991): In-

- creased gastric pH and the bioavailability of fluconazole and ketoconazole. *Ann. Intern. Med.* 114: 755-757.
- (30) GOSS, T.F., PISCITELLI, S.C., SCHENTAG, J.J. (1991): Evaluation of ketoconazole bioavailability interactions with sucralfate and ranitidine using gastric pH monitoring. *Clin. Pharmacol. Ther.* 49:128.
- (31) PISCITELLI, S.C., GOSS, T.F., WILTON, J.H., D'ANDREA, D.T., GOLDSTEIN, H., SCHENTAG, J.J. (1991): Effects of ranitidine and sucralfate on ketoconazole bioavailability. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 35:1765-1771.
- (32) WAGNER, J.G. (1966): Design and data analysis of biopharmaceutical studies in man. *Can. J. Pharm. Sci.* 1:55.
- (33) NEUVONEN, P.J., KIVISTÖ, K., HIRVISALO, E.L. (1988): Effects of resins and activated charcoal on the absorption of digoxin, carbamazepine and furosemide. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 25:229-233.
- (34) NEUVONEN, P.J., KANNISTO, H., HIRVISALO, E.L. (1983): Effect of activated charcoal on the absorption of tolbutamide and valproate in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24:243-246.
- (35) NEUVONEN, P.J., ELFVING, S. (1978): Reduction of absorption of digoxin, phenytoin and aspirin by activated charcoal. *Eur. J. Pharmacol.* 13:213.
- (36) NEUVONEN P.J., ELONEN, E., MATTTILA, M.J. (1980): Orally given charcoal increases the rate of elimination of phenobarbital, carbamazepine, phenylbutazone and dapsone in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 27:275-276.
- (37) MCELNAY, J.C., MUKHTAR, H.A., D'ARCY, P.F., TEMPLE, D.J., COLLIER, P.S. (1982): The effect of magnesium trisilicate and kaolin on the in vivo absorption of chloroquine. *J. Trop. Med. Hyg.* 85:159-163.
- (38) MCELNAY, J.C., MUKHTAR, H.A., D'ARCY, P.F., TEMPLE, D.J. (1982) : In vitro experiments on chloroquine and pyrimethamine absorption in the presence of anti-acid constituents of kaolin. *J. Trop. Med. Hyg.* 85:153-158.
- (39) LAWLER, D.P., HYERS, T.M. (1993): Extreme prolongation of the prothrombin time in a patient receiving warfarin and cholestyramine. *Cardiovasc. Rev. Rep.* 72-74.
- (40) CALDWELL, J.H., BUSH, C.A., GREENBERGER, N.J. (1971): Interruption of the enterohepatic circulation of digitoxin by cholestyramine. *J. Clin. Invest.* 50:2638.
- (41) CARRUTHERS, S.G., DUJOVNE, C.A. (1980): Cholestyramine and spironolactone and their combination in digitoxin elimination. *Clin. Pharmacol. Ther.* 27:184.
- (42) LEYDEN, J.J. (1985): Absorption of minocycline hydrochloride and tetracycline hydrochloride. Effects of food, milk and iron. *J. Am. Acad. Dermatol.* 12:308-312.

- (43) SCHENTAG, J.J., WATSON, W.A., NIX, D.E., SEDMAN, A.J., FROST, R.W., LETTERI, J. (1988): Time dependent interactions between antacids and quinolone antibiotics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 43:135.
- (44) NIX, D.E., WATSON, W.A., LENER, M.E., FROST, R.W., KROL, G., GOLDSTEIN, H., LETTIERI, J., SCHENTAG, J.J. (1989): Effects of aluminium and magnesium antacids and ranitidine on the absorption of ciprofloxacin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 46:700-705.
- (45) FROST, R.W., LETTIERI, J.T., NOE, A., SHAMBLIN, E.C., LASSETER, K. (1989): Effect of aluminium hydroxide and calcium carbonate antacids on ciprofloxacin bioavailability. *Clin. Pharmacol. Ther.* 45:165.
- (46) NAVARRO, A.S., CABARGA, M.H., HURLÉ, D.G. (1994): Comparative study of the influence of  $Ca^{2+}$  on absorption parameters of ciprofloxacin and ofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 34:119-125.
- (47) IFAN, A., WELLING, P.G. (1986): Pharmacokinetics of oral 500-mg penicillamine: effects of antacids on absorption. *Biopharm. Drug Disp.* 7: 401-405.
- (48) BROUWERS, J.R., VAN DER KAM, H.J., SIJTSMA, J., PROOST, J.H. (1990): Important reduction of ciprofloxacin absorption by sucralfate and magnesium citrate solution. *Drug Invest.* 2:197-199.
- (49) LEHTO, P., KVISTÖ, K.T. (1994): Effect of sucralfate on absorption of norfloxacin and ofloxacin. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 38:248-251.
- (50) SHIBA, K., YOSHIDA, M., KACHI, M., SHIMADA, J., SAITO, A., SAKAI, N. (1991): Effects of peptic ulcer-healing drugs on the pharmacokinetics of new quinolone. 17<sup>th</sup> Int. Congr. Chemother. Berlin. 415.
- (51) AMBRE, J.J., FISCHER, L.J. (1973): Effect of coadministration of aluminium and magnesium hydroxides on absorption of anticoagulants in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 12:231.
- (52) AKERS, M.A., LACH, J.L., FISCHER, L.J. (1973): Alteration in the absorption of bishydroxycoumarin by various excipient materials. *J. Pharm. Sci.* 62:391.
- (53) NIMMO, J., HEADING, R.C., TOTHILL, P., PRESCOTT, L.F. (1973): Pharmacological modification of gastric emptying: effects of propantheline and metoclopramide on paracetamol absorption. *Br. Med. J.* 1:587.
- (54) BATEMAN, D.N. (1986): The action of cisapride on gastric emptying and the pharmacodynamics and pharmacokinetics of oral diazepam. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 30:205-208.
- (55) KUROSA, T., YASHIHARA, Y., NAKAMURA, H., ASUMI, T., INATONE, T., FUKUZAKI, H., TAKANASHI, H., YOGO, K., AKIMA, M. (1992): Effects of cisapride on gastrointestinal motor activity and gastric emptying of disopyramide. *J. Pharmacobio. Dyn.* 15:395-402.

- (56) TOTTER, T.N., ROBWOOTHAM, D.J., WINDRAM, I., MUSHAMBI, M.C. (1991): Effect of sublingual buprenorphine on gastric emptying of a liquid meal. *Br. J. Anaesth.* 67:748-750.
- (57) NIMMO, W.S., HEADING, R.C., WILSON, J. (1975): Inhibition of gastric emptying and drug absorption by narcotic analgesics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2:509-513.
- (58) NAHUM, M.P., BEN ARUSH, M.W., ROBINSON, E. (1990): Reduced plasma carbamazepine level during chemotherapy in a child with malignant lymphoma. *Acta Paed. Scand.* 79:873-875.
- (59) NEEF, C., DE VOOGD-VAN DER STRAATEN, I. (1988): An interaction between cytostatic and anticonvulsivant drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* 43:372-375.
- (60) GIBALDI, M., PERRIER, D. (1982). Pharmacokinetics. 2nd edition. Marcel Dekker, Inc. New York.
- (61) LA DU, B.N., MANDEL, H.G., WAY, E.L. (1981). Fundamentals of drug metabolism and drug disposition. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- (62) OIE, S., LEVY, G. (1979): Effect of sulfixoxazole on pharmacokinetics of free and plasma protein-bound bilirubin in experimental unconjugated hyperbilirubinemia. *J. Pharm. Sci.* 68(1):6-8.
- (63) SZITA, M., GACHÁLYI, B., TORNYOSSY, M., KÁLDOR, A. (1990): Interaction of phenylbutazone and tolbutamide in man. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 18:378-380.
- (64) SPEDERS, S. (1993): Mofebutazon-Prüfung einer möglichen Interaktion mit Glibenclamid. *Fortschritte der Medizin.* 111:366-368.
- (65) LEWIS, R.J., TRAGER, W.F., CHAN, K.K., BRECKENRIDGE, A., ORME, M., ROWLAND, M., SCHARY, W. (1974): Warfarin stereochemical aspects of its metabolism and the interaction with phenylbutazone. *J. Clin. Invest.* 53:1607.
- (66) O'REILLY, R.A. (1973): The binding of sodium warfarin to plasma albumin and its displacement by phenylbutazone. *Ann. NY. Acad. Sci.* 226:293.
- (67) UDALL, J.A. (1974): Warfarin-chloral hydrate interaction. Pharmacological activity and significance. *Ann. Int. Med.* 81:341.
- (68) BRIDGMAN, J.F., ROSEN, S.M., THORP, J.M. (1972): Complications during clofibrate treatment of nephritic syndrome hyperlipoproteinaemia. *Lancet.* ii: 506.
- (69) MAY, T.W., RAMBECK, B., NORTHBAUM, N. (1991): Nomogram for the prediction of unbound phenytoin concentrations in patients on a combined treatment of phenytoin and valproic acid. *Eur. Neurol.* 31:57-60.
- (70) SACKELLARES, J.C., SATO, S., DREIFUSS, F.E., PENRY, J.K. (1981): Reduction of steady-state valproate levels by other antiepileptic drugs. *Epilepsia* 22:437-441.
- (71) WALLACE, S.M., VERBEECK, R.K. (1987): Plasma protein binding of drugs in the elderly. *Clin. Pharmacokin.* 12:41-72.

- (72) TILLEMENT, J.P., LHOSTE, F., GIUDICELLI, J.F. (1978): Diseases and drug protein binding. *Clin. Pharmacokin.* 3::144-154.
- (73) GUGLER, R., AZARNOFF, D.L. (1976): Drug protein binding and the nephrotic syndrome. *Clin. Pharmacokin.* 1:25-35.



Anal. Real Acad. Nac. Farm. 2002, 68:

—————Artículo Original—————

## **Señalización diferencial de la insulina en el desarrollo del músculo esquelético \***

RUBEN CONEJO Y MARGARITA LORENZO

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. 28040-Madrid.*

### **RESUMEN**

En músculo esquelético, la expresión de proteínas codificadas por oncogenes virales y celulares, donde se incluyen ciertas tirosina quinasas (v-src), ciertos factores de transcripción (myc, fos, jun) y formas activas de mediadores de las rutas de señalización acopladas a las proteínas G (H-ras, N-ras), inhiben el proceso de diferenciación muscular. En la línea celular C2C12 transformada con Ras activo no se produce la activación de las rutas PI3 quinasa/Akt/p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa, necesarias para la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B durante el proceso de diferenciación muscular. Además presenta una elevada actividad de p44/p42 MAP quinasa y del factor de transcripción AP-1, lo que impide la parada del ciclo celular. Esto hace que fracase el proceso de diferenciación muscular (no se produce la activación de la Creatina quinasa, la expresión de la Caveolina 3 y la formación de miotubos multinucleados). El tratamiento de esta línea celular, transformada por v-ras, con el PD098058, inhibidor de MEK-1, produce la parada del ciclo celular necesaria para el proceso de diferenciación muscular, pero provoca un efecto apoptótico que impide que los mioblastos diferencien. La adición de insulina junto con PD098058 impide dicho efecto apoptótico, se produce la parada del ciclo celular, se induce la activación de las rutas PI3 quinasa/Akt/p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa, que llevan a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y se produce la formación de miotubos multinucleados. Al igual que en el proceso de diferenciación

---

\* Premio FAES de la Real Academia de Farmacia. Año 2001

de la línea celular C2C12, la activación de las rutas de la PI3 quinasa y de p38 MAP quinasa es necesaria para la miogénesis de la línea celular transformada por v-ras, como hemos observado mediante el uso de inhibidores específicos de ambas rutas. Finalmente, una construcción constitutivamente activa de Akt (siempre en presencia de PD) es capaz de imitar a la insulina induciendo la miogénesis de la línea celular transformada por v-ras. Además en estas condiciones Akt constitutivamente activo induce las rutas p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa.

**Palabras clave:** desarrollo muscular-transformación por Ras-C2C12-insulina-NFκB

### Differential insulin signaling involved in skeletal muscle development

#### SUMMARY

v-H-ras transformed C2C12 (C2Ras) myoblasts, overexpressing p21-Ras protein in the Ras-GTP active form, showed a differentiation-defective phenotype when cultured in low serum as compared with C2C12 myoblasts. Accordingly, the purpose of the present study was to delineate the signaling pathways that restore C2Ras myoblasts differentiation. Inhibition of p42/p44-MAPK with the chemical inhibitor PD98059, and activation of AKT/P70S6K and p38-MAPK with insulin, produced growth arrest (precluding the expression of PCNA, cyclin-D1 and retinoblastoma at the hyperphosphorylated state and inducing the expression of the cell cycle inhibitor p21<sup>Cip</sup>) and myogenesis (multinucleated myotubes formation and induction of creatine kinase, caveolin-3 and  $\alpha$ -actin). Both events were accompanied by down-regulation of AP-1 and up-regulation of NF- $\kappa$ B transcriptional activities. Furthermore, inhibition of NF- $\kappa$ B transcriptional activity by the use of the proteasome inhibitor MG132 totally precluded differentiation by insulin+PD98059, demonstrating a direct role for NF- $\kappa$ B on C2Ras myogenesis. C2Ras myoblasts failed to restore differentiation when rapamycin or PD169316 were added in the presence of insulin+PD98059, indicating that the activation of both P70S6K and p38-MAPK was necessary to reach a fully differentiated phenotype. Finally, transient transfection of a constitutively active Myr-EGFP-AKT-HA construct (in the presence of PD98059) restored C2Ras myogenesis by its ability to activate P70S6K and p38-MAPK. A crosstalk between P70S6K and p38-MAPK was observed under rapamycin treatment in both insulin or active AKT induced myogenesis. Our results are delineating an AKT/P70S6K/p38-MAPK pathway involved in skeletal muscle differentiation.

**Key words:** muscle differentiation-Ras transformation-C2C12-Insulin-NFκB

## INTRODUCCION

El músculo estriado esquelético es el tejido más abundante en los vertebrados, en los que constituye la musculatura somática. Se inserta en los huesos para permitir el movimiento de las diversas partes del cuerpo. Está inervado por axones provenientes de las neuronas motoras del sistema cerebroespinal. Sus células, también llamadas fibras, son multinucleadas, extremadamente largas y dispuestas paralelamente unas a otras. El primer signo de desarrollo del músculo en la vida embrionaria es la aparición de células fusiformes mononucleadas, denominadas mioblastos, que sufren repetidas mitosis con gran rapidez. Existe una regulación coordinada de los procesos de proliferación y muerte celular programada durante el desarrollo embrionario. Durante este periodo se produce la apoptosis de células precursoras proliferativas limitando así el depósito de masa muscular durante el desarrollo. Finalmente, algunas de estas células dejan de dividirse, se hacen resistentes al proceso apoptótico y se funden entre sí constituyendo estructuras alargadas denominadas miotubos. A ellos continúan adhiriéndose mioblastos, dando lugar a tubos alargados multinucleados en los que poco a poco van apareciendo zonas estriadas, hasta que el miotubo se transforma en una fibra muscular [1].

La diferenciación muscular es un proceso altamente ordenado que se puede subdividir en cuatro etapas [2]. La primera es la entrada en la ruta de diferenciación muscular a través de la expresión de un factor de transcripción de la familia de los factores básicos miogénicos hélice-lazo-hélice (bHLH), la Miogenina. Además de la miogenina a esta familia de factores de transcripción pertenecen MyoD, Myf5 y MRF4. Cada uno de estos factores de transcripción, cuando son expresados ectópicamente mediante transfección, es capaz de activar la expresión de genes específicos de músculo esquelético y los genes de su propia familia en una amplia variedad de sistemas celulares no musculares.

Todos estos factores de la familia bHLH comparten un 80% de homología en su dominio básico hélice-lazo-hélice, que media los procesos de dimerización y unión al DNA de estos factores. Estos factores forman heterodímeros con proteínas ubicuas de estructura básica hélice-lazo-hélice, llamadas proteínas E. Estos heterodímeros se unen a la secuencia consenso, llamada caja E, de los promotores y enhancers de los genes específicos de músculo esquelético. Tanto MyoD, como Myf5 son expresados en mioblastos. MyoD ha sido implicado en la inducción de los primeros genes relacionados con la diferenciación muscular, como la miogenina y genes necesarios en la parada del ciclo celular que se produce en el proceso de diferenciación muscular, como Retinoblastoma, p21 y la ciclina D3. Es necesaria la presencia de la proteína p300, proteína coactivadora de la transcripción, para la inducción de estos primeros genes implicados en la diferenciación muscular por parte de MyoD.

La expresión de la Miogenina se produce con el comienzo del proceso de diferenciación muscular. Ratones con una mutación puntual en el gen de la miogenina son inmóviles y mueren perinatalmente debido a sus defectos en la diferenciación del músculo esquelético. La expresión del factor MRF4 se produce en las etapas finales del proceso de diferenciación muscular. Los factores de transcripción de la familia bHLH regulan la activación de algunos genes específicos de músculo esquelético de un modo directo, pero también, a través de la interacción con otros factores de transcripción, como son los factores de transcripción de la familia MEF2. También, estos factores son capaces de interactuar con genes y proteínas relacionadas con el control de la progresión del ciclo celular y señales de proliferación celular como retinoblastoma, p21 y c-jun. Los factores de transcripción de la subfamilia MEF2 pertenecen a la familia de los factores de transcripción con un dominio en su estructura denominado caja MADS [3]. Estos factores comparten un 80% de homología en este dominio. Junto a este dominio se encuentra el denominado dominio MEF2, importante para la orientación de unión al DNA y en la especificidad de dimerización de estos factores de la subfamilia MEF2. El dominio caja MADS de estos factores media los procesos de dimerización y de unión al DNA. Los miembros de la subfamilia MEF2 son capaces de

homo- y heterodimerizar, y así unirse a una secuencia consenso rica en nucleótidos de timina y adenina del DNA.

Durante el proceso de diferenciación muscular la expresión de los diferentes factores MEF2 se produce de forma secuencial. MEF2D se expresa en mioblastos; con el comienzo del proceso de diferenciación muscular se produce un aumento en la expresión de MEF2A mientras que MEF2C se expresa en las últimas etapas de la diferenciación muscular. Ambas familias son los factores de transcripción miogénicos mayoritariamente descritos [4], recientemente se ha relacionado la activación del factor NF- $\kappa$ B con el proceso de diferenciación muscular. Rel/NF- $\kappa$ B es una familia de factores de transcripción expresados ubicuamente y que juegan un importante papel en la inducción de muchos genes celulares y virales. En la mayoría de las células las proteínas Rel/NF- $\kappa$ B están retenidas en el citoplasma en una forma inactiva por asociación con proteínas inhibitoras denominadas I $\kappa$ B. Después de la estimulación NF- $\kappa$ B es liberado de su unión a I $\kappa$ B y se transloca al núcleo donde se une a regiones específicas del DNA (sitios  $\kappa$ B) regulando la actividad transcripcional de los genes diana. La familia Rel/NF- $\kappa$ B presenta un dominio de homología Rel en la región amino-terminal que incluye los dominios de unión al DNA y de dimerización y la señal de localización nuclear, que es el sitio más probable de unión a I $\kappa$ B [5]. Esta familia ha sido dividida en dos grupos, de acuerdo con las diferencias detectadas en su estructura, función y vías de síntesis. El primer grupo está formado por las proteínas p50 y p52, las cuales son sintetizadas como proteínas precursoras p105 y p100, respectivamente. La región carboxi-terminal de p105 y p100 se asemeja a la molécula inhibitora I $\kappa$ B ya que contiene repeticiones de anquirina que impiden su translocación al núcleo y su unión a los sitios  $\kappa$ B. La generación de las formas maduras p50 y p52 tiene lugar mediante procesamiento proteolítico. El segundo grupo de proteínas Rel incluye p65 (RelA), c-Rel, Rel B y las proteínas Dorsal y Dif de *Drosophila*, las cuales no son sintetizadas como precursores y, a diferencia de p50 y p52, poseen un dominio de activación transcripcional en el extremo carboxi-terminal. La mayoría de los miembros de ambos grupos pueden formar homo o heterodímeros excepto Rel B, el cual únicamente forma dímeros con p50 y p52.

La segunda etapa es la parada del ciclo celular de los mioblastos, el ciclo celular consiste en duplicar la información genética de una célula, y una vez duplicada, repartirla con una precisión absoluta, generando dos células hijas idénticas a la progenitora. El ciclo celular consta de cuatro fases:  $G_1$ , S,  $G_2$ , M. La duplicación del DNA ocurre durante la fase S, y su reparto equitativo en dos durante la mitosis o fase M. Antes de que la célula inicie la fase S, existe un periodo de tiempo necesario para sintetizar todas las moléculas que se requieren durante la síntesis de DNA, y que se denomina fase  $G_1$ ; del mismo modo, existe otro intervalo antes de la fase M, conocido como fase  $G_2$ , en el que la célula se prepara para la iniciación de la mitosis. En las células que se encuentran en proliferación estas cuatro fases se suceden de forma continua y ordenada, sujetas a un estricto control molecular. Cuando la señal proliferativa cesa, la célula para su ciclo de división, normalmente en  $G_1$  antes de duplicar nuevamente su DNA, y entra en un periodo de quiescencia o fase  $G_0$ , que corresponde a un estado de célula en reposo.

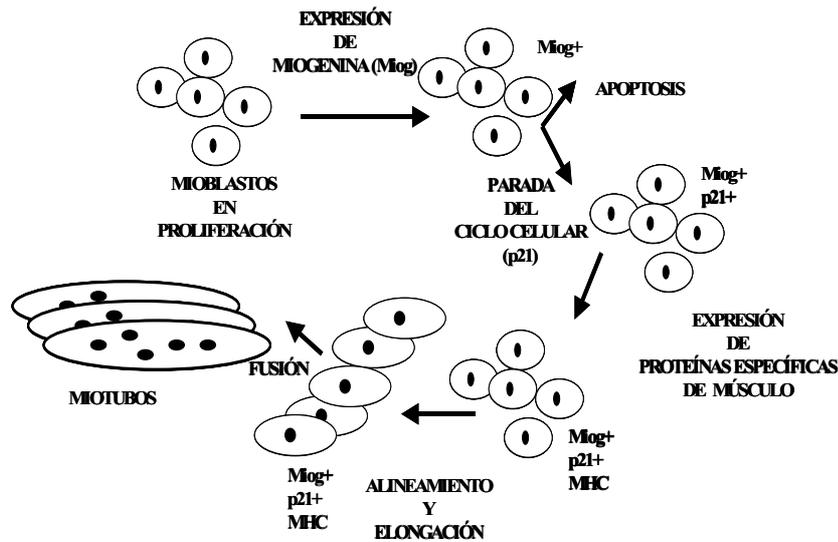
Para la progresión a través del ciclo celular se necesita la asociación entre unas proteínas quinasas conocidas como CDK (Quinasas Dependientes de Ciclinas) y sus subunidades reguladoras, las ciclinas. Las CDKs, además de estar reguladas por su unión a las ciclinas, lo están por distintas fosforilaciones y por la asociación de proteínas inhibitoras (CIPs). Hasta el momento se han descrito ocho CDKs (CDK1-CDK 8) y ocho ciclinas (ciclina A-H), pero sólo unas cuantas combinaciones juegan un papel en la regulación del ciclo celular. Cuando las células quiescentes son estimuladas a proliferar, la primera ciclina que se sintetiza es la ciclina D. La diana principal de la ciclina D es el producto del gen del retinoblastoma. La ciclina E se expresa periódicamente al final de la fase  $G_1$  y forma complejos preferencialmente con CDK 2. La ciclina A se asocia también a CDK 2 y es activa en las fases S y  $G_2$ . Durante la mitosis, ciclinas y CDC2 (una CDK) parecen reorganizar la maquinaria celular durante la mitosis. Durante el proceso de diferenciación muscular se produce una caída en la expresión de las ciclinas D1, A, B2 y C y la quinasa dependiente de ciclina de tipo 2. Sin embargo, un aumento en los niveles de expresión de la ciclina D3 se ha descrito durante la diferenciación muscular. También

un aumento en la expresión de p18 y p21, inhibidores de las CDKs ha sido relacionado con el proceso de diferenciación muscular.

El aumento de la forma activa (hipofosforilada) de la proteína retinoblastoma también se produce durante el proceso de diferenciación muscular. Líneas celulares deficientes en retinoblastoma expresan niveles normales de Miogenina y de p21, pero expresan niveles reducidos de la cadena pesada de la Miosina y de la Creatina quinasa. También, ratones transgénicos que expresan bajos niveles de retinoblastoma sufren un gran proceso apoptótico y presentan defectos en la parada del ciclo celular, en la expresión de genes específicos de músculo, en la fusión y en la aparición de miotubos multinucleados.

En la tercera etapa numerosas proteínas son inducidas durante la diferenciación muscular. Dentro de estas proteínas se incluyen los componentes del aparato contráctil del músculo como la  $\alpha$  Actina, la proteína C, la Miomesina, la Miosina, la Tropomiosina y la Troponina, las enzimas metabólicas y proteínas de membrana. Una de las enzimas más importantes en músculo es la Creatina quinasa, enzima implicada en la obtención de energía (ATP) para la contracción muscular. Se han descrito tres isoformas de dicha enzima: la isoforma muscular (M-CK), la isoforma del cerebro (B-CK) y la isoforma mitocondrial (Mt-CK). Normalmente, estas isoformas citoplasmáticas, la isoforma M-CK y la isoforma B-CK, se encuentran formando homo- o heterodímeros. Durante el desarrollo embrionario y en cultivos miogénicos se produce el intercambio del homodímero BB-CK por el homodímero MM-CK y un aumento en la actividad enzimática de la Creatina quinasa total. La Caveolina 3 es una proteína de la membrana plasmática cuya expresión se induce durante el proceso de diferenciación muscular [6]. Esta proteína forma parte de una serie de invaginaciones ricas en glicoesfingolípidos de la membrana plasmática celular. Se ha relacionado a la Caveolina 3 con la biogénesis del sistema de túbulos T que se produce durante el proceso de diferenciación del músculo esquelético. También interacciona con el complejo distrofina-glicoproteína, creando una unión entre la matriz extracelular, la membrana y la actina del citoplasma celular; la alteración de este complejo puede dar lugar a la aparición de distrofia muscular [7]. Posteriormente las célu-

las se alinean y elongan y finalmente se fusionan y forman los miotubos multinucleados (Figura 1).



**Figura 1.-** Etapas del proceso de diferenciación muscular

El citoesqueleto de actina juega un papel importante en la regulación de los efectos proliferativos y de diferenciación muscular, ya que los lamelipodios de membrana podrían facilitar los contactos célula-célula y la localización de proteínas específicas de membrana del músculo esquelético. La formación de lamelipodios en la membrana plasmática celular es debida a una reorganización dinámica del citoesqueleto de actina. Dicho efecto se ha podido observar tanto en músculo como en tejido adiposo en respuesta a insulina. Una vez formados rápidamente se distribuyen a lo largo de la membrana plasmática formando ondas.

La mayoría de los factores de crecimiento y la expresión de proteínas derivadas de oncogenes virales o celulares estimulan la

proliferación e inhiben la diferenciación muscular. Sin embargo la familia de la insulina y los factores de crecimiento insulínicos de tipo I y II (IGFs) estimulan ambos procesos. Esta familia ha sido involucrada en el control del desarrollo fetal y/o post-natal aunque la acción biológica fundamental de la insulina es el control de la homeostasis glucídica. La insulina y los IGFs realizan esta amplia variedad de funciones a través de la unión a su receptor específico de superficie, que pertenece a la amplia familia de receptores con actividad tirosina quinasa. Tras la unión del ligando se produce una activación de la actividad tirosina quinasa del receptor, que conduce a la autofosforilación en residuos de tirosina de las subunidades  $\beta$  del mismo y a la fosforilación de otros sustratos. Entre los sustratos con los que interacciona el receptor de insulina fosforilado, los sustratos para el receptor de la insulina (IRSs) y Shc son los que mejor se han caracterizado. Dos rutas principales se han identificado, la primera es la ruta de p21-Ras a partir de la unión de los IRSs o Shc con Grb2, que a través de sus dominios SH3, se une a Sos, proteína intercambiadora de nucleótidos capaz de activar Ras por aumentar la velocidad de intercambio de GTP por GDP. La proteína Ras está codificada por una serie de genes (H-, K- y N-ras) y se encuentra anclada por farnesilación a la cara interna de la membrana plasmática. La proteína Ras tiene actividad GTPásica intrínseca para hidrolizar el GTP a GDP inactivándose. Sin embargo, esta actividad GTPásica intrínseca resulta dependiente de una proteína de 120 kDa llamada Ras GAP. La pérdida de la actividad GTPásica intrínseca de Ras por una mutación puntual en el codón 12, 13 ó 61 produce una proteína Ras permanentemente activa y altamente oncogénica, que está implicada en muchos tumores humanos. La cascada de señalización por debajo de Ras implica a una familia de serina/treonina quinasas denominada Raf-1. Una vez activada, Raf-1 quinasa es capaz de fosforilar y activar a MEK (también conocida como MAP quinasa quinasa, MAPKK o MAPKK1/2) que una vez activado es capaz de fosforilar y activar a las p44 y p42 MAP quinasas.

La segunda es la ruta PI3 quinasa que se origina a partir de la unión de los IRSs con la subunidad reguladora, p85, de PI3 quinasa. La PI3 quinasa es una enzima heterodimérica compuesta por una subunidad reguladora, de un peso molecular de 85kDa, y una subunidad catalítica de 110 kDa de peso molecular. La PI3 quinasa cataliza la fosforilación de

lípidos en la posición D3 del anillo del inositol. Otro mecanismo de regulación de PI3 quinasa es a través de la interacción de Ras con la subunidad catalítica de la PI3 quinasa. Por debajo de PI3 quinasa existe unas serina-treonina quinasas denominadas PDK-1 y PDK-2 encargadas de la fosforilación y activación de la PKB, también denominada Akt. PKB (Akt) una vez activada presenta numerosas dianas de acción como la glucógeno sintasa quinasa 3, la fosfodiesterasa 3D, la proteína diana de Rapamicina en mamíferos (mTOR), el IRS-1 y la proteína p70S6 quinasa. La regulación de la actividad de p70S6 quinasa es compleja y en ella interviene tanto PDK-1 como Akt y mTOR [8].

Unas nuevas vías de señalización, reguladas por la familia de las Rho GTPasas (Rho, Rac y Cdc42), han sido identificadas. Las Rho GTPasas regulan la actividad de ciertas serina/treonina quinasas, como la p38 MAP quinasa. Ha sido descrita la regulación de las Rho GTPasas por parte de PI3 quinasa y de Ras [9]. Por debajo de las Rho GTPasas se encuentra una familia de quinasas activadas por p21 (PAKs) que finalmente llevan a la activación de p38 MAP quinasa.

Existe controversia en el conocimiento de las rutas de señalización por las que transcurren los diferentes efectos de la insulina y los IGFs en el músculo esquelético, por ellos nos hemos planteado en esta trabajo caracterizar la señalización implicada en los procesos de proliferación, supervivencia y diferenciación que tienen lugar en la línea de células musculares de ratón C2C12. Otro de los aspectos que nos han interesado ha sido estudiar como afecta transformación por proteínas oncogénicas, como v-ras, el proceso de diferenciación miogénico.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En primer lugar hemos estudiado los diferentes efectos de la insulina en los mioblastos de la línea celular C2C12. Observamos que la línea celular C2C12 presentaba un alto número de receptores de insulina por célula ( $89700 \pm 11500$ ) con una alta afinidad ( $K_d = 15,3 \pm 2,0$  nM). El número de receptores por célula para insulina es mayor que para IGF-I ( $45700 \pm 8200$ ). Además las células tratadas con insulina mostraron un

marcado aumento de la fosforilación en tirosina de la cadena  $\beta$  del receptor de insulina comparando con células no tratadas, y no fosforilaban en tirosina la cadena  $\beta$  del receptor de IGF-I. Estos datos indican que la insulina actúa a través de su propio receptor en esta línea celular. Posteriormente analizamos la funcionalidad de los sustratos del receptor de insulina; Shc, IRS-1 e IRS-2. La insulina no aumenta la fosforilación de Shc. Sin embargo, un leve aumento en la asociación entre Shc e IRS-1 se produjo tras el tratamiento con insulina. Este resultado está en concordancia con lo descrito por otros autores [10]. También, el tratamiento con insulina aumenta la fosforilación, la actividad y la asociación de PI3 quinasa con los IRSs siendo mayor el efecto sobre el IRS-1 frente al IRS-2 (5 veces y 2 veces de aumento, respectivamente). Esto nos demostraba que el IRS-1 es el principal sustrato en la ruta de señalización de la insulina en nuestra línea celular, de acuerdo con los resultados descritos en músculo por otros autores [11]. Estos resultados están en concordancia con los publicados en tejido adiposo blanco y en la línea de fibroblastos 3T3-L1 donde no se observa ninguna fosforilación del IRS-2 en respuesta a insulina [12]. Sin embargo en otros sistemas celulares, como el tejido adiposo marrón, tanto IRS-1, como IRS-2 y Shc intervienen en las diferentes vías de señalización de la insulina [13], mientras que IRS-2 es el principal sustrato en el tejido hepático y en la célula  $\beta$  [11].

Existen dos rutas principales de señalización para el receptor de insulina, la ruta PI3 quinasa y la ruta Ras/MAP quinasa, a través de las cuales la insulina ejecuta una amplia variedad de sus funciones biológicas. Nuestros resultados nos indican que un tratamiento a corto plazo con insulina, de la línea muscular C2C12, activa rápidamente al menos tres rutas de señalización independientes: PI3 quinasa/Akt/p70S6 quinasa, p44/p42 MAP quinasa y p38 MAP quinasa [14].

A diferencia del resto de factores de crecimiento, insulina e IGFs han sido implicados en el control del crecimiento y diferenciación del músculo esquelético. En un tratamiento a corto plazo de los mioblastos con insulina o IGF-I, se produce una respuesta proliferativa a la vez que se produce un retardo en el inicio de la diferenciación muscular. Estos efectos tempranos de insulina e IGF-I están asociados con una marcada inhibición de la expresión de la Miogenina y de MRF4, mantenimiento de

la forma fosforilada de Retinoblastoma y la expresión de los componentes del holoenzima responsable de la fosforilación de Retinoblastoma, ciclina D1 y la CDK4 [15] [16], [17]. Nosotros hemos observado que la insulina induce la proliferación de la línea celular C2C12 (mediante el estudio del ciclo celular, la síntesis de DNA y la expresión de las proteínas PCNA y ciclina D1) a través de dos vías independientes, pero que actúan sinérgicamente: PI3 quinasa/p70S6 quinasa y p44/p42 MAP quinasa. A través de los resultados obtenidos hemos dado una gran importancia a la activación de la p70S6 quinasa en la proliferación inducida por insulina, en contra de la ausencia de efecto de la Rapamicina descrita en otras líneas celulares de músculo esquelético [18]. Otros autores señalan que la Rapamicina induce la parada del ciclo celular, así como una disminución en los niveles de la ciclina A y de la actividad de la quinasa asociada a la ciclina A, CDC2, en la línea muscular BC3H1. También hemos observado la importancia de PI3 quinasa en dicho efecto proliferativo de la insulina, tal vez por su activación de p70S6 quinasa. La implicación de la ruta p44/p42 MAP quinasa en el efecto mitogénico de la insulina también ha sido descrito en la línea celular de músculo esquelético L6A1 [19]. Además este efecto mitogénico de la insulina fue muy similar al producido por el IGF-I.

Existe una regulación coordinada de los procesos de proliferación y muerte celular programada durante el desarrollo embrionario. Durante este periodo se produce la apoptosis de células precursoras proliferativas y no de las células ya diferenciadas, limitando así, el depósito de masa muscular durante el desarrollo [20]. El proceso apoptótico tiene lugar *in vitro* en mioblastos cultivados en medio de diferenciación, con un bajo porcentaje de mitógenos. Durante el proceso de diferenciación una amplia fracción de mioblastos es perdida por apoptosis [21] sin embargo, los miotubos multinucleados (células diferenciadas) son resistentes al proceso apoptótico [22]. En la línea celular C2C12, el tratamiento con insulina durante 24 horas disminuye el porcentaje de células hipodiploides y la fragmentación del DNA extranuclear a niveles similares a los obtenidos en los mioblastos cultivados en medio suplementado con un 10% de suero fetal, resultados similares se han obtenido en fibroblastos, en las células PC-12 y en adipocitos [23], [24]. El tratamiento con LY o

con el ML-9 inhibe el efecto antiapoptótico de la insulina. Estos datos nos indican que la insulina utiliza la ruta PI3 quinasa/Akt como ruta de supervivencia [14]. La proteína Akt se ha descrito como una quinasa que fosforila e inactiva a la proteína proapoptótica Bad [25] [26] así como bloquea la activación de la Caspasa-9 [27]. También se ha observado un papel positivo de Akt en la supervivencia de miocitos diferenciados [28].

La organización del citoesqueleto de actina es un importante regulador de los efectos de la insulina, tanto en proliferación celular, metabolismo y diferenciación celular [29]. Es importante el papel que juega el citoesqueleto de actina en la regulación de los efectos proliferativos de la insulina, como son la síntesis de DNA y la expresión de genes tempranos. Nosotros hemos estudiado el efecto de la insulina en la organización del citoesqueleto de actina en la línea celular C2C12 y hemos observado que la insulina induce la ruptura de las fibras de estrés (50% de reducción) y la aparición de lamelipodios en la membrana plasmática de las células (4 veces más frente a las células control). Un efecto similar de la insulina ha sido observado en fibroblastos, adipocitos y mioblastos de la línea celular L6 [30], [31]. En estos sistemas el efecto de la insulina depende de la activación de la ruta PI3 quinasa/Rac [9]. Sin embargo, la insulina induce la formación de lamelipodios de membrana en la línea celular C2C12 a través de la activación de la ruta p38 MAP quinasa [14]. Esta ruta de señalización que modula los cambios en el citoesqueleto no parece que guarde relación con el patrón de proliferación celular descrito anteriormente, sin embargo estos lamelipodios de membrana podrían facilitar los contactos célula-célula y la localización de proteínas específicas de membrana del músculo esquelético como la Caveolina 3, proteína indispensable para la fusión y formación de miotubos multinucleados. En este sentido, la activación de p38 MAP quinasa si está implicada en este proceso como ha sido demostrado por algunos autores [6]. Se ha descrito que la activación por insulina de la ruta MAKAP-quinasa 2/Hsp 27 modula la polimerización de la F-actina [32], también el PDGF induce la formación de lamelipodios de membrana en células endoteliales a través de la activación de la p38 MAP quinasa [33].

El primer signo de desarrollo del músculo en la vida embrionaria es la aparición mioblastos que finalmente dejan de dividirse y se funden

entre sí constituyendo estructuras alargadas denominadas miotubos. Nosotros hemos observado que la insulina induce la diferenciación de la línea celular C2C12 (mediante el estudio de la actividad de la enzima Creatina quinasa, la expresión de la Caveolina 3 y observando la formación de miotubos multinucleados) y que en este proceso esta implicada la estimulación de la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la represión de la actividad del factor AP-1 [34]. La actividad de unión al DNA de NF- $\kappa$ B ha sido recientemente relacionada con la diferenciación muscular inducida por IGF-II, [35], sin embargo nuestros resultados con AP-1 contrastan con los obtenidos en adipocitos marrones, donde se ha implicado a AP-1 en la diferenciación adipogénica, [36].

Existe mucha controversia en el conocimiento de la ruta de señalización implicada en la miogénesis, nosotros hemos observado que la insulina induce el proceso de diferenciación muscular a través de la activación de las rutas PI3 quinasa/Akt/p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa, y la inhibición de la ruta p44/p42 MAP quinasa [34]. También a partir de nuestros resultados nos han hecho pensar en un posible cruce entre las rutas de señalización, que solamente se produce a través de un tratamiento crónico de las células con insulina, y no en un tratamiento agudo. Estos resultados están en concordancia con los descritos en músculo por algunos autores [37]. Este cruce podría ser explicado por la activación de la p38 MAP quinasa a través de la ruta PI3 quinasa/p21Rac[9]. Los resultados obtenidos nos llevan a proponer el siguiente esquema de señalización en la línea celular C2C12 (Figura 2).

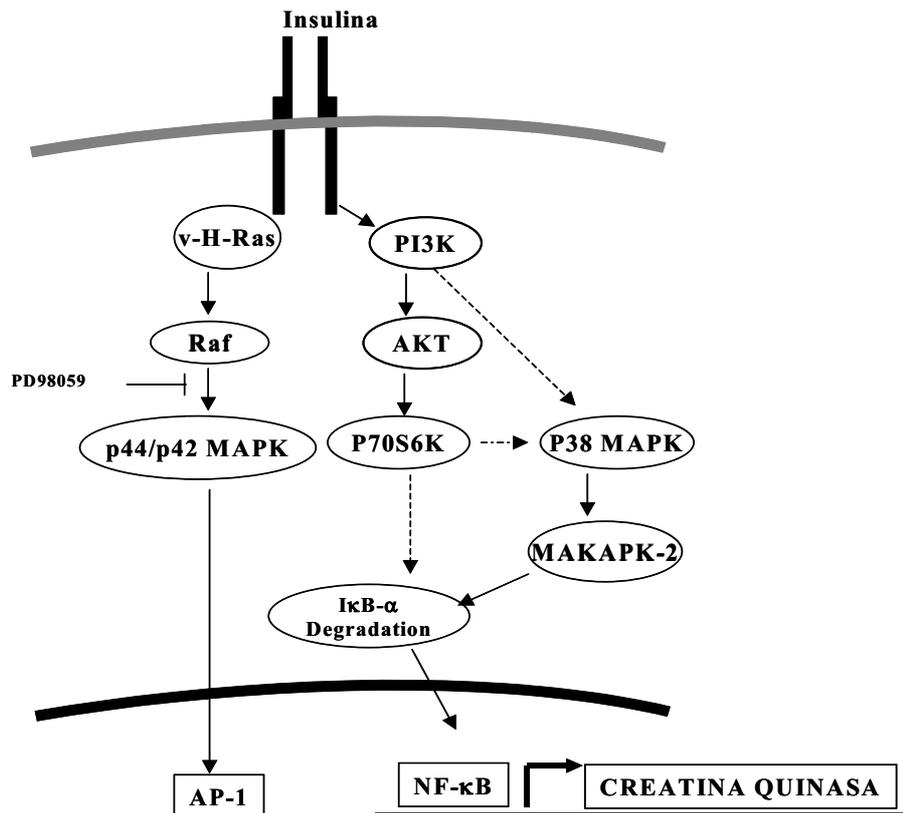
En músculo esquelético, la expresión de proteínas codificadas por oncogenes virales y celulares, donde se incluyen ciertas tirosina quinasas (v-src), ciertos factores de transcripción (myc, fos, jun) y formas activas de mediadores de las rutas de señalización acopladas a las proteínas G (H-ras, N-ras), inhiben el proceso de diferenciación muscular [38] [39] [40]. La inhibición del proceso de diferenciación muscular producida por

Ras oncogénico podría estar ligada a una inhibición de la parada del ciclo celular. La ruta de señalización utilizada por Ras para inhibir el proceso de diferenciación muscular está siendo clarificada, aunque sigue habiendo algún punto de controversia. Ras activa al menos tres clases de efectores, Raf (A-Raf, B-Raf y Raf-1), Ral-GEF (Ral-GDS, Rlf y Rgl) y PI3 quinasa [41]. Ha sido descrito que la expresión de un mutante activo de Raf (Raf-CAAX) y de Ral-GDS (Ral-GDS CAAX) inhiben la formación de miotubos multinucleados y la expresión de genes específicos de músculo [42] [43]. En cuanto al tercer efector de Ras, la activación de la ruta PI3 quinasa/Akt ha sido implicada en el proceso de diferenciación muscular [44]. Incluso la expresión de un mutante activo de R-Ras, una proteína de bajo peso molecular y de unión al GTP que comparte un 50 % de homología con las diferentes isoformas de Ras [45], induce el proceso de diferenciación muscular en la línea celular C2C12 a través de la activación de la ruta PI3 quinasa/Akt [46].

Nosotros hemos querido estudiar el efecto de la transformación con Ras oncogénico sobre la diferenciación de la línea de células musculares C2C12. En la línea celular C2C12 transformada con Ras activo no se produce la activación de las rutas PI3 quinasa/Akt/p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa, necesarias para la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B durante el proceso de diferenciación muscular. Además presenta una elevada actividad de p44/p42 MAP quinasa y del factor de transcripción AP-1, lo que impide la parada del ciclo celular. Esto hace que fracase el proceso de diferenciación muscular (no se produce la activación de la Creatina quinasa, la expresión de la Caveolina 3 y la formación de miotubos multinucleados) [47].

El tratamiento de esta línea celular, transformada por v-ras, con el PD098058, inhibidor de MEK-1, produce la parada del ciclo celular necesaria para el proceso de diferenciación muscular, pero provoca un efecto apoptótico que impide que los mioblastos diferencien. La adición de insulina junto con PD098058 impide dicho efecto apoptótico, se produce la parada del ciclo celular, se induce la activación de las rutas PI3 quinasa/Akt/p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa, que llevan a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y se produce la formación de miotubos multinucleados [47]. Al igual que en el proceso de diferenciación

de la línea celular C2C12, la activación de las rutas de la PI3 quinasa y de p38 MAP quinasa es necesaria para la miogénesis de la línea celular transformada por v-ras, como hemos observado mediante el uso de inhibidores específicos de ambas rutas. Finalmente, una construcción constitutivamente activa de Akt (siempre en presencia de PD) es capaz de imitar a la insulina induciendo la miogénesis de la línea celular transformada por v-ras. Además en estas condiciones Akt constitutivamente activo induce las rutas p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa. Recientemente se ha descrito la regulación de la actividad de NF- $\kappa$ B por Akt a través de la activación de p38 MAP quinasa [47]. Por lo tanto, estos resultados sugieren una nueva vía de activación de p38 MAP quinasa mediada por Akt y/o p70S6 quinasa, aunque no podemos descartar que la insulina, a través de otras rutas, pueda también activar a p38 MAP quinasa. Estos resultados nos llevan a proponer el siguiente esquema.



**Figura 3.-** Rutas que llevan a la miogénesis en la línea celular C2C12 transformada por v-Ras.

En función de estos resultados podemos destacar que tanto la proliferación como la diferenciación muscular no pueden ser considerados como eventos independientes. Al contrario, en este trabajo hemos podido

observar que durante el desarrollo embrionario del músculo esquelético existe una relación coordinada en el tiempo de los procesos de proliferación, movilidad, supervivencia y diferenciación muscular a través de diferentes rutas de señalización. Además hemos encontrado un posible mecanismo para revertir el efecto de la expresión de una forma activa, forma oncogénica, de la proteína Ras sobre el proceso de diferenciación muscular. Se ha descrito que en diversos tumores humanos, como en las células de Rhabdomiosarcoma (tumores de músculo esquelético) son expresadas selectivamente formas mutadas activas de los tres genes ras (H-, K- y N-ras). Para finalizar, muy recientemente se ha descrito que el tratamiento con Cerivastatina, un inhibidor de la síntesis del colesterol, produce Rhabdomiolisis. En este efecto está implicado un proceso apoptótico de las fibras musculares, por eso creemos que es importante el papel que hemos demostrado de la proteína Akt como mecanismo de supervivencia de células musculares.

**AGRADECIMIENTOS.** Este trabajo se ha realizado con la ayuda de proyectos del Ministerio de Ciencia y Tecnología; PM98/0082 y Comunidad de Madrid; 08.6/0043/2000.1 Rubén Conejo ha disfrutado de una beca de FPU del Ministerio de Educación y Cultura.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) MOLKENTIN, J.D. AND OLSON, E.N. (1996) Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6:445-453.
- (2) ANDRES, V. AND WALSH, K. (1996) Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J. Cell. Biol.* 132:657-666.
- (3) MOLKENTIN, J.D. AND OLSON, E.N. (1996) Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9366-9373.

- (4) MOLKENTIN, J.D., BLACK, B.L., MARTIN, J.F. AND OLSON, E.N. (1995) Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 83:1125-1136.
- (5) THANOS, D. AND MANIATIS, T. (1995) NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 80:529-532.
- (6) GALBIATI, F., VOLONTE, D., ENGELMAN, J.A., SCHERER, P.E. AND LISANTI, M.P. (1999) Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. Transient activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for induction of caveolin-3 expression and subsequent myotube formation. *J. Biol. Chem.* 274:30315-30321.
- (7) CAMPBELL, K.P. (1995) Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80:675-679.
- (8) VIRKAMAKI, A., UEKI, K. AND KAHN, C.R. (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 103:931-943.
- (9) TANG, Y., YU, J. AND FIELD, J. (1999) Signals from the Ras, Rac, and Rho GTPases converge on the Pak protein kinase in Rat-1 fibroblasts. *Mol.Cell Biol.* 19:1881-1891.
- (10) KASUS-JACOBI, A., PERDEREAU, D., TARTARE-DECKERT, S., VAN OBERGHEN, E., GIRARD, J. AND BURNOL, A.F. (1997) Evidence for a direct interaction between insulin receptor substrate-1 and Shc. *J.Biol.Chem.* 272:17166-17170.
- (11) WITHERS, D.J. AND WHITE, M. (2000) Perspective: The insulin signaling system--a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology* 141:1917-1921.
- (12) SUN, X.J., PONS, S., WANG, L.M., ZHANG, Y., YENUSH, L., BURKS, D., MYERS, M.G., GLASHEEN, E., COPELAND, N.G., JENKINS, N.A., PIERCE, J.H. AND WHITE, M.F. (1997) The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action. *Mol Endocrinol* 11:251-262.
- (13) VALVERDE, A.M., TERUEL, T., NAVARRO, P., BENITO, M. AND LORENZO, M. (1998) Tumor necrosis factor-alpha causes insulin receptor substrate-2-mediated insulin resistance and inhibits insulin-induced adipogenesis in fetal brown adipocytes. *Endocrinology* 139:1229-1238.
- (14) CONEJO, R. AND LORENZO, M. (2001) Insulin signaling leading to proliferation, survival, and membrane ruffling in C2C12 myoblasts. *J. Cell. Physiol.* 187:96-108.

- (15) ROSENTHAL, S.M. AND CHENG, Z.Q. (1995) Opposing early and late effects of insulin-like growth factor I on differentiation and the cell cycle regulatory retinoblastoma protein in skeletal myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10307-10311.
- (16) D'MELLO, S.R., GALLI, C., CIOTTI, T. AND CALISSANO, P. (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10989-10993.
- (17) RESNICOFF, M., BURGAUD, J.L., ROTMAN, H.L., ABRAHAM, D. AND BASERGA, R. (1995) Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors. *Cancer Res.* 55:3739-3741.
- (18) CANICIO, J., GALLARDO, E., ILLA, I., TESTAR, X., PALACIN, M., ZORZANO, A. AND KALIMAN, P. (1998) p70 S6 kinase activation is not required for insulin-like growth factor-induced differentiation of rat, mouse, or human skeletal muscle cells. *Endocrinology* 139:5042-5049.
- (19) COOLICAN, S.A., SAMUEL, D.S., EWTON, D.Z., MCWADE, F.J. AND FLORINI, J.R. (1997) The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 272:6653-6662.
- (20) MCCLEARN, D., MEDVILLE, R. AND NODEN, D. (1995) Muscle cell death during the development of head and neck muscles in the chick embryo. *Dev. Dyn.* 202:365-377.
- (21) WANG, J. AND WALSH, K. (1996) Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science* 273:359-361.
- (22) WANG, J., GUO, K., WILLS, K.N. AND WALSH, K. (1997) Rb functions to inhibit apoptosis during myocyte differentiation. *Cancer Res.* 57:351-354.
- (23) NAVARRO, P., VALVERDE, A.M., BENITO, M. AND LORENZO, M. (1998) Insulin/IGF-I rescues immortalized brown adipocytes from apoptosis down-regulating Bcl-xS expression, in a PI 3-kinase- and map kinase-dependent manner. *Exp. Cell Res.* 243:213-221.
- (24) PARRIZAS, M., SALTIEL, A.R. AND LEROITH, D. (1997) Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* 272:154-161.
- (25) DATTA, S.R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y. AND GREENBERG, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.

- (26) DEL PESO, L., GONZALEZ-GARCIA, M., PAGE, C., HERRERA, R. AND NUNEZ, G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278:687-689.
- (27) KANDEL, E.S. AND HAY, N. (1999) The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253:210-229.
- (28) FUJIO, Y., GUO, K., MANO, T., MITSUUCHI, Y., TESTA, J.R. AND WALSH, K. (1999) Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of Akt, a positive modulator of myocyte survival. *Mol. Cell Biol.* 19:5073-5082.
- (29) BOHMER, R.M., SCHARF, E. AND ASSOIAN, R.K. (1996) Cytoskeletal integrity is required throughout the mitogen stimulation phase of the cell cycle and mediates the anchorage-dependent expression of cyclin D1. *Mol. Biol. Cell* 7:101-111.
- (30) CLODI, M., VOLLENWEIDER, P., KLARLUND, J., NAKASHIMA, N., MARTIN, S., CZECH, M.P. AND OLEFSKY, J.M. (1998) Effects of general receptor for phosphoinositides 1 on insulin and insulin-like growth factor I-induced cytoskeletal rearrangement, glucose transporter-4 translocation, and deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 139:4984-4990.
- (31) WANG, Q., SOMWAR, R., BILAN, P.J., LIU, Z., JIN, J., WOODGETT, J.R. AND KLIP, A. (1999) Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol. Cell Biol.* 19:4008-4018.
- (32) HUOT, J., HOULE, F., SPITZ, D.R. AND LANDRY, J. (1996) HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* 56:273-279.
- (33) MATSUMOTO, T., YOKOTE, K., TAMURA, K., TAKEMOTO, M., UENO, H., SAITO, Y. AND MORI, S. (1999) Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J.Biol.Chem.* 274:13954-13960.
- (34) CONEJO, R., VALVERDE, A.M., BENITO, M. AND LORENZO, M. (2001) Insulin produces myogenesis in C2C12 myoblasts by induction of NF-kappaB and down-regulation of AP-1 activities. *J. Cell. Physiol.* 186: 82-94.
- (35) KALIMAN, P., CANICIO, J., TESTAR, X., PALACIN, M. AND ZORZANO, A. (1999) Insulin-like growth factor-II, phosphatidylinositol 3-kinase, nuclear factor-kappaB and inducible nitric-oxide synthase define a common myogenic signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 274:17437-17444.
- (36) TERUEL, T., VALVERDE, A.M., NAVARRO, P., BENITO, M. AND LORENZO, M. (1998) Inhibition of PI 3-kinase and RAS blocks IGF-I and insulin-induced uncoupling protein 1 gene expression in brown adipocytes. *J.Cell. Physiol.* 176:99-109.

- (37) CUENDA, A. AND COHEN, P. (1999) Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *J. Biol. Chem.* 274:4341-4346.
- (38) FLORINI, J.R., EWTON, D.Z. AND MAGRI, K.A. (1991) Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. *Annu. Rev. Physiol.* 53:201-216.
- (39) OLSON, E.N. (1992) Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Dev. Biol.* 154:261-272.
- (40) ALEMA, S. AND TATO, F. (1994) Oncogenes and muscle differentiation: multiple mechanisms of interference. *Semin. Cancer Biol.* 5:147-156.
- (41) CAMPBELL, S.L., KHOSRAVI-FAR, R., ROSSMAN, K.L., CLARK, G.J. AND DER, C.J. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17:1395-1413.
- (42) RAMOCKI, M.B., JOHNSON, S.E., WHITE, M.A., ASHENDEL, C.L., KONIECZNY, S.F. AND TAPAROWSKY, E.J. (1997) Signaling through mitogen-activated protein kinase and Rac/Rho does not duplicate the effects of activated Ras on skeletal myogenesis. *Mol. Cell Biol.* 17:3547-3555.
- (43) RAMOCKI, M.B., WHITE, M.A., KONIECZNY, S.F. AND TAPAROWSKY, E.J. (1998) A role for RalGDS and a novel Ras effector in the Ras-mediated inhibition of skeletal myogenesis. *J. Biol. Chem.* 273:17696-17701.
- (44) JIANG, B.H., AOKI, M., ZHENG, J.Z., LI, J. AND VOGT, P.K. (1999) Myogenic signaling of phosphatidylinositol 3-kinase requires the serine-threonine kinase Akt/protein kinase B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2077-2081.
- (45) LOWE, D.G., CAPON, D.J., DELWART, E., SAKAGUCHI, A.Y., NAYLOR, S.L. AND GOEDDEL, D.V. (1987) Structure of the human and murine R-ras genes, novel genes closely related to ras proto-oncogenes. *Cell* 48:137-146.
- (46) SUZUKI, J., KAZIRO, Y. AND KOIDE, H. (2000) Positive regulation of skeletal myogenesis by R-Ras. *Oncogene* 19:1138-1146.
- (47) CONEJO, R., DE ALVARO, C., BENITO, M., CUADRADO, A. AND LORENZO, M. (2002) Insulin restores differentiation of Ras-transformed C2C12 myoblasts by induction of NF-kappaB through an AKT/P70S6K/P38-MAPK pathway. *Oncogene* "in press".
- (48) MADRID, L.V., MAYO, M.W., REUTHER, J.Y. AND BALDWIN, A.S. (2001) Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF- $\kappa$ B through utilization of the I $\kappa$ B kinase and activation of the mitogen activated protein kinase p38. *J. Biol. Chem.* 276:18934-18940.

68 (2)

DESARROLLO MUSCULAR

## **Influencia de las condiciones de almacenaje en la plasticidad y la liberación de Fentiazac a partir de una formulación tópica**

DELFIN FERNANDO GONSALVES DOS SANTOS<sup>\*</sup>, MARÍA FERNANDA GUEDES BAHÍA<sup>\*</sup> y JOSÉ ANTONIO LOPES SILVA<sup>\*\*</sup>

*\* Centro de Tecnologia do Medicamento-Departamento de Tecnologia Farmacêutica. Faculdade de Farmácia do Porto*

*\*\* Instituto Superior de Ciências da Saúde Norte*

### **RESUMEN**

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia del aumento de la plasticidad en la liberación de un anti-inflamatorio no esteroideo (Fentiazac) vehiculado en gel, en función del tiempo y temperatura de almacenaje. A través de ensayos reológicos y de liberación *in vitro* utilizando membranas epidérmicas artificiales (SARTORIUS), se concluye que estos dos parámetros (tiempo y temperatura de almacenaje) influyen en el comportamiento reológico del producto y, consecuentemente, en la liberación del anti-inflamatorio.

**Palabras Clave:** Reología, viscoelasticidad, gel, membranas epidérmicas (SARTORIUS), liberación, antiinflamatorio no esteroideo, Fentiazac.

### **Influence of the storage conditions on the plasticity and release of Fentiazac incorporated in a topic formulation**

### **SUMMARY**

In this work we studied the influence of the plasticity increasing on the release of an AINE (Fentiazac) incorporated in a gel, in function of the time and the temperature of storage. From the reological and *in vitro* release assays, using artificial epidermic membranes (SARTORIUS), we concluded that those parameters have some influence in the reological behaviour of the product and in the anti-inflammatory release.

**Keywords:** Reology, viscoelasticity, gel, epidermic membranes (SARTORIUS), release, anti-inflammatory, Fentiazac.

## INTRODUCCIÓN

La utilización de preparaciones tópicas para aplicación en la piel presenta una gran importancia para promover la absorción de principios activos, como los que tienen acción anti-inflamatoria.

La absorción percutánea depende no sólo de factores fisiológicos, tales como la integridad de la piel, el flujo sanguíneo cutáneo, el área anatómica, etc., sino también de otros factores inherentes a la propia formulación, incluyendo la naturaleza y el tipo de excipiente, así como sus características reológicas (1).

La reología permite al técnico del medicamento evaluar algunas propiedades de las formas farmacéuticas a través del análisis del comportamiento reológico que presenta.

Las modificaciones reológicas de las preparaciones se deben a la arquitectura molecular de cada materia, a los cambios estructurales que resultan de las interconexiones de los compuestos de la propia mezcla, a la tecnología de fabricación y acondicionamiento, al PH del medio, a la acción de agentes físicos y a las condiciones de temperatura y tiempo de almacenaje, las cuales pueden determinar el eventual deterioro microbiano.

Por lo tanto, es evidente la importancia del papel que la reología asume en la selección de materias primas, en la estabilidad del producto acabado en función de las condiciones de almacenaje y hasta en la biodisponibilidad de las preparaciones (2-4).

El objetivo de este trabajo consiste en el estudio reológico de un gel de Carbopol que contiene Fentiazac, en función de la temperatura y tiempo de almacenaje, traducido en el respectivo análisis relativo al vaciamiento y características viscoelásticas, relacionando dichos parámetros con la cesión *in vitro* del anti-inflamatorio.

## MATERIAL Y METODOS

### Formulación

Fentiazac .....	5 g
Carbopol 940 .....	0,25 g

Metilcelulosa 400 .....	2,2 g
Propilenglicol .....	13,3 g
Sol. Acuosa .....	NaOH 1% q.b.p. pH=7,0
Metilparaben .....	0,025 g
Agua destilada .....	q.b.p. pH 100 g
<i>PH final 6,5</i>	

### Método de preparación

Dispensar el Carbopol 940 en parte del agua y añadir el agente de neutralización (sol. NaOH 1%) hasta obtener pH=7,0. Dispersar la metilcelulosa en agua caliente a 60 °C. Dejar enfriar y mezclar con el gel de Carbopol. Preparar la solución de conservante con el propilenglicol y añadir el Fentiazac. Juntar la primera mezcla y completar el peso con el agua restante, homogeneizando. Acondicionar en tubos revestidos de aluminio.

### Instrumentos

- Instrumento de disolución de formas farmacéuticas orales sólidas preconizado por la F.P V (correspondiente a la Farmacopea Europea II), a cuyo eje se adaptó una cámara apropiada para la colocación de la muestra y de la membrana doble.
- Espectrofotómetro-Hitachi U-2000.
- Potenciómetro-Metrohm 605
- Balanza de precisión-Mettler AE200
- Incubadora-Horo
- Reómetro rotativo del tipo cono/plato-Carrimed 50 CLS

### Reactivos

- Tampón de fosfatos pH 7,0 (USP XXI)
- Componente lipídico N (composición no indicada por la empresa productora) para impregnación del septo filtrante, tipo RS.

**Membranas epidérmicas artificiales (SARTORIUS):**

Las membranas artificiales que se destinan a simular la piel están constituidas por dos capas: una membrana hidrófila y un septo filtrante, tipo RS-modelo SM 16754, que se colocan una sobre la otra de forma concéntrica y se adaptan a la cámara con la parte hidrófila mirando hacia la muestra, como indica la Fig. 1.

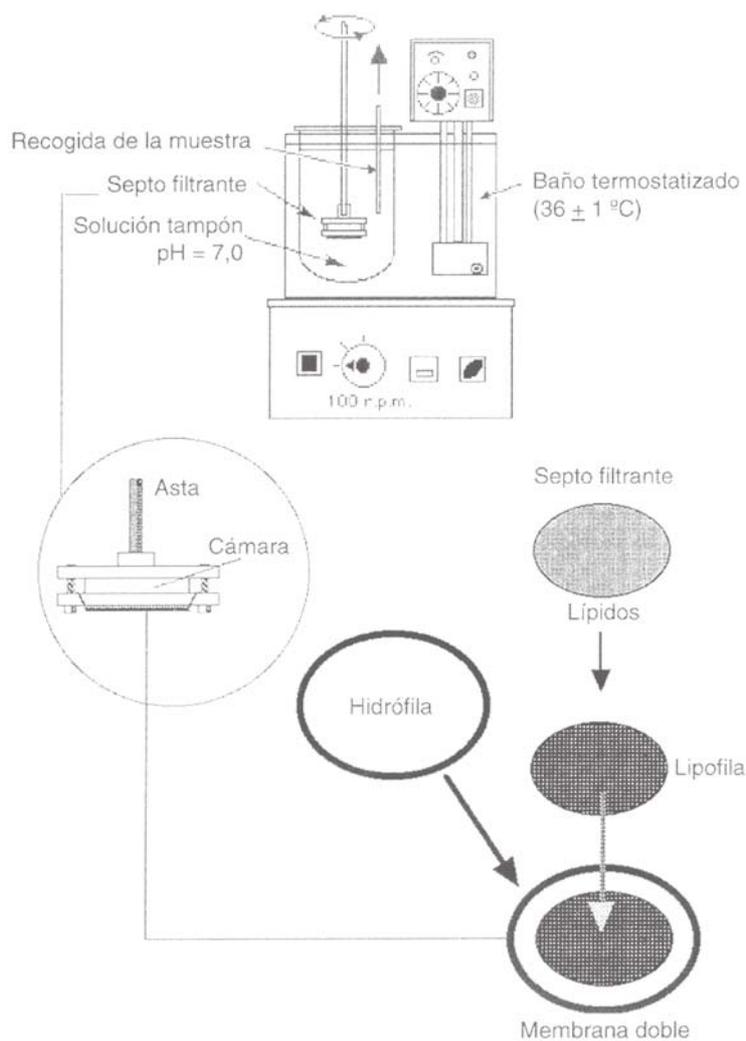


FIGURA 1. Equipo experimental de membranas usadas.

**Proceso analítico:**

La determinación del Fentiazac fue realizada por espectrofotometría UV midiendo la absorbancia de la fase receptora (solución tampón de fosfatos pH 7,0) a 270 nm, usando como blanco la referida solución de fosfatos.

Paralelamente a los ensayos efectuados, se preparó una solución patrón de Fentiazac, a la misma concentración, y en las mismas condiciones, con el fin de obtener los valores porcentuales de las concentraciones de las muestras relacionadas con la cesión del referido anti-inflamatorio (5).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN****Ensayos reológicos**

Se determinaron las características en relación con el vaciamiento y la viscoelasticidad del producto.

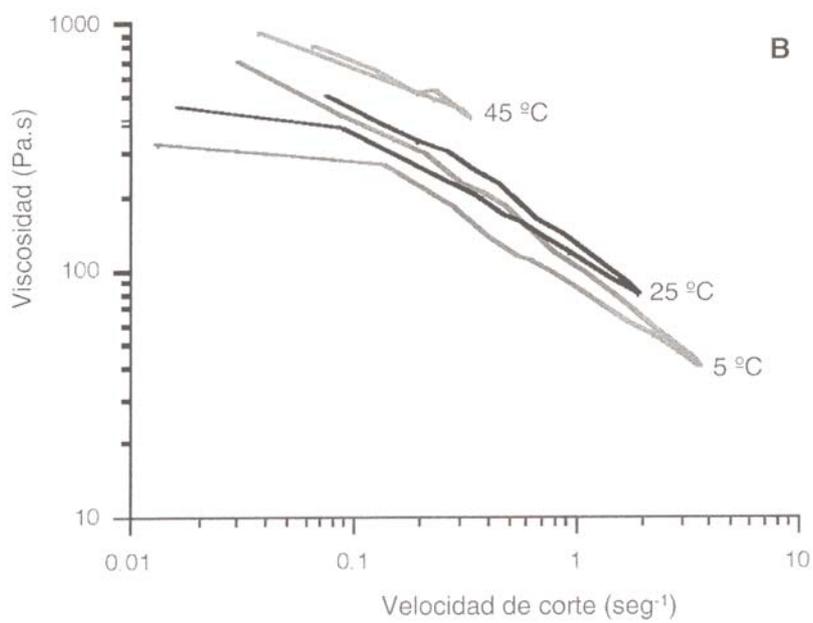
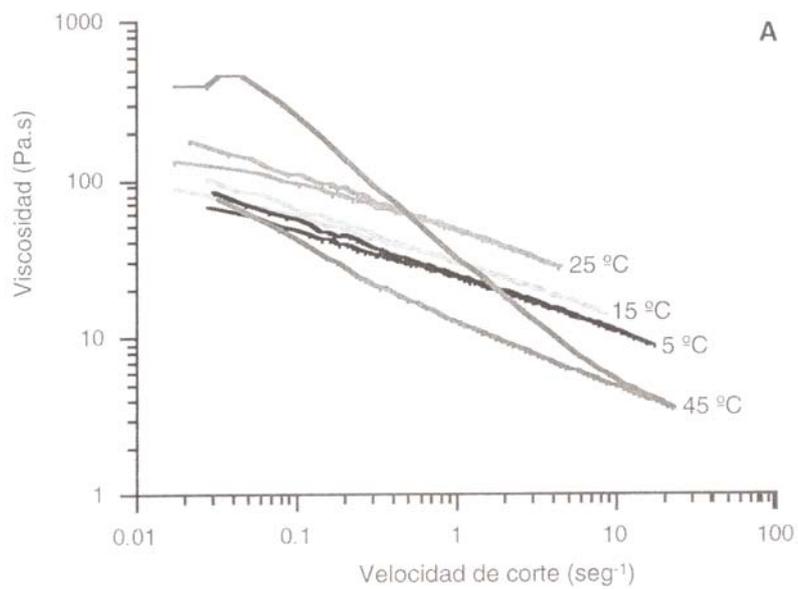
En el protocolo seguido en este estudio se consideraron los siguientes parámetros:

- Temperaturas (5°C; 25°C 45°C)
- Tiempo de almacenaje (3 años)

Los reogramas obtenidos con el gel de Fentiazac en función de la temperatura y del tiempo de almacenaje se representan en las Figs. 2 (A, B y C) y 3, pudiendo observarse aumento progresivo de la viscosidad del gel.

Los ensayos de vaciamiento demuestran, sin duda, la influencia del tiempo y de la temperatura, traducida por una mayor agregación y estructuración del polímero, reflejándose en un ligero aumento de la tixotropía y en el comportamiento pseudoplástico más pronunciado de la preparación, correspondiendo a un mayor valor de cesión (*Yield value*).

En lo que respecta a las características viscoelásticas se recurrió a ensayos oscilatorios a través de la aplicación de los módulos viscoelásticos (módulo de almacenaje,  $G'$  y módulo de pérdida,  $G''$ ) y a ensayos de fluidez (*creep-compliance*) (5).



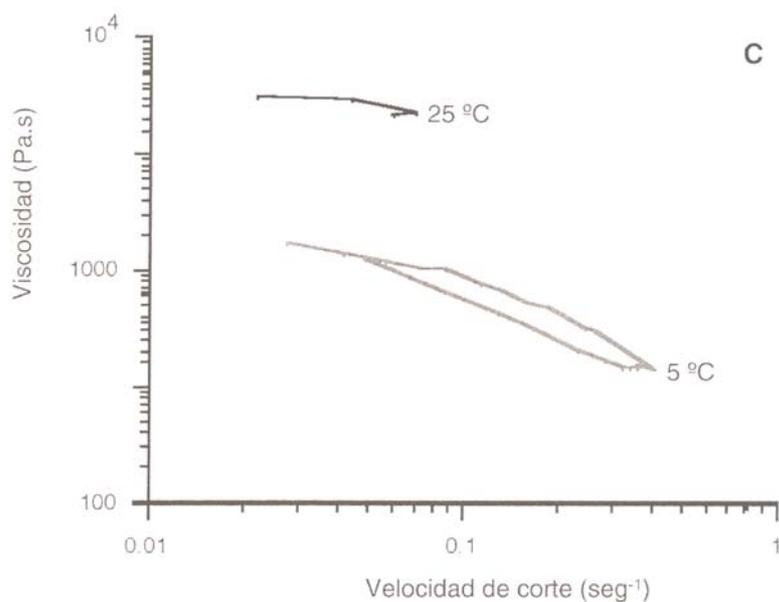


FIGURA 2. Reogramas obtenidos con el gel de Fentiazac en función de la temperatura, 1 mes (A), 2 años (B) y 3 años (C) después de su preparación.

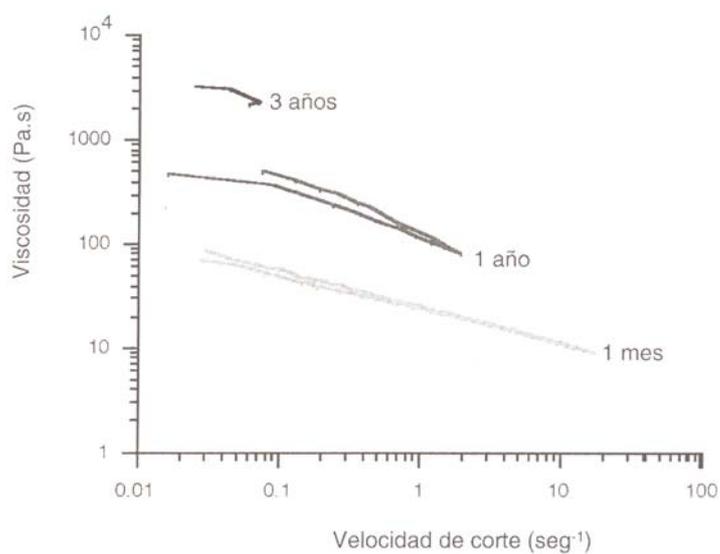
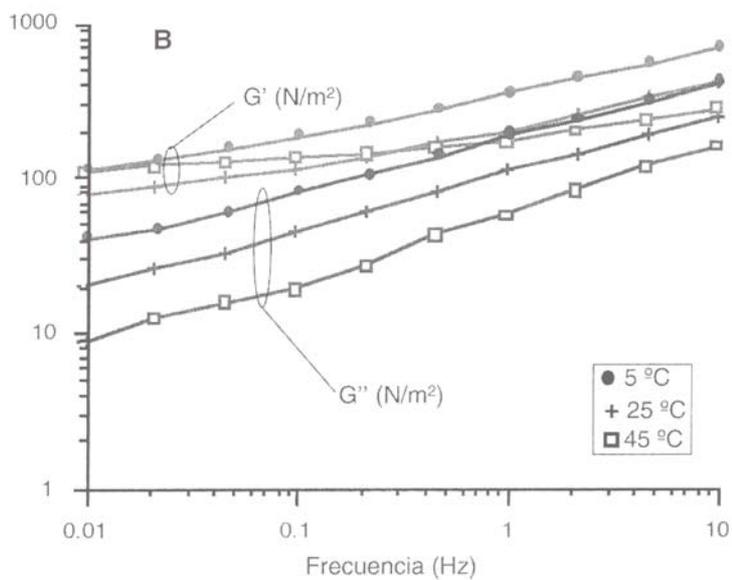
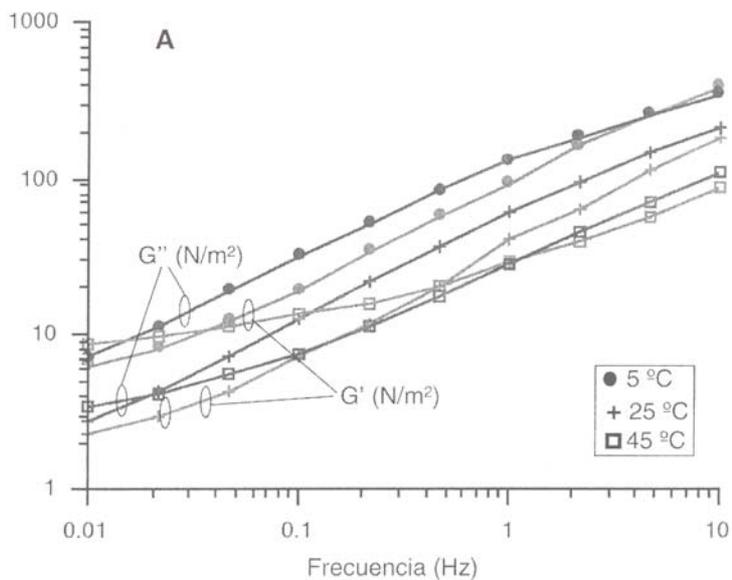


FIGURA 3. Reograma obtenido con el gel de Fentiazac en función del tiempo de almacenaje a la temperatura de 25° C.

Los espectros mecánicos obtenidos en los ensayos oscilatorios para los diferentes tiempos y temperaturas de almacenaje están representados en la Fig. 4 (A, B y C).



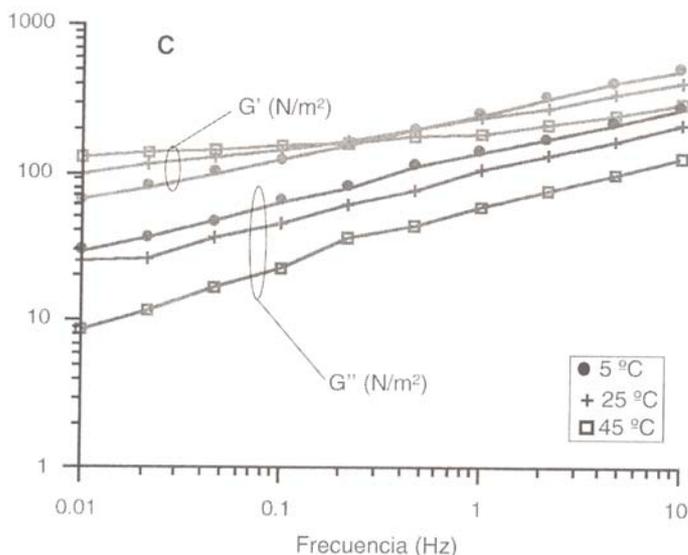
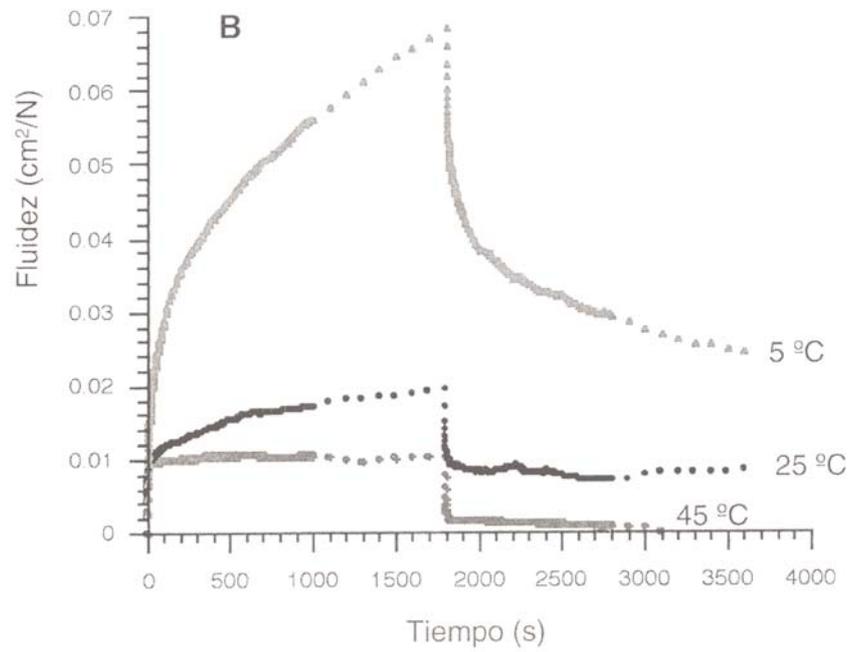
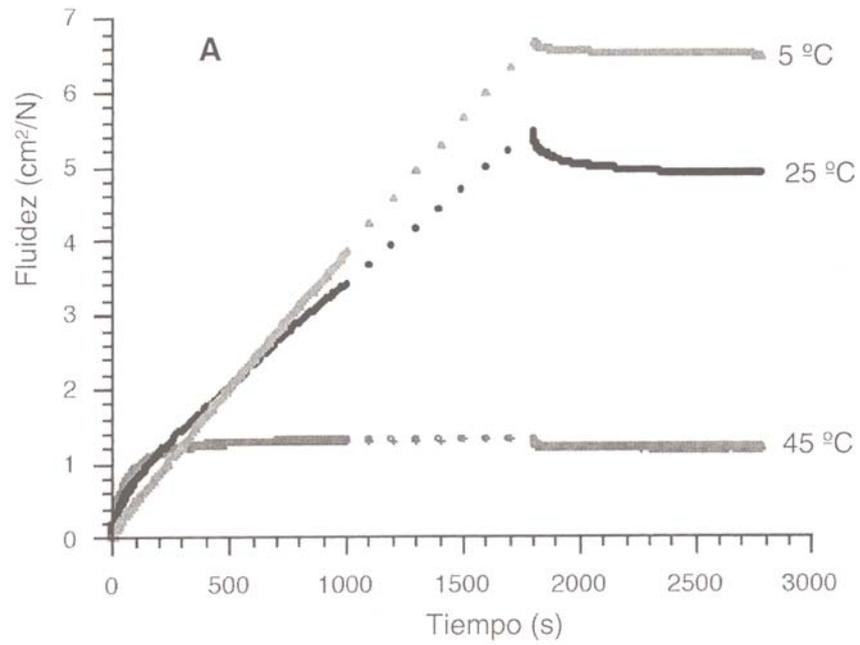


FIGURA 4. Espectros mecánicos obtenidos con los módulos  $G'$  y  $G''$  en función de la temperatura, 1 mes (A), 2 años (B) y 3 años (C) después de la preparación del gel

Como se puede verificar a través de las figuras, el binomio tiempo / temperatura de almacenaje afecta a las características viscoelásticas del gel. De hecho, con el aumento de la temperatura y con el paso del tiempo aparecen modificaciones en la estructura molecular del sistema, provocadas por las interacciones entre las cadenas poliméricas que provocan al mismo tiempo un aumento de la elasticidad observada por la rigidez del gel. Por consiguiente, es posible verificar que, a pesar de que los módulos  $G'$  y  $G''$  son mayores a 5°, el sistema adquiere claramente propiedades elásticas más intensas por el aumento de la temperatura, o sea, la diferencia entre  $G'$  y  $G''$  aumenta, disminuyendo la inclinación  $G'$  versus frecuencia ( $\omega$ ).

El sistema es más elástico (rígido) a 45° C, esto es, la red tridimensional del gel está menos afectada por la frecuencia, mostrando, por tanto, una menor movilidad de las cadenas poliméricas.

La Fig. 5 (A, B y C) representa los espectros mecánicos de fluidez en relación con las condiciones de almacenaje utilizadas en los ensayos.



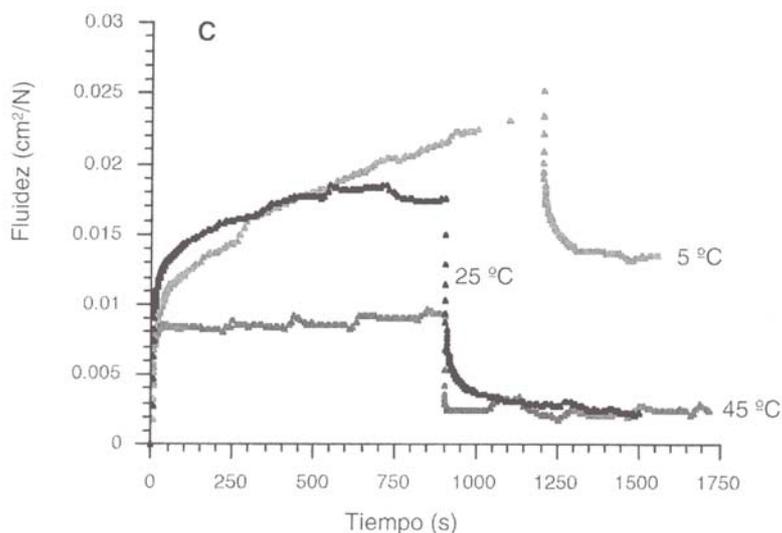


FIGURA 5. Representación gráfica de los ensayos de fluidez obtenidos en función de la temperatura, 1 mes (A), 2 años (B) y 3 años (C) después de la preparación del gel.

Como se puede verificar a partir de los registros gráficos, la deformación obtenida en el sistema después de la aplicación de una tensión constante está influida por el tiempo y la temperatura de almacenaje. A medida que aumenta la temperatura y con el paso del tiempo de almacenaje, se observa un aumento de rigidez del gel, disminuyendo, consecuentemente, el grado de deformación resultante de la tensión aplicada.

Así pues, la elasticidad es menor a 5°C y los valores de fluidez correspondientes a la deformación sufrida por el sistema disminuyen con el tiempo de almacenaje, pronunciándose las características del "sólido".

#### Ensayos de cesión *in vitro*.

Se efectuaron ensayos de cesión *in vitro* con el gel de Fentiazac sometido a diferentes condiciones de almacenaje, con el fin de verificar el comportamiento de cesión del anti-inflamatorio en función del tiempo y de la temperatura de almacenaje.

Este estudio se llevó a cabo durante tres años en los cuales se realizaron regularmente varios ensayos con las muestras sometidas a las temperaturas de almacenaje de 5°C (en frigorífico), 25°C y 37°C (en incubadora).

Los resultados obtenidos en estos ensayos se encuentran indicados en la Tabla 1 y representados en la figura Fig. 6.

TABLA 1. Liberación del Fentiazac vehiculizado en gel de Carbopol y metilcelulosa en función del tiempo y temperatura de almacenaje después de 12 h de ensayo

	1 mes	12 meses	24 meses	36 meses
5°	81,9±1,8	79,9±2,7	78,0±2,2	73,3±2,6
25°	81,9±1,8	81,6±2,5	77,5±1,9	64,6±2,6
37°	81,9±1,8	80,5±2,8	74,8±3,1	60,1±2,7

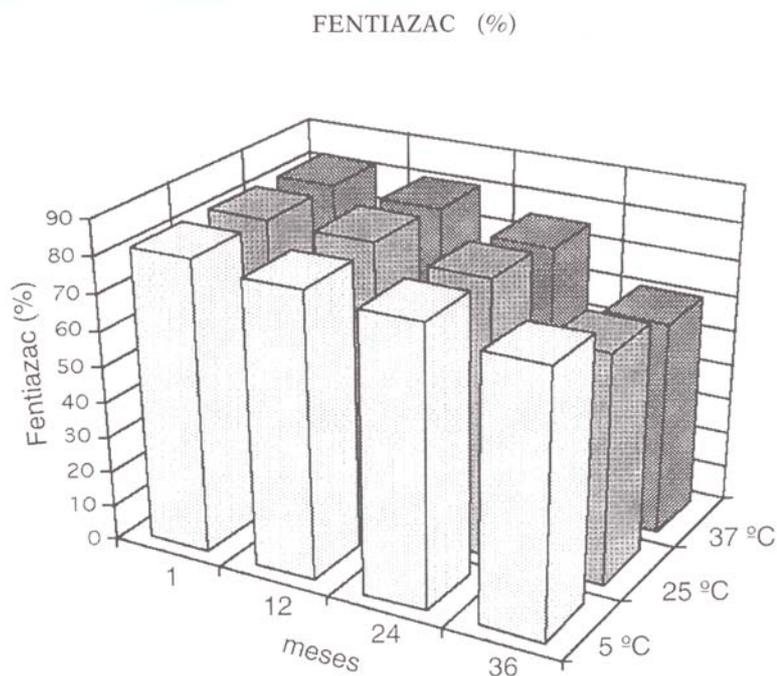


FIGURA 6. Variación de la liberación del Fentiazac (%) después de 12 h, en función del tiempo y temperatura de almacenaje.

Como se puede constatar, no se registraron alteraciones significativas para las temperaturas de 5°C y 25°C. No obstante, se verificó una disminución bastante más acentuada para la temperatura de almacenaje de 37°C.

Se verifica que con el tiempo y con la subida de temperatura, se produce un aumento de la consistencia del gel, reflejándose directamente en la dificultad de liberación del Fentiazac con evidente prolongamiento del periodo de latencia (*lag-time*).

Interpretando los resultados de la Tabla 1 se constata que, para la temperatura de 5°C y la duración total de 3 años, hubo un descenso en la liberación del Fentiazac que no alcanza un 10%. No sucedió lo mismo para las otras temperaturas ensayadas (25°C y 37°C), para las cuales la disminución encontrada fue de un 17 y un 20%, respectivamente.

En estas condiciones de almacenaje, la preparación estudiada libera el anti-inflamatorio en cantidades semejantes a las verificadas en la conservación a 5° C durante un periodo de 2 años.

En resumen, la influencia del tiempo y sobre todo de la temperatura de almacenaje condiciona el índice de liberación del anti-inflamatorio, particularmente más evidente a partir de los dos años.

La molécula del Fentiazac, tiene buena estabilidad, lo que previsiblemente asegura, desde un punto de vista químico, una validez duradera de las preparaciones donde se incluye.

A pesar de que el gel de Fentiazac continúa presentando características satisfactorias propias de una preparación dérmica, a partir de los 24 meses su eficacia podrá estar condicionada. Se demuestra que la garantía de estabilidad física de las preparaciones y de la estabilidad química del principio activo, como es el caso del Fentiazac, no siempre encuentra correspondencia en términos de validez del producto.

## CONCLUSIÓN

El tiempo y la temperatura de almacenaje, a causa de la influencia en la reología del gel, interfieren en la cesión del anti-inflamato-

rio. A pesar de las variaciones reológicas, el gel de Fentiazac al final de 2 años a temperatura ambiente, mantiene condiciones aceptables, aunque se recomienda su almacenaje en lugares más frescos.

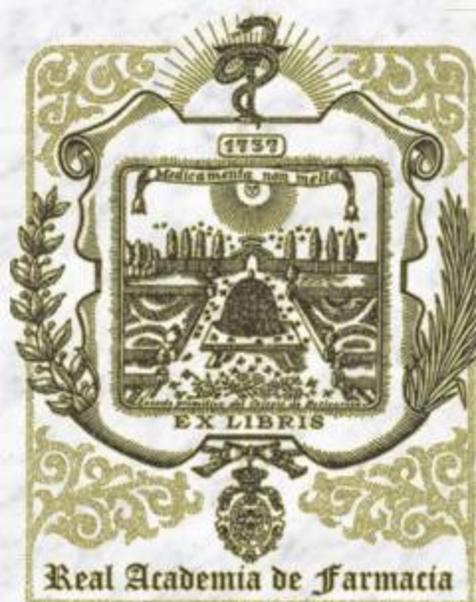
### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Junta Nacional de Investigaçao Científica e Tecnológica (JNICT) por haber subsidiado este trabajo.

### BIBLIOGRAFÍA

- (1) ZATZ, J.L. (1993): *Skin Permeation – Fundamentals and Application*. Allured Publishing Corp. Wheaton, IL
- (2) LABA, D. (1993): *Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries*. Marcel Dekker. New York
- (3) PRISTA, L.N., GUEDES BAHIA, M.F. Y VILAR, E. (1992): *Dermofarmácia e Cosmética, vol. I*. Associação Nacional das Farmácias. Porto.
- (4) PRISTA, L.N., ALBES, A.C.A Y MORGADO, R.R. (1990): *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*, vol. II, 3ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- (5) SANTOS, D. (1995): *Absorção Percutânea – Geles de Carbopol Contendo Fentiazac*. Tese de Doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Porto.





MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN  
Y CIENCIA

[www.ranf.com](http://www.ranf.com)