

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA
FARMACÈUTICA (UNIVERSITAT DE VALÈNCIA)

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DE LA PERMEABILIDAD
INTESTINAL DE FÁRMACOS. ESTUDIO *IN VITRO* E *IN*
SITU.

DAVINIA MARIA OLTRA NOGUERA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 14 d'abril de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Antonio M. Rabasco Alvarez
- Dra. Marta Gonzalez Alvarez
- Dr. Miguel Paya Peris
- Dr. Jose Bruno Fariña Espinosa
- Dr. Virginia Merino Sanjuan

Va ser dirigida per:

Dra. Maria del Val Bermejo Sanz

Dra. Isabel González Álvarez

Dr. Vicente G. Casabó Alos

©Copyright: Servei de Publicacions
Davinia Maria Oltra Noguera

Dipòsit legal: V-2051-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7911-0

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

**“Estudio de la variabilidad de la permeabilidad
intestinal de fármacos. Estudios
in vitro e *in situ*”**

Memoria que, para optar al
grado de Doctor presenta:

Davinia M^a Oltra Noguera

Valencia, Febrero 2010



FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Los que suscriben, **Dr. Vicente G. Casabó Alós** del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia, **Dra. M^a del Val Bermejo Sanz**, y **Dra. Isabel González Álvarez**, del Departamento de Ingeniería, Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad Miguel Hernández de Elche

CERTIFICAN:

Que la Memoria de Tesis Doctoral realizada por Davinia M^a Oltra Noguera y que lleva por título “Estudio de la variabilidad de la permeabilidad intestinal de fármacos. Estudios *in vitro* e *in situ*”, ha sido realizado bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Lo que suscriben en Valencia, 10 de febrero de 2010

Fdo. Dr. Vicente G. Casabó

Fdo. Dra. Isabel González

Fdo. Dra. M^a del Val Bermejo

*A mis padres.
A mis hermanos.*

A Ximo.

Una de las partes más difíciles de este trabajo para mí, es escribir los agradecimientos y las dedicatorias, porque significa que acaba una de las etapas más bonitas de mi vida y ha sido posible gracias al apoyo y aliento de muchas personas que me gustaría mencionar aquí, aunque creo que las palabras se quedan cortas para expresar todo lo que siento.

En primer lugar, a mis directores. A Vicente, gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme con la estadística, por hacer las cosas complicadas más sencillas y por tener la capacidad siempre de sacarme una sonrisa. A Marival, porque has sido la persona que me dio la oportunidad que nadie me daba, la que confió en mí e hizo posible que entrara a formar parte de la gran familia que somos en el departamento. Gracias de corazón. A Isabel, la pequeña Isabel. Tú eres la persona que me lo ha enseñado todo, que de manera incansable me ha ayudado, la que me dio el empujoncito necesario para emprender esta cruzada. Son tantas las cosas que te quiero agradecer. Gracias por creer en mí y en mi trabajo, por valorarme y hacerme sentir apoyada en todo momento.

A mis compañeras de laboratorio, Silvia, Amparo, Chiqui. Gracias por apoyarme y ser tan pacientes conmigo. Gracias por ayudarme cada vez que lo he necesitado, incluso sin pedíroslo. Juntas hemos trabajado día a día para sacar adelante nuestros sueños. Soy muy afortunada de haberos conocido y en un futuro os seguiré teniendo en mi corazón.

A Virginia, por haberme ayudado a anestesiar ratas y por prestarme tu ayuda cuando te he necesitado. A Mati, por tu saber hacer y porque siempre me has brindado una sonrisa.

A Marta, gracias por tu amistad, por levantarme el ánimo cuando estaba decaída, por ayudarme con la citometría, dedicándome tu tiempo. Nunca olvidaré nuestras charlas matutinas en el laboratorio de células.

A Carmen, porque has sido más que una compañera de laboratorio, has sido una amiga para mí y espero que podamos seguir alimentando esta amistad y compartiendo esos almuerzos en la cafetería donde nos hemos reído tanto.

Agradezco también a todos los profesores y compañeros del departamento por su continuo esfuerzo por conseguir el buen funcionamiento del mismo. A Carol, Jose Antonio, Pilar y Juana, a los que quiero agradecer la ayuda que siempre me habéis prestado.

A mi familia. A mis padres y a mis hermanos que siempre habéis creído en mí. Gracias por apoyarme en cada momento y no dejar nunca que pensara que estaba sola en esto, todo lo contrario, siempre me habéis dado vuestro cariño y comprensión incondicional. Os quiero.

Por último, a Ximo, la persona más importante en mi vida. Tú haces posible que cada día quiera seguir adelante, me comprendes a la perfección y crees en todo lo que hago. Sabes decir en cada instante las palabras exactas para hacerme sentir bien y llenarme de fuerzas para poder continuar. Gracias por estar en mi vida y quererme como me quieres. Me siento muy afortunada de tenerte a mi lado.

<u>I. INTRODUCCIÓN</u>	3
<u>II. ANTECEDENTES</u>	7
<u>A. Absorción gastrointestinal (fisiología)</u>	7
1. Lugares de absorción	8
2. Mecanismos de absorción	10
3. Métodos de estudio	39
<u>B. Modelos experimentales</u>	42
1. Métodos <i>in silico</i>	43
2. Modelos animales	43
3. Métodos <i>in vitro</i>	57
4. Modelos celulares	60
<u>C. La variabilidad en los ensayos de permeabilidad intestinal</u>	79
1. Factores pre-experimentales	80
2. Factores experimentales	86
3. Factores post-experimentales	92
<u>D. Fármacos en estudio</u>	96
1. Metoprolol	96
2. Verapamilo	102
3. Absorción intestinal de los fármacos en estudio en distintos modelos experimentales.....	110
<u>III. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	113
<u>A. Compuestos ensayados</u>	113
<u>B. Animales de experimentación</u>	114
<u>C. Técnicas experimentales</u>	115
1. Ensayos de absorción en animales	115
2. Estudio de permeabilidad <i>in vitro</i>	128
3. Detección de la apoptosis por citometría de flujo	147
<u>D. Valoración de muestras</u>	150
1. Elementos cromatográficos	150
2. Condiciones cromatográficas	150
<u>E. Validación del método analítico</u>	152
1. Ensayo de linealidad	152
2. Ensayo de precisión y exactitud	153
3. Límite de detección y cuantificación	153

F. Métodos matemáticos y estadísticos	154
1. Análisis de regresión	154
2. Pruebas de comparación de medias	154
IV. RESULTADOS	158
A. Ensayo de reabsorción de agua	158
B. Constante de velocidad de absorción	159
1. Estudios en intestino completo	161
C. Estudios de permeabilidad <i>in vitro</i>	194
1. Metoprolol	194
2. Verapamilo	272
D. Detección de la apoptosis por citometría de flujo	347
E. Validación de los métodos analíticos	353
1. Validación de los ensayos <i>in situ</i>	353
1. Validación de los ensayos <i>in vitro</i>	356
V. DISCUSIÓN	360
A. Diseño de los ensayos <i>in situ</i>	361
1. Condiciones experimentales	363
2. Parámetros de absorción	363
B. Diseño de los ensayos <i>in vitro</i>	365
1. Condiciones experimentales	366
2. Parámetros de absorción	367
C. Validación de la técnica analítica	368
D. Interpretación de los resultados	369
1. Estudios en rata	369
2. Estudios en células	376
3. Correlación de los resultados <i>in situ-in vitro</i>	384
4. Detección de la apoptosis por citometría de flujo	389
VI. CONCLUSIONES	392
VII. OBJETIVOS FUTUROS	396
VIII. BIBLIOGRAFÍA	398

I. Introducción

Son muchos los estudios que se han realizado para determinar la absorción intestinal de fármacos y cada grupo de trabajo utiliza su propia técnica experimental adaptada a sus condiciones de laboratorio y para las que se ha establecido previamente su capacidad predictiva sobre el resultado final *in vivo* en humanos^{1,2}.

En el modelado de procesos cinéticos, como la absorción, para establecer correlaciones estructura-actividad es frecuente combinar y comparar datos obtenidos en la misma especie animal o cultivos celulares en diferentes laboratorios a fin de incrementar la significación del modelo y su ámbito de

aplicación a mayor número de moléculas. No obstante es frecuente observar disparidad en los valores obtenidos para un mismo fármaco en distintos laboratorios a pesar de utilizar técnicas experimentales similares^{3,4}.

El desarrollo de técnicas *in vitro* para el estudio de la permeabilidad intestinal ha constituido uno de los grandes avances de la Biofarmacia en la última década. Hasta ese momento, los estudios predictivos de absorción oral se desarrollan mediante distintas técnicas que requieren la utilización de animales de experimentación. Los sistemas celulares resultan una buena alternativa frente a los métodos existentes ya que permiten la determinación rápida de la permeabilidad y metabolismo de los fármacos, bajo condiciones controladas, así como reducir y en ocasiones reemplazar la experimentación animal⁵.

Sin embargo, una de las dificultades más citadas para el trabajo con las monocapas celulares es la gran variabilidad inter e intralaboratorio que deriva esencialmente de las diferencias en los protocolos de trabajo. Por tanto, es un aspecto de vital importancia disponer de protocolos validados que aseguren la reproducibilidad de los experimentos y la posibilidad de contrastar los resultados obtenidos en distintos laboratorios

Este trabajo es parte de un proyecto en el que se pretende caracterizar la variabilidad asociada a los experimentos de perfusión *in situ* en rata y modelos de cálculo de permeabilidad en cultivos celulares en distintos laboratorios. Se estimaron cuales son los factores principales responsables de la misma y de que modo pueden estandarizarse y/o ponderarse los distintos resultados si se dispone de información sobre el protocolo experimental.

Con este fin en este trabajo se ha caracterizado la permeabilidad intestinal de dos fármacos modelo: metoprolol y verapamilo en cinco razas de rata utilizando y comparando machos y hembras. Los experimentos *in vitro* se diseñaron utilizando 4 líneas celulares comparando distintos pases, es decir monocapas celulares formadas en un rango de generaciones entre 10 y 80.

Se seleccionó metoprolol porque es el patrón utilizado para clasificar los compuestos en alta o baja permeabilidad y verapamilo por ser un conocido sustrato de Glicoproteína-P.

Los objetivos del presente trabajo son:

- Explorar distintos parámetros como causa de la variabilidad en los experimentos *in vitro* y caracterizar en condiciones estandarizadas la variabilidad intrapocillo, intraplato e intrapase. Este dato es de especial relevancia para determinar el número de experimentos necesarios en futuros proyectos de investigación para analizar la magnitud de cualquier efecto (por ejemplo diferencias entre fármacos, adición de excipientes, cambio de línea celular, etc...) puesto que el tamaño muestral a seleccionar depende de dicha variabilidad residual.
- Determinar en los experimentos *in situ* en rata la magnitud de la variabilidad interespecie y sexo así como la variabilidad residual propia del animal y la derivada de la técnica experimental y analítica utilizada. Esta información permitirá la toma de decisiones sobre la combinabilidad de resultados entre

distintos laboratorios y especies, y puede ayudar en el diseño de protocolos de experimentación por el mismo motivo descrito en el párrafo anterior.

II. Antecedentes

A. Absorción gastrointestinal (fisiología)

La absorción de fármacos, xenobióticos y principios inmediatos administrados por vía oral discurre mayoritariamente a lo largo del tracto gastrointestinal. También puede existir absorción en la mucosa sublingual y rectal.

1. Lugares de absorción

Morfológicamente el tracto intestinal se compone de tramos bien diferenciados: esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y colon. Aunque la absorción puede producirse en todos los tramos, el intestino delgado está especializado en esta función. La característica más sobresaliente son las numerosas estructuras morfológicas encaminadas a aumentar su superficie, y por tanto, su capacidad de absorción mediante difusión pasiva.



Figura II.1 Esquema de las distintas modificaciones existentes en el intestino⁶.

Así, destaca la presencia de tres modificaciones que se desarrollan a partir de la estructura cilíndrica fundamental ^{7, 8}.

- Válvulas conniventes o pliegues de Kerkring.
- Vellosidades intestinales o villi.
- Microvellosidades presentes en las células columnares absorbentes o enterocitos.

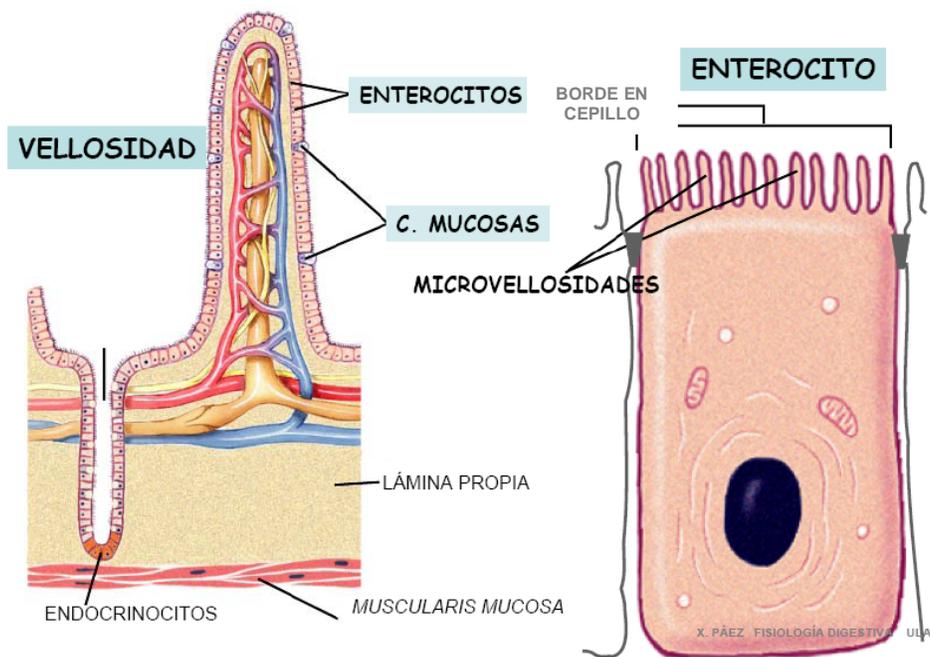


Figura II.2 Estructura del villi y del microvilli⁶.

Otra característica importante del intestino delgado es la presencia de poros acuosos. Éstos se caracterizan por presentar cargas y por poseer un diámetro

reducido, lo cual hace que representen un camino restringido a la absorción de moléculas o iones de peso molecular inferior a 200-250 Daltons, en función de la estereoquímica del compuesto ⁹.

Además, este epitelio presenta numerosas proteínas transportadoras que son indispensables para la incorporación de nutrientes (aminoácidos, azúcares, vitaminas...) y el mantenimiento de la homeostasis. Estos constituyentes son un punto clave en la comprensión del fenómeno de la absorción.

2. Mecanismos de absorción

Los mecanismos de absorción a través de la membrana de las células que forman el epitelio de la mucosa son básicamente de dos tipos:

1. Difusión pasiva
2. Mecanismos especializados de transporte, entre los que se distingue:
 - transporte activo
 - transporte facilitado

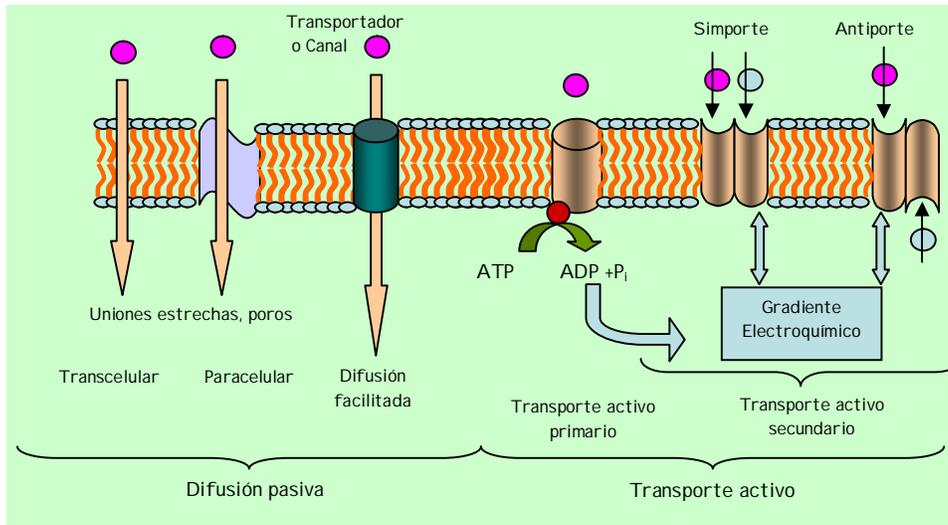


Figura II.3 Mecanismos de absorción.

La absorción de cualquier sustancia puede incluir uno de los mecanismos citados o la combinación de los mismos.

2.1 Difusión pasiva

La absorción por difusión pasiva es el proceso predominante en la absorción de sustancias. Se caracteriza por realizarse siempre a favor de gradiente de concentración y sin consumo de energía¹⁰. Es un proceso complejo, modulado tanto por factores extracelulares (zona luminal) como intracelulares o tisulares (zona serosa), además de las características de la membrana lipóidea fundamental, situada en el borde superior de las células columnares y alineada paralelamente a la superficie de las microvellosidades¹¹.

Engloba dos tipos principales de procesos o rutas:

- Ruta transcelular: difusión a través de membranas lipoideas
- Ruta paracelular: Paso a través de los poros acuosos de la membrana.

2.1.1 Ruta transcelular

La difusión del soluto a través de la membrana celular intestinal es la vía mayoritaria. Consiste en un reparto de las moléculas de soluto entre el fluido del lumen intestinal y la bicapa lipídica que forma la membrana celular, de tal modo que las moléculas se desplazan desde la zona donde se encuentran más concentradas hasta aquella donde la concentración es menor.

Las sustancias liposolubles pueden atravesar fácilmente las membranas hasta que el soluto se equilibre a ambos lados de la bicapa.

Las moléculas polares atraviesan canales formados por las proteínas. Algunas proteínas transmembrana presentan una estructura tridimensional en la cual los radicales polares de ciertos aminoácidos se disponen formando un canal hidrofílico. Algunos canales se mantienen permanentemente abiertos, otros sólo lo hacen cuando llega una molécula mensajera que se une a una zona receptora específica e induce a una variación de la configuración que abre el canal, o bien cuando ocurren cambios en la polaridad de la membrana.

Este mecanismo de absorción depende de las propiedades fisicoquímicas del soluto, en especial del grado de ionización y de la lipofilia, ya que en general sólo se absorbe la fracción no disociada de la molécula, que es la más lipófila.

2.1.2 Ruta paracelular

Otra vía de entrada que podría clasificarse dentro de la difusión pasiva es la que ocurre a través de los poros acuosos de la membrana y/o los espacios intercelulares, es decir, entre las aberturas que dejan las uniones entre las células columnares adyacentes. En este caso, la difusión es una función inversa del tamaño molecular del fármaco. En general esta vía queda restringida a los solutos de bajo peso molecular e hidrofilia elevada¹². En este caso, no se incluiría la membrana lipídica en la ruta global de difusión del xenobiótico.

La ruta global de difusión que debe seguir el xenobiótico para alcanzar el plasma puede dividirse en tres zonas:

➤ ***Interfase lumen-membrana (zona luminal)***

Está constituida por tres zonas continuas de distinta naturaleza fisicoquímica. Su disposición se esquematiza en la Figura II.4:

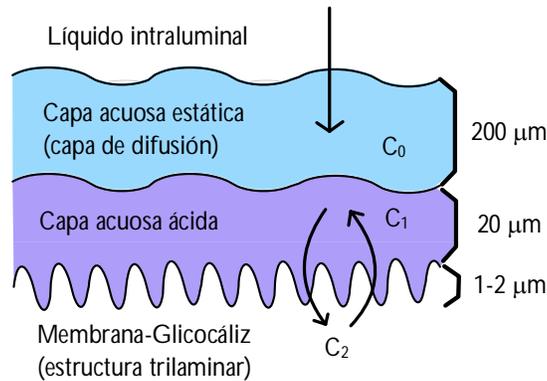


Figura II.4 Disposición de la interfase lumen-membrana

El lumen intestinal está constituido por el *líquido luminal*. El pH de este fluido no es homogéneo a lo largo de todo el intestino. De hecho, en el hombre, entre la zona próxima al estómago y el tramo final del intestino, el pH oscila entre 6 y 8, respectivamente¹³.

En contacto directo con el fluido luminal se encuentra la *capa acuosa estática de difusión* o *capa límite*, cuyo espesor es de unos $300\ \mu\text{m}$. A pesar de que su composición es la misma que la de dicho fluido, las moléculas de agua generan en ella una resistencia a la penetración de solutos. Esta resistencia es el factor limitativo para la absorción de sustancias de marcado carácter lipófilo. La capa acuosa estática es sensible al arrastre y puede eliminarse parcial o totalmente por agitación, por lavado enérgico del intestino y en presencia de tensioactivos sintéticos^{14, 15}.

Por último, adyacente a la membrana se encuentra la *capa acuosa o microclima* cuyo pH es algo más ácido que el del líquido intraluminal, ya que presenta valores entre 5.3 y 6.1¹⁶. Esta capa está poco estudiada, su espesor

parece ser del orden de 20 μm y no se ha demostrado que interfiera en el proceso de absorción salvo en casos excepcionales.

➤ ***Membrana lipóidea***

Es una membrana trilaminar, con características diferenciales del resto de membranas celulares, si bien se puede describir de acuerdo con el mosaico fluido propuesto por Singer y Nicholson¹⁷. Presenta una zona central formada por dos capas fosfolípicas, con sus cadenas hidrocarbonadas unidas entre sí por fuerzas de Van der Waals, de forma que los grupos polares quedan recubriendo las caras interna y externa de la bicapa. Además existen proteínas globulares que recubren algunas zonas o se interponen entre los lípidos.

Está compuesta por una lámina que sirve de "contenedor" para el citosol y los distintos compartimentos internos de la célula, así como también otorga protección mecánica. Está formada principalmente por fosfolípidos (fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina), colesterol, glúcidos y proteínas (integrales y periféricas).

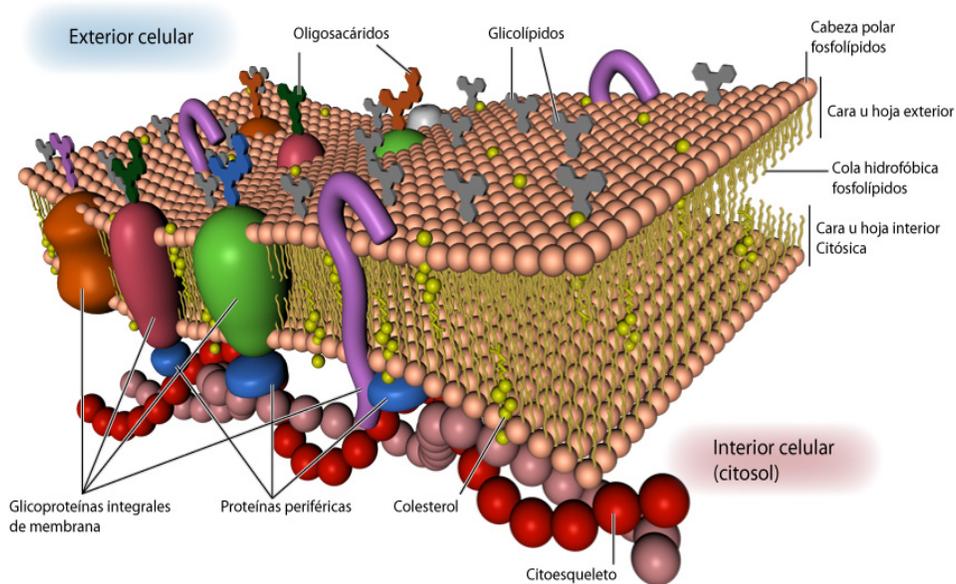


Figura II.5 Membrana lipóidea¹⁸.

Las principales características de esta membrana son: *su espesor*, una micra superior al resto de membranas biológicas¹⁹ y *su composición química*, con un elevado contenido de proteínas (la relación proteína /lípidos es tres veces superior a la normal), lo que es indicativo de la existencia de enzimas y proteínas transportadoras, cuya importancia hace que se traten en el epígrafe 2.2. La proporción lipídica también es distinta a otras membranas. Presentan proporciones esfingomiélin/lecitina y colesterol/fosfolípidos de un 30% y 20% respectivamente, superiores a las del resto. Además se encuentra una elevada proporción de glicolípidos (54%) debido a la existencia del glicocáliz, que es rico en mucopolisacáridos²⁰.

➤ ***Interfase membrana-plasma***

Está compuesta por los distintos elementos que el xenobiótico debe atravesar desde el interior de la célula columnar hasta llegar al plasma sanguíneo. Al parecer, parte de las moléculas quedan retenidas en las estructuras subcelulares, pero esta retención no influye en la difusión del soluto en el interior de la célula. En este entorno se produce la interacción con enzimas biotransformadoras que pueden modificar o inactivar el soluto. Por otro lado, la membrana basal presenta una resistencia a la penetración de los solutos mucho menor que la observada para la membrana apical ²¹. También en esta membrana se localizan transportadores, si bien de diferentes características y en menor cantidad.

Una vez atravesada la membrana basal, el camino difusional no encuentra grandes obstáculos ya que la trama capilar está muy próxima y los endotelios capilares, altamente porosos, no ofrecen resistencia a la difusión de solutos a su través.

2.2 Mecanismos especializados de transporte

Los mecanismos especializados de transporte dependen de la existencia de estructuras, generalmente proteicas, capaces de transportar el soluto de una cara a otra de la membrana. El transporte se caracteriza por la unión específica entre la sustancia y la proteína, cuya traslocación provoca el paso del compuesto a través de la membrana. Tienen un papel esencial en la absorción oral y la biodisponibilidad de los fármacos ²², y en otros contextos como la resistencia a

fármacos^{23, 24}, excreción y metabolitos en hígado y riñón, toxicidad de algunos fármacos²⁵, así como algunas características farmacocinéticas y farmacodinámicas de otros²⁶⁻²⁸.

2.2.1 Tipos de transporte especializado

2.2.1.1 Difusión facilitada

Se denomina también difusión mediada por portadores, ya que aunque se realiza mediante proteínas específicas de membrana, no requiere consumo de energía metabólica.

Las moléculas que no pueden cruzar la membrana por libre difusión, pueden hacerlo por la acción de proteínas transmembrana específicas, que actúan como transportadoras. Existen dos tipos de proteínas transportadoras: las proteínas canales, las cuales una vez abiertas, forman pequeños poros a través de los cuales los iones de tamaño y carga apropiada pueden cruzar la membrana por difusión libre; y las proteínas carriers o acarreadoras que se unen a moléculas específicas y luego sufren cambios conformacionales abriendo los canales a través de los cuales las moléculas que van a ser transportadas pueden pasar a través de la membrana y ser liberadas luego del otro lado.

Los sistemas de cotransporte se pueden clasificar en²⁹:

- Simporte: transporte simultáneo de dos moléculas en la misma dirección
- Antiporte: transporte simultáneo de dos moléculas en direcciones opuestas

Es un proceso rápido y presenta una considerable especificidad por el sustrato. Las proteínas transportadoras son a menudo inducibles y la velocidad de transporte sigue una cinética de Michaelis-Menten ²⁹.

2.2.1.2 Transporte activo

Se produce de forma unidireccional, en contra de gradiente electroquímico y de concentración. Es el transporte neto de un soluto en contra de un gradiente de concentración, no puede producirse espontáneamente, sino que requiere una fuente de energía para conducir un soluto a través de la membrana celular desde un compartimiento de baja concentración a uno de alta. Es necesaria la participación de proteínas integrales de la membrana. La unión entre sustrato y transportador es específica y dado que existe un número determinado de los mismos, el proceso es saturable.

El transporte activo se divide en subtipos, de acuerdo con:

- La fuente de energía utilizada para producirlo ³⁰:
 - **Transporte activo directo**: La energía deriva directamente de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP).
 - **Transporte activo indirecto**: Transporte facilitado donde la molécula cotransportada pasa a través de la membrana a favor de un gradiente de concentración iónico entre ambos lados, generado previamente por un transporte activo directo.

- El sentido del transporte en el lumen intestinal:
 - **Transporte activo de absorción:** Las proteínas que intervienen transportan el fármaco a través de la membrana en sentido lumen-sangre. Las proteínas de la familia MRP actúan de este modo, excepto las MRP2.
 - **Transporte de secreción o efflux:** Las proteínas que intervienen impiden el paso del fármaco a través de la membrana, devolviendo al lumen intestinal las moléculas de fármaco que atraviesan la membrana del enterocito. Como resultado, la absorción es menor de la esperada. Las principales proteínas de membrana implicadas en este tipo de transporte son la Glicoproteína-P y MRP2.

2.2.2 Transportadores

Los transportadores de membrana se encuentran en numerosos epitelios, entre ellos la membrana intestinal, que se caracteriza por gran riqueza y diversidad de los mismos. En concreto, el intestino delgado presenta numerosas estructuras que actúan como transportadores específicos de sustancias tales como nutrientes (azúcares, vitaminas, aminoácidos y ácidos biliares) y compuestos estructuralmente relacionados³¹. Estas proteínas portadoras se encuentran en las membranas lumbales y/o basales de los enterocitos y pueden facilitar el paso de sustancias a la zona citosólica o serosa. Por tanto, pueden condicionar la absorción o la secreción de sus sustratos.

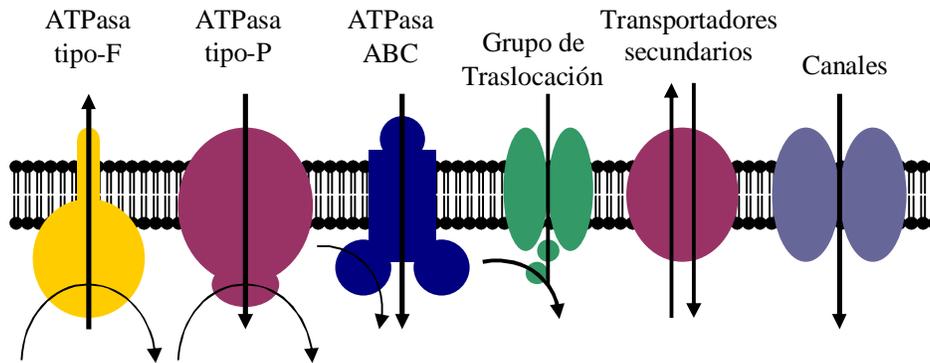


Figura II.6 Esquema de los transportadores intestinales

Debido a su importancia y al número cada vez mayor de proteínas transportadoras identificadas, es necesario recurrir a su clasificación, que puede hacerse bien en función de su mecanismo de funcionamiento, en función del tipo de soluto transportado o según el origen filogenético. Cada vez son más las fuentes monográficas en las que se obtiene información sobre las diferentes clasificaciones establecidas, la mayoría accesible a través de páginas Web. Entre ellas destaca:

➤ **HUGO Human Gene Nomenclature Committee**

(<http://www.genenames.org>)

Este comité es la institución encargada de asignar el nombre oficial de estas proteínas y clasificarlas en superfamilias genéticas denominadas SLC (Solute Carrier) y ABC (ATP- binding cassette). Se conocen 55 familias dentro de SLC, con 362 miembros que aumentan rápidamente³². La superfamilia ABC comprende 7 familias con 49 miembros; en la clase B de la misma se encuentra la

Glicoproteína-P (ABCB1) que deriva del gen de multirresistencia a fármacos (MDR1), mientras que la clase C presenta miembros de la subfamilia de proteínas de resistencia a fármacos (MRP).

Inicialmente se estudiaron con detalle los transportadores responsables de la absorción intestinal de sustancias con gran relevancia biológica como aminoácidos, dipéptidos y glucosa. Se demostró su dependencia con la energía y la especificidad para el sustrato, y más tarde surgieron numerosos estudios en los que se puso de manifiesto su contribución a la absorción de distintas sustancias con actividad terapéutica. En todos ellos se demuestra, por una parte, el carácter no lineal de la cinética de absorción y, por otra, la competencia que provoca la presencia simultánea de sustratos similares desde el punto de vista estructural. Ambas características apuntan hacia el carácter saturable y selectivo de estos fenómenos.

Al profundizar en estos fenómenos se hizo patente la ubicación de estas moléculas que se hallan relacionadas con otros procesos, como la excreción renal, excreción biliar o el paso a través de la barrera hematoencefálica. El aspecto común en estos procesos es el transporte saturable y específico a través una membrana.

Si nos restringimos al ámbito de este trabajo es necesario señalar que ya en la década de los 90, se identificaron distintos portadores de membrana que actúan en el sentido inverso a los citados, es decir, generar un flujo de secreción desde el enterocito hacia el lumen intestinal³³.

Entre las proteínas transmembrana de transporte activo destaca la llamada superfamilia de transportadores ABC (*ATP binding cassette*). Dentro de esta gran superfamilia destacan:

- Glicoproteína-P, también llamada MDR1.
- Subfamilia de proteínas de resistencia a fármacos, MRP.

En la Figura II. 7 se esquematiza la localización de los transportadores mejor estudiados en las membranas de los enterocitos intestinales y el sentido en el que realizan el transporte.

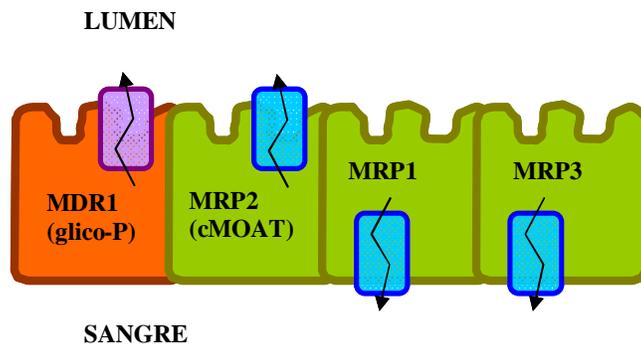


Figura II.7 Esquema de localización de los transportadores MDR y MRP en la membrana del enterocito.

Como se observa, la Glicoproteína-P y el portador MRP2 son capaces de realizar un proceso de secreción activa hacia el lumen intestinal y, por tanto, podrán interferir en la absorción de xenobióticos, reduciéndola.

2.2.2.1 Glicoproteína-P

La Glicoproteína-P fue descubierta en varios tumores celulares como causante de las resistencias a fármacos. Sin embargo, la Glicoproteína-P es altamente expresada en diversos tejidos como el tracto gastrointestinal, hígado, riñón, células de los capilares del endotelio cerebral y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Se halla también en linfocitos CD4 y CD8 y se ha observado que su expresión aumenta cuando éstos son estimulados. Su presencia se ha detectado también en páncreas, pulmón, corazón, glándulas adrenales, testículos, útero, médula ósea, así como en otras células del sistema inmunitario: “Natural killer” y linfocitos-B³⁴⁻³⁷.

La Glicoproteína-P posee un peso molecular de 170 kD^{34,38}. Y su modelo topológico se representa en la Figura II. 8.

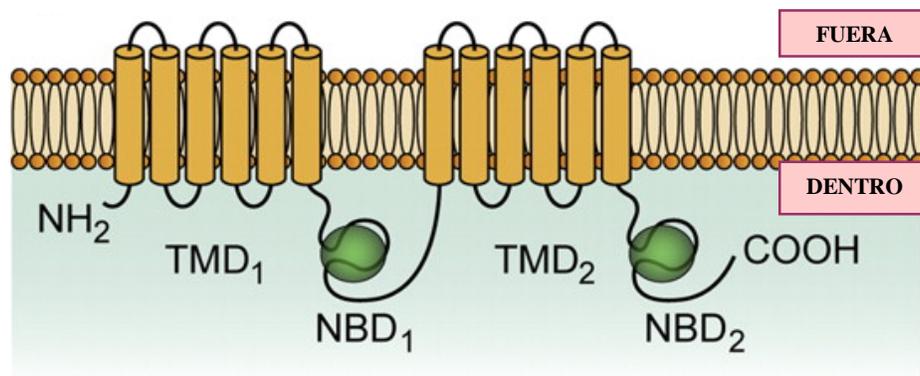


Figura II.8 Modelo topológico de la Glicoproteína-P³⁹

La Glicoproteína-P está codificada por genes que pertenecen al sistema de multirresistencia a fármacos (MDR). La Glicoproteína-P codificada por el gen MDR1 está ligada a la capacidad detoxificadora frente a fármacos, mientras que la codificada por el gen MDR2 parece estar involucrada en el transporte hepático de fosfolípidos ⁴⁰.

Se cree que la principal función de la P-gp es proteger al organismo frente a fármacos y tóxicos, dificultando su absorción, aumentando su eliminación del organismo a través de hígado y riñón, y dificultando su penetración en diversos compartimentos del organismo.

La P-gp presenta polimorfismo genético. Se han hallado polimorfismos en 27 posiciones del gen MDR-1 (ó ABCB1), que codifica por la P-gp. Muchos de estos polimorfismos se hallan relacionados entre sí. El más importante es el polimorfismo C/T en el exón 26 (C3435T). Se ha observado una correlación significativa entre este polimorfismo y la expresión de la P-gp. En un estudio, los pacientes homocigóticos T en la posición 3435 presentaron niveles plasmáticos de NFV menores en comparación con los homocigóticos C⁴¹. Sin embargo, los estudios realizados hallan datos contradictorios. Mientras que unos autores indican que los individuos homocigóticos T en la posición 3435 presentan un mayor funcionalismo de la P-gp⁴², otros autores demuestran el efecto contrario⁴³. Se cree que ello puede ser debido a la presencia de algún tipo de regulación a través de promotores, todavía no identificada, de la zona del gen donde se halla esta región polimórfica. Los individuos de raza africana presentan una menor frecuencia de genotipo T/T y una mayor frecuencia del genotipo C/C que los de raza caucásica.

En general se ha visto que la mayoría de los sustratos de la Glicoproteína-P son moléculas hidrofóbicas que contienen un átomo de nitrógeno básico y dos anillos aromáticos planares. El peso molecular de los sustratos de la Glicoproteína-P se encuentra entre 300 y 2000 Daltons⁴⁴. Numerosos estudios han intentado establecer una relación entre estructura e interacción, pero se enfrentan a la dificultad de que se han descrito tres mecanismos de interacción con la Glicoproteína-P⁴⁵ y que la metodología de trabajo varía mucho de unos autores a otros. Los mecanismos descritos hasta la fecha son^{46, 47}:

- Interacción directa con uno o más de los sitios de unión, actuando como inhibidor competitivo o no competitivo.
- Interacción con el ATP, ya sea inhibiendo la unión de éste, su formación o su acoplamiento en la translocación del sustrato.
- Interacción con la membrana lipídica de las células, ya sea por modificación del entorno celular o por interacción de la unión fármaco-membrana.

La resistencia oncológica a múltiples agentes antineoplásicos se considera una de las mayores causas de fallo clínico en el tratamiento quimioterápico de pacientes con cáncer. El mecanismo de resistencia consiste en una disminución en la acumulación intracelular de fármaco por sobreexpresión de la Glicoproteína-P (P-gp). Esta proteína actúa como una bomba extrusora de fármaco (transportador de secreción), dependiente de energía. El efflux se realiza a través de un canal que forma en la membrana plasmática.

El funcionalismo de la P-gp puede ser inhibido e inducido por una serie de compuestos (Tabla II.1) ⁴⁸

Primer Grupo	Segundo Grupo	Tercer Grupo
Amiodarona	Dexverapamilo	GF120918
Clomipramina	Emopamilo	LY-335979
Ciclosporina	Gallopamilo	OC144-093
Diltiazem	PSC 833	VX-710
Felodipino	Ro11-2933	XR9051
Isradipino		
Nicardipina		
Quinidina		
Quinina		
Trifluoperazina		
Verapamilo		

Tabla II.1 Principales compuestos inhibidores (moduladores) de la expresión de la P-gp ⁴⁸.

Los compuestos del primer grupo son fármacos utilizados habitualmente y su capacidad inhibidora se manifiesta a dosis superiores a las terapéuticas. Difícilmente podrán utilizarse para inhibir la P-gp sin que manifiesten toxicidad. El segundo grupo son análogos a los del primer grupo en investigación, más potentes y menos tóxicos. Los del tercer grupo tienen acciones más específicas.

La actividad de la P-gp está íntimamente relacionada con la del CYP3A4, ya que ambos coinciden tanto en su ubicación, como en sustratos, inductores e inhibidores. Por ejemplo, la vinblastina es un sustrato de ambos, verapamilo y ketoconazol son inhibidores de ambos y la hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*) es inductor de ambos ⁴⁸.

El citocromo P450 3A4 (CYP3A4) es una enzima que coexiste con la Glicoproteína-P en intestino e hígado. Wachter y col., describieron la superposición en la actividad por el sustrato y la distribución en tejidos de la Glicoproteína-P y del CYP 3A4 ⁴⁹. Schuetz y col. pusieron de manifiesto que determinados sustratos y moduladores regulan coordinadamente ambas proteínas en células humanas ⁵⁰. En este aspecto algunos autores defienden que el transporte de una sustancia por la Glicoproteína-P supone también una inducción en el transporte mediado por CYP3A4 en líneas celulares y en rata ⁵¹, sin embargo las moléculas que actúan como inhibidores de un transportador no siempre inhiben el otro transportador ⁵².

2.2.2.2 Sistema de resistencia múltiple a fármacos (MRP)

Actualmente hay 49 miembros conocidos de la familia de transportadores ABC clasificados en 7 subfamilias. Esta clasificación se puede encontrar en la página Web: <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm> ⁵³.

Los transportadores MRP forman parte de la familia de transportadores ABC. En la Tabla II.4 se especifican las diferentes subfamilias en las que se clasifican los transportadores ABC ⁵⁴.

ABC1 Superfam. A	MDR /TAP Superfam. B	MRP /CFTR Superfam. C	ALD Superfam. D	OABP Superfam. E	GCN ₂₀ Superfam. F	White Superfam. G
ABCA1	ABCB1 (MDR1 o P-GP)	ABCC1 (MRP1)	ABCD1 (ALDP)	ABCE1 (OABP)	ABCF1	ABCG1
ABCA2		ABCC2 (MRP2 o cMOAT)			ABCF2	ABCG2 (BCRP)
ABCA3	ABCB2 (TAP1)		ABCD2 (ALDR)		ABCF3	
ABCA4	ABCB3 (TAP2)	ABCC3 (MRP3)				ABCG4
ABCA5	ABCB4 (MDR3)	ABCC4 (MRP4)	ABCD3			ABCG5
ABCA6	ABCB5	ABCC5 (MRP5)	ABCD4			ABCG8
ABCA7	ABCB6					
ABCA8	ABCB7	ABCC6 (MRP6)				
ABCA9	ABCB8	ABCC7 (CFRT)				
ABCA10	ABCB9	ABCC8 (SUR1)				
ABCA12	ABCB10					
ABCA13	ABCB11 (BSEP o SPGP)	ABCC9 (SUR2)				
		ABCC10 (MRP7)				
		ABCC11 (MRP8)				
		ABCC12 (MRP9)				
		ABCC13				

Tabla II.2 Clasificación de la familia de transportadores ABC en subfamilias⁵⁴

Hasta la fecha se han caracterizado trece miembros en la subfamilia ABCC, todos ellos proteínas transmembrana con un peso molecular aparente de 190 kDa. Se pueden dividir en dos grupos según tengan o no el dominio transmembrana 0 (TMD₀ o MSD₀)⁵⁵.

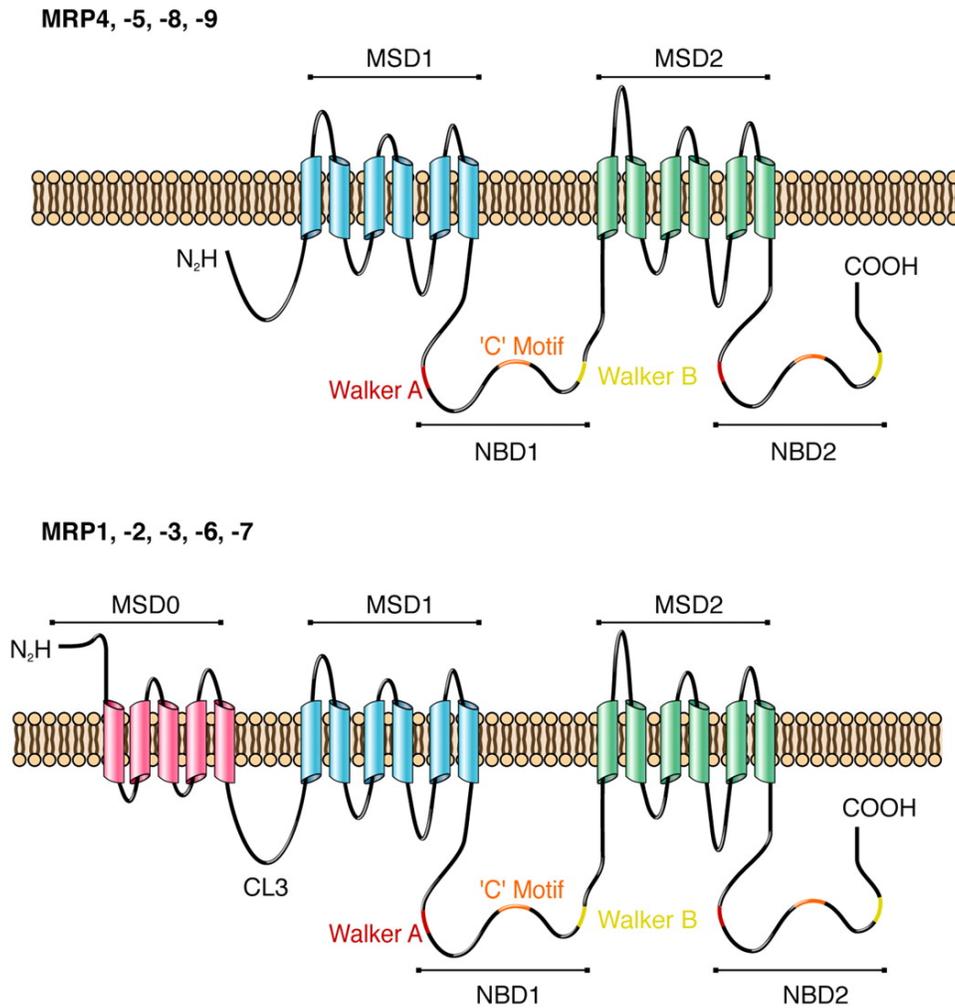


Figura II.9 Modelos topológicos de membrana para MRPs⁵⁵.

La relación entre la topología de la membrana y la actividad del transporte no está totalmente demostrada. Se sabe, por ejemplo, que para la proteína MRP1 el dominio TMD₀ es independiente de la actividad del transporte ⁵⁶.

En el intestino destaca especialmente la presencia de MRP2 (también llamado ABCC2 o cMOAT) y CFTR (también llamado ABCC7). En cuanto a su localización celular, se ha podido observar, utilizando monocapas polarizadas de células renales que, MRP2 se sitúa en la membrana apical ⁵⁷.

En la Figura II. 10 se muestra la localización subcelular de la familia MRP. En la célula izquierda están representadas las MRPs con tres TMD y en la célula de la derecha las MRPs con dos TMD ⁵⁵.

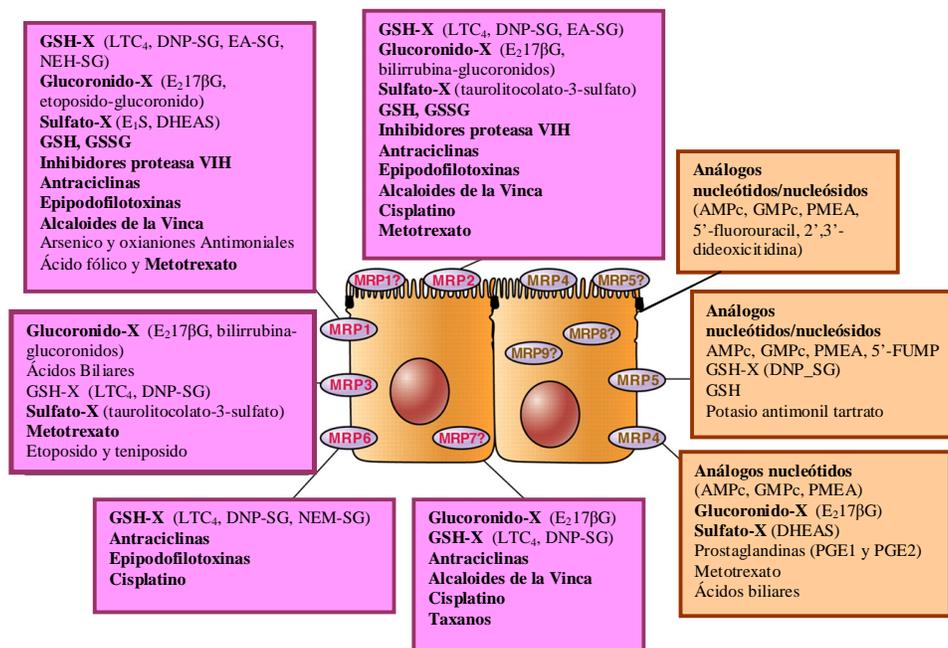


Figura II.10 Localización subcelular y sustratos específicos de las MRPs⁵⁵

Se muestra la posición subcelular de cada MRP sobre la membrana apical o basolateral. La presencia de una MRP en ambas ubicaciones indica que la célula presenta diferencias específicas en la distribución subcelular. En el caso de las MRPs 7, 8 y 9 el signo de interrogación indica que se desconoce su localización subcelular exacta⁵⁵.

En la Tabla II.3 se detalla la nomenclatura y distribución de la familia de transportadores MRP⁵⁸.

Familia MRP	Familia ABCC	Otros nombres	Distribución
MRP1	ABCC1	MRP	Pulmón y la mayoría de tejidos
MRP2	ABCC2	cMOAT EBCR	Hígado, intestino delgado y riñón
MRP3	ABCC3	MOAT-D MLP-2	Riñón, intestino delgado, colon, páncreas y ves. biliar
MRP4	ABCC4	MOAT-B	La mayoría de tejidos
MRP5	ABCC5	MOAT-C	La mayoría de tejidos y cerebro
MRP6	ABCC6	MOAT-E MLP-1 ARA	Riñón e hígado
CFTR	ABCC7		Pulmón, intestino y colangiocitos
SUR1	ABCC8		Páncreas
SUR2	ABCC9		Corazón

MRP7	ABCC10	Colon, piel y testículos
MRP8	ABCC11	Mama y testículos
MRP9	ABCC12	Mama y testículos
MRP10*	ABCC13	Colon, glándulas salivares, médula ósea y en hígado fetal

Tabla II.3 Nomenclatura y distribución de los transportadores MRP (*nombre no confirmado)⁵⁸

La familia MRP1 protege a las células de su destrucción, como sucede en el caso de la membrana basal de la mucosa oral, o también, en las células de los túbulos seminales⁵⁹. Los sustratos de este tipo de proteínas transportadoras son conjugados de glutatión, glucuronato o sulfato. También transportan sustancias con metotrexato o H_3AsO_3 . H_3AsO_3 puede formar complejos con glutatión y este complejo es transportado también por MRP1, por lo tanto la cantidad de H_3AsO_3 induce el incremento del transporte de glutatión desde las células cuando el nivel de MRP1 es elevado⁶⁰. MRP1 también tiene capacidad de transportar metaloides como los oxianiones, tales como el antimonio y el arsénico, y gran variedad de constituyentes de la dieta como flavonoides⁶¹.

En el plexo coroideo, el sistema MRP1 también actúa como una barrera protectora, modulando el acceso al líquido cerebroespinal y controlando el intercambio de metabolitos entre la sangre y el líquido cerebroespinal⁶². Las células epiteliales del plexo coroideo contienen una cierta cantidad de MRP1 y se ha demostrado que la ausencia de este transportador se acompaña de una acumulación de etopósido en el líquido cerebroespinal tras su administración intravenosa⁶³. La familia MRP1 se expresa en la cara basolateral de las células

intestinales expresándose en todo el villi desde el borde en cepillo hasta la cripta (sobre todo en las células Paneth) pero no en enterocitos diferenciados⁶⁴.

La expresión del MRP2 se ha estudiado en el intestino delgado de rata⁶⁵⁻⁶⁷. Es un transportador ATP dependiente que transporta ácido glucurónico, glutatión y derivados sulfatoconjugados. El RNAm que codifica la proteína MRP2 se encuentra en la cara apical de las células del intestino delgado pero no en colon. La proteína MRP2 está presente principalmente en la parte alta del borde en cepillo de las vellosidades intestinales, expresándose en la zona proximal del intestino delgado en alta proporción y decreciendo gradualmente dicha proporción en yeyuno hasta la zona distal del íleon, porque en la zona proximal del intestino los villi están desarrollados al máximo⁶⁸.

Esta distribución de MRP2 está también de acuerdo con la elevada densidad de mitocondrias del borde en cepillo frente a la encontrada en las criptas⁶⁹. La capacidad secretora actúa a lo largo del villi en concordancia con las enzimas de fase II y con la síntesis de ATP, pero no se ha podido establecer si la expresión de MRP2, es consecuencia de enzimas metabólicas o es debido a fenómenos asociados, como la migración y diferenciación celular. Las proteínas MRP2 pueden actuar coordinadamente para contribuir al metabolismo de primer paso de fármacos u otros xenobióticos en la zona proximal del intestino delgado de rata⁶⁸.

El espectro de resistencia a fármacos debido al transporte por MRP2 es igual al de los transportados por MRP1, con una excepción: MRP2 induce resistencia a cisplatina y MRP1 no⁷⁰⁻⁷². La expresión de MRP2 está asociada a enfermedades como el síndrome Dubin-Johnson⁶⁶.

Según Rost y col. MRP2 y MRP3 se expresan en distintas membranas plasmáticas de la vesícula biliar lo que explica la capacidad de la vesícula biliar para secretar xenobióticos y aniones endógenos conjugados hacia sangre transportados por MRP3 y hacia bilis transportados mediante MRP2⁷³.

MRP3 es también un transportador de aniones orgánicos, pero sus sustratos son glucuronatos conjugados y sales biliares, ya que la secreción de bilis en hígado se debe en su mayor parte a MRP3^{58, 74}. Se detectó en intestino delgado, hígado y colon de rata y humanos, expresado en la cara basolateral de hepatocitos y enterocitos^{75, 76}. También está presente en la glándula adrenal, riñón, páncreas y vesícula biliar^{70, 73, 77}. En un paciente sano, MRP3 se detecta en hígado en muy baja proporción y se encuentran principalmente en el conducto biliar. Si se trata de pacientes con problemas hepáticos, los niveles de MRP3 están incrementados en los colangiocitos en fase de proliferación⁷⁷.

Independientemente Belinsky⁷⁸ y Kiuchi clonaron la proteína MRP3 y Kiuchi mediante análisis de Northern blot detectó un incremento en la expresión de MRP3 en células hepáticas expuestas a fenobarbital⁷⁹. MRP3 juega un papel decisivo en la secreción hepática de endógenos y xenobióticos conjugados. Su papel en la circulación enterohepática y coleopática de bilis también es importante. Sin embargo, la posible función de los MRP3 en la glándula adrenal y riñón no se conoce todavía⁷⁷. MRP3 también confiere resistencia a fármacos como el metrotexato, etoposido y tenipósido⁷⁶.

La expresión de MRP3 en hígado es más elevada en pacientes con el síndrome de Dubin-Johnson, probablemente para compensar la ausencia de MRP2

MRP4 y MRP5 son más homólogos entre ellos que con los otros MRP, ya que no poseen dominio TMD0, al igual que la Glicoproteína-P^{60, 81}. Algunos investigadores sugieren que MRP4 y MRP5 están asociados entre ellos y asociados a su vez a la bomba peptídica análoga⁸².

La localización en las membranas de células polarizadas de MRP4 no está resuelta. En el epitelio del túbulo proximal de riñón de rata y humano, MRP4 se localiza en la membrana apical^{83, 84}. En cambio, cuando se transfectan células MDCKII, MRP4 se localiza en la membrana basolateral⁸⁵.

Los fármacos sustratos de MRP4 tienen importancia sobre todo como fármacos antivirales en inmunodeficiencias. Se sabe también que estos transportadores son los responsables de la resistencia cuando se trata a un paciente durante periodos cortos de tiempo con metotrexato o durante periodos largos de tiempo en el tratamiento de la PMEAs⁸⁶. Entre sus sustratos se incluyen glutamato y fosfatos conjugados. Los MRP4 también pueden transportar Estradiol-17 β -D-glucuronido mientras que MRP5 no pueden^{87, 88}. Los sustratos de las proteínas MRP5 son nucleótidos cíclicos. Se sabe también que confieren resistencia a fármacos anticancerosos, metotrexato y análogo de la purina^{82, 89}.

MRP6 se expresa en riñón y hepatocitos exclusivamente. Los sustratos más conocidos de este tipo de proteínas no son ninguno de los aniones orgánicos conjugados típicos, ya que transportan aniones ciclopentapeptidos como BQ123^{90, 91}. Debido a la elevada expresión de MRP6 en hígado y riñón los sustratos pueden ser transportados a la sangre. Bergen y col. sugirieron que las moléculas presumiblemente transportadas por esta proteína pueden ser esenciales para la deposición de la matriz extracelular o el recambio del tejido conectivo en sitios

específicos del cuerpo. Una deficiencia en la especificidad de los sustratos puede afectar al ámbito de tejido conectivo situado en el organismo y específicamente al tejido ensamblado en las fibras elásticas ⁹². Según su función y su expresión en unos tejidos restrictivamente, MRP6 puede actuar como transportador de los aniones orgánicos incluidos en la detoxificación celular y posiblemente en la excreción renal y hepatobiliar de xenobióticos y/o metabolitos endógenos ⁹³. La localización basolateral de MRP6 fue demostrada con células MDCKII transfectadas con MRP6 ^{94,95}.

CFTR, fue identificado por Wang y col. que lo denominaron CAP70. CAP70 había sido identificada anteriormente por Kocher y col. como PDZK1 ⁹⁶, también llamado ABCC7 se expresa en pulmón y colangiocitos. También se ha observado que se expresa en intestino, en la membrana apical de las vellosidades intestinales, expresándose sobre todo en las criptas de dichas vellosidades. Se sabe también que esta familia de transportadores está ligada a enfermedades como la fibrosis quística ⁹⁷. Los sustratos más probables son aniones orgánicos y glutatión ^{98,99}. Según Suzuki y col. y Borst y col. esta proteína no se llama MRP7, sino que es la proteína ABCC10 la que también es conocida como MRP7 ^{60, 100}, pero actualmente, en la base de datos de la HGNC aun se sigue denominando a los transportadores CFTR como MRP7 ⁵⁸.

Las sulfonilureas son una clase de fármacos muy usados como hipoglicémicos orales para promover la secreción de insulina en el tratamiento de diabetes mellitus no insulino-dependiente. Estos fármacos interaccionan con los receptores pancreáticos de las células que inhiben la conductancia a través de los canales de K⁺ ATP dependientes, ya que modulan la liberación de insulina ¹⁰¹.

Estudios bioquímicos indican que las sulfonilureas son proteínas de membrana bastante grandes, entre 140 o 170 kD^{102, 103}.

SUR1 o ABCC8, identificada mediante Northern blot, se expresa sobre todo en páncreas y se incrementa su expresión en niños que padecen hipoglicemia hiperinsulinémica^{97, 104}. La expresión de SUR2 o ABCC9 se identifica mediante Northern blot. Se pueden subdividir en dos grupos: SUR2A y SUR2B. Ambas se expresan en elevada proporción en el parénquima del corazón, mientras que SUR2B además se expresa en músculo y estructuras vasculares de otros tejidos. En el resto de tejidos se expresa en muy baja proporción¹⁰⁵. SUR2A actúa inhibiendo la apertura del canal de potasio extrahepático cuando la concentración de ATP en las células citoplasmáticas es elevada¹⁰⁶. SUR2B también es activado por la elevada concentración de cromacalima y pinacidilo, pero no por diazoxida¹⁰⁷. Se relacionan con enfermedades como hiperinsulinemias, infarto de miocardio e hipotensión¹⁰⁷.

ABCC10 (MRP7) parece jugar un papel importante en la conjugación y síntesis de glutatión¹⁰⁸. Se expresa en baja proporción en todos los tejidos, sobre todo en colon, piel y testículos⁵⁸. Presenta una topología similar a MRP1, MRP2, MRP3 y MRP6¹⁰⁸. Los sustratos de esta proteína son el docetaxel, y en menor medida el paclitaxel, la vincristina y la vinblastina¹⁰⁹.

MRP8 es una proteína que fue descubierta recientemente. Se suele expresar con niveles moderados en mama y testículos y en muy baja proporción en hígado, cerebro y placenta. La selectiva expresión de MRP8 podría ser una tarjeta molecular en el tratamiento del cáncer de mama¹¹⁰. Su membrana topológica muestra una gran similitud con la de MRP4 y MRP5, es decir, que

carecen del dominio transmembrana TMD0⁸⁵. En MDCKII transfectadas y células HepG2, MRP8 se localiza en la cara apical¹¹¹.

MRP9, también llamado ABCC12. Este transportador carece del dominio transmembrana TMD0, al igual que el MRP8⁸⁵. Según su tamaño se encuentra en unos tejidos u otros. Las proteínas de pequeño tamaño se expresan en cerebro, pulmón, hígado, riñón, páncreas y colon¹¹², mientras que las más grandes se expresan en mama, testículos, sobre todo en cáncer de mama¹¹³, por lo tanto MRP9 juega un papel muy importante en la inmunoterapia del cáncer de mama, ya que transporta numerosas sustancias incluyendo fármacos usados en el tratamiento del cáncer de mama^{60, 114}. Debido a que se expresa en tejidos concretos juega un papel importante en terapias con anticuerpos, anticuerpos conjugados e inmunotoxinas¹¹³.

En cuanto a ABCC13 (MRP10?) se han descubierto niveles de expresión relativamente altos, al parecer degradado, en el colon, la médula ósea, la glándula salival, y el hígado fetal, pero la transcripción principal es sólo de 1 kb. En el macaco, donde el gen puede estar funcionalmente intacto, el RNAm de 5.0 kb puede ser encontrado en el colon y en el intestino delgado⁵⁵.

3. Métodos de estudio

Los métodos de estudios se enfocan desde perspectivas distintas, que se combinan para conseguir la máxima información acerca de los transportadores, dónde se expresan, en cuanta proporción lo hacen, cómo actúan, qué fármacos son

sustratos de ellos, etc... En líneas generales se pueden definir dos métodos de estudio: estructurales y funcionales.

3.1 Métodos estructurales

Los métodos estructurales se basan en la determinación biomolecular de sistemas secretores. Esta determinación se hace mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es un método rápido y sencillo que permite la ampliación *in vitro* de secuencias de ADN. Para ello, se utiliza una ADN polimerasa termoestable, ADN molde, cebadores, los cuatro desoxinucleótidos trifosfato, un tampón adecuado y sales.

La técnica se basa en desnaturalizar el ADN hasta su disociación. Posteriormente se hibridan los cebadores con el ADN de cadena sencilla bajo condiciones que permitan la unión del cebador a los sitios homólogos del molde. El último paso es la síntesis de ADN mediante la extensión de cebadores por la enzima ADN polimerasa; cada uno lo hace en dirección 5'-3'.

La determinación de los niveles de expresión de RNA mensajero que codifica para la proteína MDR-1 se lleva a cabo por la técnica RT-PCR.

Los cebadores se diseñan de manera que detecten el RNA mensajero que codifica el transportador en estudio. Las muestras de la reacción PCR se analizan, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

De esta manera se puede determinar semicuantitativamente la cantidad de RNA mensajero del gen presente en cada uno de los tejidos seleccionados.

3.2 Métodos funcionales

El intestino delgado constituye el lugar fundamental para la absorción de nutrientes y no nutrientes ingeridos con la dieta o con fines terapéuticos. Desde un punto de vista toxicológico, el intestino puede considerarse como un órgano diana, ya que se encuentra expuesto directamente a la acción de las sustancias ingeridas.

La absorción intestinal de cualquier xenobiótico depende, por una parte, de sus características físico-químicas y, por otra, de las características químicas (composición proteica y lipídica) y dinámicas (actividades enzimáticas, presencia de sistemas de transporte, etc...) de la membrana absorbente. Para evaluar las características de absorción y posible toxicidad de una sustancia resulta interesante el uso de métodos *in vitro* con líneas celulares, capaces de mantener las características de absorción, transporte y actividad metabólica a un nivel análogo al que presentan las células intestinales *in vivo*.

Hasta el momento, los estudios sobre secreción intestinal de fármacos se han desarrollado en dos vertientes: estudios *in vivo* e *in situ*, utilizando animales de experimentación, como ratas y conejos principalmente, y estudios *in vitro*, utilizando líneas celulares transformadas que sobreexpresan algún transportador en su membrana. Una de las líneas celulares más utilizadas es la de Caco-2 (células de cáncer de colon humano) para las cuales la metodología de trabajo está bien establecida. Mediante las dos vertientes se pueden hacer estudios de transporte.

Estos estudios acostumbran a seguir una línea de trabajo común: para establecer si un determinado fármaco es sustrato del transportador, se elige un inhibidor específico que, administrado junto con el fármaco, compita con éste por la unión al transportador. En la actualidad no existe homogeneidad de criterio sobre el número de lugares de unión transportador-sustrato. En todo caso, estos estudios de sustrato administrados conjuntamente con inhibidores permiten estudiar el tipo de inhibición en un lugar de unión determinado.

B. Modelos experimentales

La necesidad de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de la absorción y metabolismo de las sustancias clínicamente activas es un hecho. Y para ello, lo ideal sería disponer de un instrumento de trabajo sencillo y rápido, económico y fiable en cuanto a resultados. Por desgracia, las técnicas disponibles no siempre gozan de estas características; todas ellas presentan ventajas e inconvenientes que conviene analizar.

Evidentemente, las más fiables son las técnicas *in vivo*, pues reproducen todas las condiciones fisiológicas del organismo, aunque por su complejidad requieren mucho tiempo, lo que restringe su aplicabilidad en las etapas tempranas de desarrollo y llevan asociadas las restricciones éticas del uso de animales en experimentación.

En los procesos de búsqueda de fármacos en las empresas farmacéuticas es necesario tener una estimación más rápida de los parámetros de absorción. A continuación se detallan algunos de los métodos de evaluación que se utilizan en la búsqueda inicial de fármacos (*screening*)¹¹⁵.

1. Métodos *in silico*

Dado que los métodos experimentales necesitan que el fármaco esté sintetizado y disponible en ciertas cantidades para efectuar los estudios, la investigación orientada hacia el descubrimiento de nuevas moléculas necesita un cribado inicial. Este cribado se realiza con métodos computacionales (*in silico*) que, mediante sistemas informáticos basados generalmente en redes neuronales, predicen la absorción intestinal a partir de las estructuras químicas de los compuestos. Estos sistemas se basan en la elaboración de bases de datos que incluyen determinados parámetros estructurales, como solubilidad acuosa, lipofilia o tamaño molecular, que inciden en la absorción de sustancias para las cuales ésta es conocida ^{116, 117}. Posteriormente, se introducen las estructuras químicas de los fármacos que se desea estudiar para estimar el parámetro de absorción ¹¹⁸.

2. Modelos animales

2.1 Razas

2.1.1 Wistar Unilever

La raza Wistar Unilever es una rata albina descendiente de animales del Instituto Wistar de Filadelfia en EEUU. Es una rata con una buena tasa de crecimiento, dócil, fácil de manipular y una camada media de 9,5 crías ¹¹⁹.

La rata Wistar es considerada como un animal polivalente desde el punto de vista experimental, con una vida media larga, alrededor del 70% sobrevive a la semana 104 de edad, como se representa en la Figura II. 11

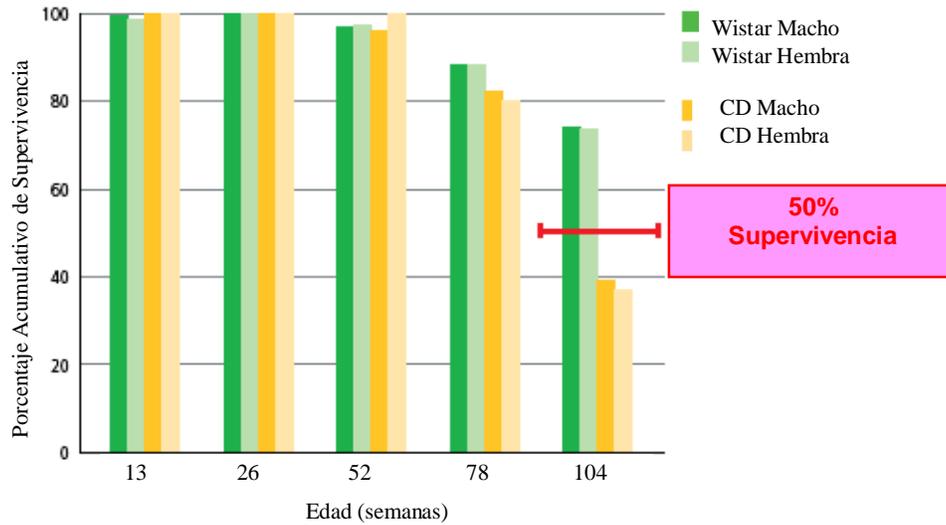


Figura II.11 Diagrama de barras de la supervivencia por semanas de las ratas Wistar y las CD¹¹⁹

Usos en investigación

- Teratología
- Envejecimiento
- Modelo de propósito general
- Estudios de nutrición
- Oncología

2.1.2 Wistar Han™

La raza Wistar Han™ es una rata albina procedente de animales del RCC-BRL (Biological Research Laboratories Limited), Basilea, Suiza, en 1993 ¹²⁰.

Sólo los laboratorios Harlan han mantenido la original RccHan™: WIST desarrollada a partir de las ratas Wistar del Instituto Wistar y caracterizadas en el Instituto de Hannover ¹²⁰.

Al igual que la Wistar Unilever, posee una buena tasa de crecimiento, es dócil, fácil de manipular, con una camada media de 9,5 crías y una tasa de supervivencia superior al 70% en la semana 104 de edad.

Usos en investigación

- Teratología
- Envejecimiento
- Modelo de propósito general
- Carcinogénesis
- Oncología
- Toxicología

2.1.3 Sprague Dawley®™

La raza Sprague Dawley®™ es una rata albina procedente en 1925 de Sprague-Dawley Company de Madison, Wisconsin, a partir de una serie de cruces

iniciados con un macho de cabeza pigmentada y seis hembras albinas de origen desconocido ¹²¹.

Es la rata no consanguínea más ampliamente utilizada en investigación con una camada media de 11 crías y un temperamento muy dócil.

Usos en investigación

- Teratología
- Envejecimiento
- Modelo de propósito general
- Estudios de nutrición
- Oncología
- Toxicología
- Modelo quirúrgico

2.1.4 Long-Evans

La raza Long-Evans fue desarrollada por los doctores Long y Evans en 1915, por cruzamiento de varias hembras del Instituto Wistar y de un macho gris. Son ratas blancas con un capuchón negro incluso a veces marrón ¹²².

Usos en investigación

- Toxicología
- Estudios de comportamiento
- Neurología

2.1.5 CD*IGS

La raza CD*IGS se originó en 1925 por Robert W. Dawley a partir de una rata macho híbrida de cabeza coloreada y una rata hembra Wistar. En 1950 llegó a los laboratorios Charles River procedente de la “Sprague-Dawley Company”¹²³.

Usos en investigación

- Modelo general multirespuesta
- Estudios de seguridad y eficacia
- Nutrición
- Obesidad
- Oncología

2.2 Técnicas utilizadas en absorción intestinal animal (Rata)

Los estudios de perfusión en órganos aislados se consideran técnicas intermedias entre los estudios *in vivo* y los ensayos con tejidos aislados. Estos estudios se realizan, en la mayoría de los casos, en animal de experimentación, pero también se han realizado estudios similares en humanos^{124, 125}.

Los órganos en estudio deben aislarse de los tejidos periféricos. Este aislamiento no es necesariamente físico, ya que es importante mantener una buena vascularización del órgano.

Entre las técnicas de perfusión intestinal más utilizadas destaca el método de paso único sin recirculación (single pass) y el método de Doluisio (closed loop).

En el método de paso único, el intestino delgado o segmento de interés se perfunde a velocidad controlada con la solución medicamentosa. De esta forma el sistema permite el control de la concentración del fármaco, el pH, la osmolaridad y la velocidad de entrada del mismo. El cálculo de la permeabilidad se realiza por medida de la desaparición del fármaco del lumen intestinal, en estado estacionario

126

Perfusión de un solo paso en rata *In Situ*

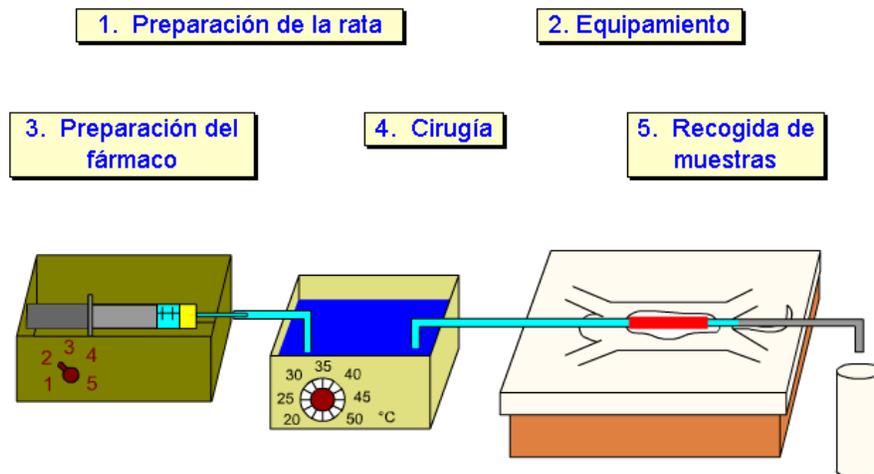


Figura II.12 Esquema de la técnica de perfusión de un solo paso en rata *in situ*. Tomado con permiso de "Biofarmacia Moderna V.6.0".

En el método de Doluisio, la solución a ensayar se mantiene en el segmento intestinal del cual se toman muestras para observar la desaparición del fármaco ^{127,}
128.

Técnica de perfusión sin recirculación: método de Doluisio

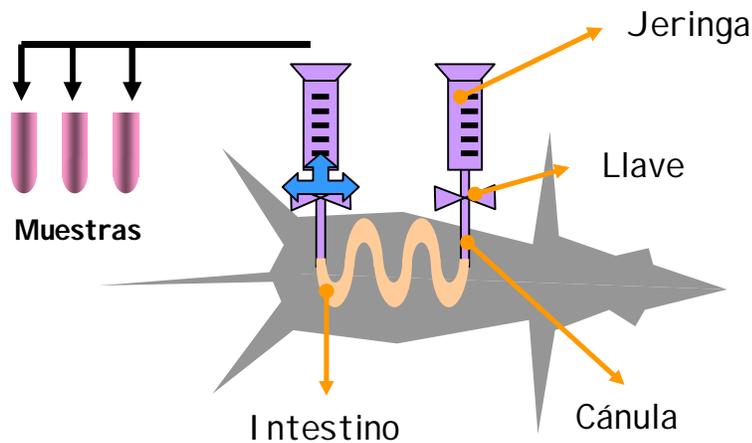


Figura II.13 Esquema de la técnica de perfusión sin recirculación basada en el método de Doluisio

Con estas técnicas *in situ*, el aporte neural, endocrino, sanguíneo y linfático de la zona en estudio permanece intacto. Estos modelos son, por tanto, sensibles a influencias farmacológicas y fisiológicas. Por otra parte, el montaje experimental puede permitir conocer también el acceso del fármaco al torrente sanguíneo. Para lograr este objetivo se puede proceder de dos formas: la primera consiste en canular dos venas mesentéricas que den soporte al segmento intestinal considerado. La segunda consiste en canular la vena mesentérica superior y la vena porta, de forma que se consigue la perfusión, prácticamente, de la totalidad del intestino delgado. El conducto biliar también puede canularse para la toma de

muestras biliares. Con estas modificaciones se pueden, incluso, cuantificar los fenómenos de primer paso intestinal y hepático y los fenómenos de secreción.

2.3 Aplicaciones en investigación

2.3.1 Cálculo de la Peff

La constante aparente de velocidad de absorción (K_{ap}) se obtiene mediante ajuste por regresión no lineal a esta ecuación:

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{ap} \cdot t}$$

donde C es la concentración de fármaco a tiempo t y C_0 corresponde a la concentración inicial de fármaco disponible para la absorción ($t = 0$).

Para obtener un valor representativo de la constante de velocidad de absorción, el ensayo se realiza en un mínimo de 6 animales para cada concentración ensayada. Tras esto se obtiene un valor medio que se considera característico de las condiciones del ensayo.

Es posible determinar los valores de permeabilidad intestinal efectiva (P_{eff}) por transformación de la constante aparente de velocidad de absorción según la siguiente ecuación:

$$P_{eff} = \frac{k_a \cdot R}{2}$$

donde R es el radio del segmento intestinal.

2.3.2 Determinación de ventanas de absorción

Una vez obtenida la evidencia experimental de la presencia de un proceso no lineal se podrían realizar ensayos de absorción en los diferentes tramos fisiológicos del intestino delgado de la rata.

El objetivo de estos ensayos es caracterizar la zona de absorción con niveles mayores de expresión del transportador, es decir, determinar la presencia de ventanas de absorción.

Para ello se efectuarían ensayos en duodeno, considerando como tal la zona comprendida entre el píloro y el ligamento de Treitz (longitud aproximada 10 cm), en yeyuno tomando 45 cm desde el ligamento de Treitz y en íleon, caracterizado como los 45 cm previos a la válvula íleo-cecal. Por último se realizan también ensayos en colon que se aísla desde el ciego a la zona rectal (aproximadamente 10 cm).

2.3.3 Caracterización de la cinética del transporte de fármaco a través de la barrera intestinal

- A. Para poner en evidencia la existencia o no de transportadores implicados en el mecanismo de absorción de un compuesto, hay que diseñar un estudio donde se determine la permeabilidad a diferentes concentraciones de compuesto. La comparación estadística de las constantes aparentes de velocidad de absorción a distintas concentraciones permite poner de manifiesto la presencia o no de un transporte activo y saturable.¹²⁹

B. Una vez establecida la existencia de diferencias significativas entre los valores de permeabilidad obtenidos a las distintas concentraciones ensayadas, se realiza un ajuste a una cinética combinada de Michaelis-Menten.

Los modelos se establecerían de acuerdo a la información previa obtenida en bibliografía. Se podrían establecer, por ejemplo, los siguientes modelos asumiendo una cinética de absorción pasiva o una cinética combinada (pasiva + activa), pero desconociendo qué tipo de transportadores están implicados.

Este es un ejemplo propuesto por González y col.¹⁵⁹ para explicar el transporte de una fluoroquinolona.

Modelo 1:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{\text{dif}} \cdot C$$

Modelo 2:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{\text{dif}} \cdot C + \frac{V_m \cdot C}{K_m + C}$$

Modelo 3:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{\text{dif}} \cdot C - \frac{V_m \cdot C}{K_m + C}$$

Modelo 4:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{\text{dif}} \cdot C - \frac{V_{m_i} \cdot C}{K_{m_i} + C} + \frac{V_{m_e} \cdot C}{K_{m_e} + C}$$

E: efflux

I: influx

En el modelo 1 se asume únicamente la desaparición del compuesto por difusión pasiva ¹³⁰, mientras que en el modelo 2 se asume que el compuesto desaparece del lumen por difusión pasiva y reaparece por secreción activa saturable (Michaelis-Menten) ¹³¹. En el modelo 3 se asume que el compuesto desaparece del lumen tanto por difusión pasiva como por absorción activa saturable (Michaelis-Menten). En el modelo 4 se contempla la posibilidad de que transportadores tanto de secreción como de absorción estén implicados, junto con la absorción pasiva en el proceso de absorción del fármaco a nivel intestinal.

A fin de establecer cual es el modelo cinético que mejor explica la cinética del fármaco a partir de los datos experimentales, se utilizarán criterios estadísticos y de bondad de ajuste.

2.3.4 Establecer correlaciones

Correlación intestino completo-tramos intestinales

Con el fin de establecer una correlación entre las distintas concentraciones de un compuesto, por ejemplo, en intestino completo y en fleon en solución libre se utilizan las siguientes ecuaciones ^{132, 164}:

Intestino completo:

$$\frac{dC}{dt} = -\left(\frac{2}{R_{IC}} \cdot P_{dif}\right) \cdot C + \frac{2}{R_{IC}} \cdot \frac{V_{m_{IC}} \cdot C}{K_m + C}$$

Íleon:

$$\frac{dC}{dt} = -\left(\frac{2}{R_I} \cdot P_{dif}\right) \cdot C + \frac{2}{R_I} \cdot \frac{V_{m_I} \cdot C}{K_m + C}$$

donde R_I y V_{m_I} representa el radio y la V_m del íleon respectivamente, R_{IC} y $V_{m_{IC}}$ representa el radio y V_m del intestino completo respectivamente y P_{dif} representa la permeabilidad pasiva.

Correlación entre K_a y la lipofilia

En nuestro laboratorio se han estudiado una serie de quinolonas homólogas perfectas derivadas del ciprofloxacino y norfloxacino, todas ellas a una concentración de $50\mu\text{g/ml}$, con el fin de establecer la relación entre la lipofilia y el componente pasivo del proceso de absorción¹³³ (Figura II. 14).

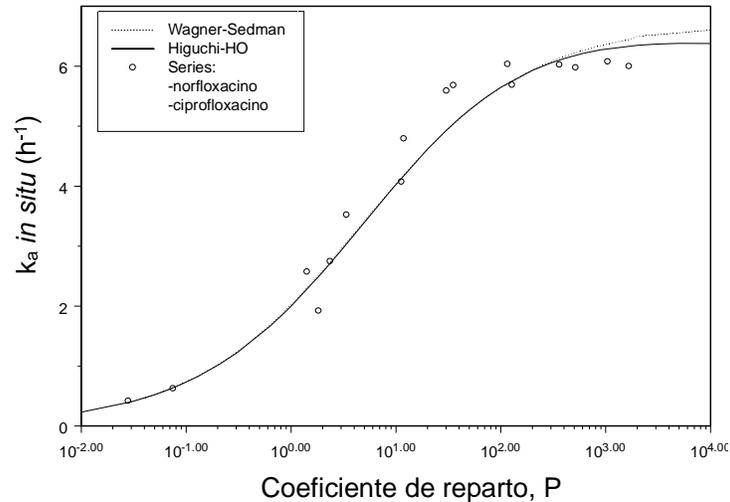


Figura II.14 Correlación entre k_a y lipofilia en series de quinolonas homólogas.

Como se observa en la figura para series homólogas de compuestos de peso molecular superior a 250 Daltons en intestinal delgado se obtienen correlaciones monohiperbólicas entre absorción y lipofilia. La asíntota de la correlación aparece debido a la resistencia de la capa acuosa de difusión que es el factor limitativo para la absorción de los elementos más lipófilos. Estas correlaciones corroboran que la lipofilia es uno de los mayores determinantes de la permeabilidad intestinal.

Correlación entre K_a y la fracción oral absorbida

En trabajos previos de nuestro grupo de trabajo, se estableció también la correlación de la fracción oral absorbida de las quinolonas estudiadas con su constante de absorción pasiva¹³⁴ (Figura II. 15).

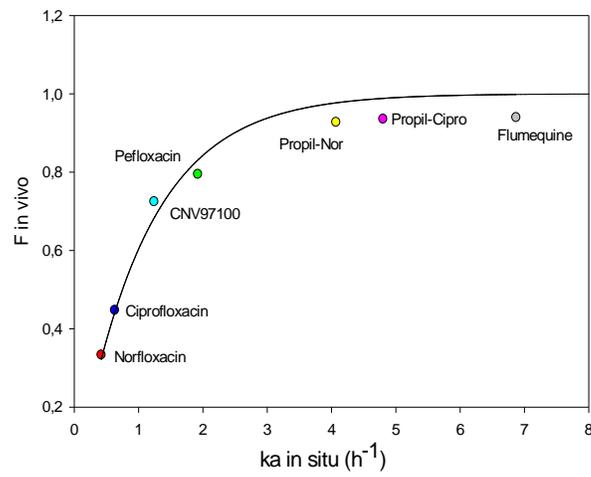


Figura II.15 Correlación entre K_a in situ y biodisponibilidad oral de rata para siete quinolonas.

Se han utilizado dosis elevadas para calcular la K_a y realizar las correlaciones con lipofilia y fracción absorbida, con el fin de tener en cuenta únicamente el componente pasivo del proceso de absorción. Por lo tanto el posible mecanismo de efflux está saturado, pero es muy importante conocer la existencia de estos mecanismos porque podrían evitar las interacciones entre fármacos, así como explicar mejor su distribución y eliminación, ya que la Glicoproteína P está también presente en muchos otros tejidos¹³⁴. De la figura puede deducirse que una constante de velocidad de absorción de 2 h^{-1} en intestino delgado de rata es suficiente para garantizar una fracción absorbida superior a 85%.

3. Métodos *in vitro*

3.1 Membranas artificiales

El principal objetivo de los ensayos de permeabilidad en membranas artificiales (“*parallel artificial membrana permeation assay*”, PAMPA) es la clasificación de los compuestos que se absorben de forma pasiva, y fundamentalmente, aquellos que lo hacen por transporte transcelular. El método PAMPA se basa en la utilización de una placa de microvaloración con numerosos insertos de naturaleza hidrofóbica como soporte y una membrana de permeación de los compuestos en estudio formada por una mezcla de lecitina y un disolvente orgánico inerte ¹³⁵.

Este sistema permite la realización de ensayos múltiples. Por tanto, su principal ventaja es la posibilidad de investigar numerosos compuestos por día. Por el contrario, la desventaja que presenta es que proporciona una clasificación sencilla de los solutos estudiados en baja, media y alta probabilidad de absorción intestinal.

En etapas posteriores, se han hecho modificaciones en el método para tener en cuenta la difusión paracelular ¹³⁶ y se han correlacionado los datos de permeabilidad en Caco-2 con los obtenidos con éstas membranas artificiales de numerosos compuestos ¹³⁷.

3.2 Fracciones subcelulares

Uno de los métodos para estudiar los mecanismos de transporte de los compuestos que se absorben a través de la vía transcelular son las fracciones subcelulares, como las vesículas de membrana obtenidas del borde en cepillo de los enterocitos (“*Brush Border Membrane Vesicles*”, BBMV) o las vesículas de la membrana basolateral de éstos (“*Basolateral Membrane Vesicles*, BLMV)^{138,139}. En ocasiones, se han realizado estudios utilizando preparaciones simultáneas de BBMV y BLMV¹⁴⁰.

Estas vesículas se preparan a partir de diversos tejidos, por homogeneización y sedimentación diferencial de los mismos (producida generalmente por centrifugación en gradiente de densidad y precipitación diferencial) y posterior fraccionamiento. En el caso de BLMV se lleva a cabo, además, un subfraccionamiento. Finalmente se caracterizan los transportadores de membrana mediante marcadores enzimáticos¹⁴¹.

Los tejidos utilizados para la preparación de estas vesículas proceden del hombre o, más frecuentemente, de especies animales como la rata, el ratón y el cerdo.

Estas técnicas estudian los mecanismos de transporte de los solutos y su localización en la vesícula. El soluto puede transportarse hacia el espacio intravesicular o disolverse en la membrana lipídica. Sin embargo, las fracciones subcelulares pueden no ser útiles para el estudio de la absorción oral, ya que la extrapolación de la magnitud y la velocidad de absorción obtenidas en este sistema a un sistema *in vivo* resulta muy difícil. Por otra parte, en el proceso de aislamiento, la membrana y sus portadores pueden resultar parcialmente dañados.

3.3 Tejidos aislados

Los tejidos aislados que se utilizan para la realización de estudios de permeabilidad de fármacos se obtienen generalmente de animales, si bien, en ocasiones, se emplean tejidos humanos.

Existen dos grandes tipos de sistemas experimentales que se basan en ellos: cámaras de difusión y sacos evertidos.

Las **cámaras de difusión** son modelos de absorción que cuantifican el flujo transepitelial de fármacos a través del tejido epitelial intacto. El segmento intestinal que se somete a estudio se aísla y secciona convenientemente con el fin de obtener capas planas de tejido. Éstas se disponen posteriormente sobre las células de difusión estándar, disponible comercialmente, que se rellenan con un tampón adecuado que simula los fluidos extracelulares¹⁴¹.

Este sistema experimental es muy versátil y permite la cuantificación de la permeabilidad de un tejido, el transporte intestinal paracelular y transcelular, la secreción intestinal y la influencia del metabolismo intestinal en la biodisponibilidad de un fármaco¹⁴².

El método de **sacos evertidos** se emplea en la realización de estudios de acumulación de fármacos en segmentos intestinales completos. Para ello, los segmentos intestinales se invierten y dividen en pequeñas secciones a modo de anillos. Éstos se incuban, en tampones oxigenados que contienen el fármaco problema, en condiciones de agitación y temperatura controladas¹⁴³.

El sistema de sacos evertidos permite el estudio de las limitaciones a la absorción intestinal de un fármaco debido a su solubilidad, la evaluación de la

conversión de un profármaco en fármaco por la acción del tejido intestinal, así como la discriminación de los mecanismos de absorción de fármacos en transporte pasivo o activo ^{143,144}.

4. Modelos celulares

Dentro de los métodos *in vitro* encontramos los procedimientos que utilizan células intestinales aisladas y cultivadas que están limitados a estudios de acúmulo de fármaco en el interior de las células más que a estudios de transporte. La principal dificultad de trabajo con estas células (generalmente enterocitos) es que están altamente polarizados bioquímica, morfológica y funcionalmente ¹⁴⁵. Las zonas apical y basolateral de la membrana son esencialmente diferentes. Las células en suspensión rápidamente se fusionan y despolarizan, perdiendo de esta forma la diferenciación entre las zonas antes mencionadas. Siempre que se mantenga la polaridad y se formen uniones intercelulares ajustadas, estas células serán representativas de la función de barrera que realiza el tracto intestinal ¹⁴¹, pero no se consigue con células aisladas. Así pues, el sistema *in vitro* consistente en una monocapa de células del epitelio intestinal, similares a las que se encuentran en el intestino delgado, con la polarización descrita, es el más adecuado para realizar estudios de transporte y metabolismo.

4.1 Líneas celulares

Se han realizado numerosos intentos para reproducir la barrera intestinal, pero no siempre se han obtenido resultados satisfactorios porque las células del epitelio intestinal en cultivo no mantienen las características morfológicas y

biológicas deseadas ¹⁴⁵. Sin embargo, los resultados han sido satisfactorios con determinadas líneas celulares transformadas. En este contexto cabe citar las células de carcinoma de colon humano, como Caco-2 y HT-29, que sufren diferente nivel de diferenciación celular en cultivo. Las células Caco-2 son las que se han estudiado de forma más minuciosa por presentar, de forma espontánea, mayor diferenciación que las HT-29 o las T84 ¹².

Las líneas celulares obtenidas a partir de adenocarcinomas pueden clasificarse en cuatro tipos, según su grado de diferenciación ¹⁴⁶:

Tipo 1: Células que se diferencian espontáneamente bajo condiciones normales de cultivo. En ellas se observa una polarización de las células con formación de domes y un óptimo desarrollo de los bordes en cepillo apicales, con gran cantidad de hidrolasas, como la lactasa, la sucrasa-isomaltasa. Únicamente una línea celular pertenece a este grupo, las células Caco-2.

Tipo 2: Son células que no se diferencian espontáneamente, sólo bajo determinadas condiciones. A este grupo pertenecen tres líneas: las HT-29, las HCT-EB y las HCT-GEO. Su diferenciación se puede inducir por alteración de las condiciones de cultivo, como sucede con las HT29 al reemplazar glucosa por galactosa ¹².

Tipo 3: Son células organizadas en monocapas polarizadas con formación de domes, pero sin presentar ninguna de las características de la diferenciación enterocítica. Por ejemplo, no expresan hidrolasas en el borde en cepillo. Dentro de este tipo se incluyen ocho líneas celulares entre las que destacan las HRT-18 y las SW-1116 ¹⁴⁷.

Tipo 4: Son células que crecen en multicapas, sin signos de diferenciación. Dentro de este grupo se incluyen las líneas celulares HCA7 y SW480.

4.1.1 Línea celular Caco-2

En los últimos años se ha trabajado en la puesta a punto de modelos celulares homogéneos, reproducibles y, sobre todo, fáciles de manipular y que, a su vez, mantengan las características morfológicas y funcionales de los enterocitos maduros.

Las ventajas que presentan los cultivos celulares frente a los modelos de absorción convencionales son:

1. la rápida determinación de la permeabilidad y metabolismo de los fármacos
2. el estudio de los mecanismos de absorción bajo condiciones controladas
3. la evaluación rápida de métodos que mejoren la absorción de fármacos
4. la realización de estudios con líneas celulares humanas
5. minimizar la experimentación animal

Actualmente, las monocapas de células Caco-2 cultivadas en filtros permeables se utilizan para la realización de estudios de transporte transepitelial de numerosos fármacos y nutrientes (como se plasma en la revisión escrita por

Delie y Rubas)¹⁴⁸. En muchos casos es posible investigar si un fármaco es transportado de forma activa o pasiva a través del epitelio intestinal y, si el transporte es activo, permite identificar el portador más importante^{149,150}.

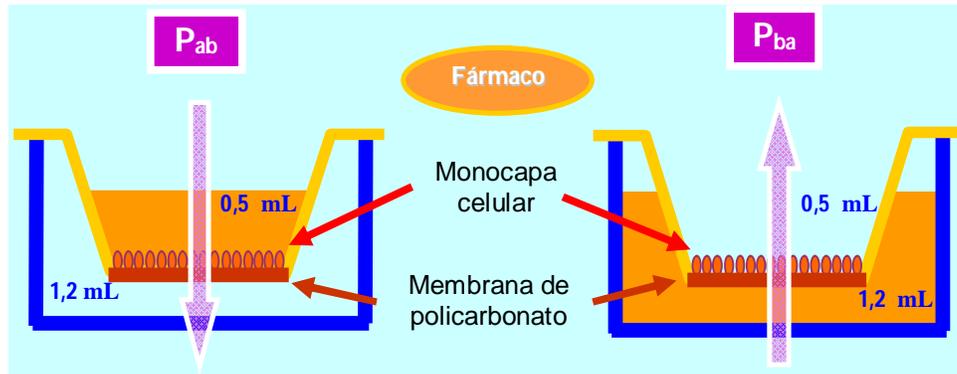


Figura II.16 Esquema de la técnica de estudio del transporte transepitelial de un compuesto *in vitro* con monocapas Caco-2

La línea celular Caco-2 fue establecida por Fogh y colaboradores en 1977¹⁵¹ a partir de carcinoma de colón humano. Es la única línea celular capaz de diferenciarse morfológica y funcionalmente a células con gran similitud a enterocitos, de manera espontánea^{152,153}.

Este tipo de células presentan uniones estrechas (*tight junctions*) además de una clara polarización (cara apical y basal). En la cara apical muestran el borde en cepillo.

Otra característica importante que asemeja esta línea celular a la membrana intestinal es la existencia de muchas de las enzimas del borde en cepillo como hidrolasas (aminopeptidasa-N, fosfatasa alcalina, olipeptidilpeptidasa IV,

sacarosa-isomaltasa, lactasa) y enzimas de fase III como la Glicoproteína-P y otros sistemas de transporte especializado para aminoácidos, dipéptidos, vitaminas y citostáticos¹⁵⁴. Asimismo, la membrana basolateral está asociada a actividad ATP-asa dependiente de sodio-potasio y a receptores hormonales. También se encuentran enzimas intracelulares, tanto de fase I (oxidación), como las CYP, incluida la CYP3A, y de fase II (conjugación), como la glutatión S-transferasa y sulfotransferasa^{155,156}.

El primer estudio en el que se estableció una correlación entre el coeficiente de permeabilidad obtenido en monocapas Caco-2 y la fracción de fármaco absorbida después de su administración oral en humanos, sugería que estas monocapas podrían utilizarse para identificar fármacos con posibles problemas a nivel de absorción¹⁵⁷.

Estudios más recientes indican que este modelo *in vitro* permite clasificar la permeabilidad de los fármacos de forma similar a otros modelos de absorción más complejos, como los tejidos intestinales aislados o los modelos de perfusión *in situ*¹.

En resumen, los resultados obtenidos hasta la fecha indican que las monocapas de células Caco-2 pueden utilizarse para predecir el transporte de fármacos a través de diferentes vías en el epitelio intestinal. Las mejores correlaciones con la fracción absorbida *in vivo* se obtienen para fármacos que se absorben de forma pasiva y rápida. Para aquellos fármacos que no se absorben de forma completa o que lo hacen utilizando sistemas transportadores la relación entre los coeficientes de permeabilidad obtenidos en células Caco-2 y la absorción *in vivo* parece ser más cualitativa que cuantitativa.

Finalmente, es necesario tener en cuenta que existen diferencias entre los valores de permeabilidad obtenidos para un mismo fármaco en distintos laboratorios, debido a la variabilidad en las condiciones experimentales y en las propias líneas celulares ¹².

4.1.2 Línea celular MDCK

Las MDCK (Madin Darby canine kidney) son la línea celular epitelial más estudiada con respecto a su genética, composición lipídica, expresión de proteínas y otros parámetros. Más recientemente, las MDCK comenzaron a usarse en estudios de transporte celular ¹⁵⁸.

Esta línea celular fue establecida en los años 50. Existen dos subclones. El tipo I, con unos valores de TEER sobre los 4000 $\Omega \text{ cm}^2$ y el tipo II que posee unas medidas de TEER alrededor de 200 a 300 $\Omega \text{ cm}^2$. Para los ensayos de transporte se usan las MDCK tipo II ¹⁵⁸.

Si sembramos estas células en membranas policarbonatadas con una densidad de 5×10^4 cels/ cm^2 alcanzan la confluencia a los 2 días y llegan a la fase de crecimiento estacionario tras 7 días con una densidad celular de 5×10^5 cels/ cm^2 ¹⁵⁸.

4.1.3 Línea celular MDCK-MDR1

Las células MDCK tipo II fueron transfectadas con el gen *mdr-1*, que codifica a la P-gp, creando así una nueva línea celular denominada MDCK-MDR1. El éxito de este hecho reside en la construcción de una herramienta para el estudio de sustratos e inhibidores potenciales de la P-gp ¹⁵⁸.

Las MDCK-MDR1 presentan una curva de crecimiento similar a las MDCK, bajo idénticas condiciones de crecimiento. Presentan unas medidas de TEER superiores a $1000 \Omega \text{ cm}^2$, con una fluctuación máxima de $10000 \Omega \text{ cm}^2$ ¹⁵⁸.

Como consecuencia de la transfección con el gen *mdr-1*, las MDCK-MDR1 expresan grandes cantidades de P-gp¹⁵⁸.

4.2 Aplicaciones en investigación

4.2.1 Cálculo de la Permeabilidad

Los valores de la Permeabilidad se calculan por regresión lineal de las cantidades acumuladas de fármaco en el compartimento receptor frente al tiempo, de acuerdo con esta expresión:

$$P_{ef} = \frac{b}{S \cdot C}$$

donde P_{ef} es el coeficiente de permeabilidad efectiva, b es la pendiente de la regresión, S el área de difusión y C , la concentración inicial del fármaco en estudio.

Cuando los ensayos son realizados con un mismo pH en la cámara dadora y en la receptora, el cociente de la permeabilidad basal-apical y apical-basal puede ser usado para detectar la presencia de transportadores de secreción y de absorción.

4.2.2 Caracterización cinética de los procesos de transporte

Para poner en evidencia la existencia o no de transportadores implicados en el mecanismo de absorción de un compuesto, hay que diseñar un estudio donde se ensayen diferentes concentraciones de dicho compuesto.

En primer lugar se analiza estadísticamente la hipótesis de igualdad de los valores de las permeabilidades en sentido Apical-Basolateral y opuesto obtenidos a las distintas concentraciones del compuesto.

Una vez establecida la existencia de diferencias significativas se realiza un ajuste a una cinética combinada de Michaelis-Menten y de primer orden, según los modelos que se ilustran en las figuras siguientes, asumiendo un transporte pasivo y un transporte activo debido, por ejemplo, a la presencia de un transportador de secreción (efflux)¹⁵⁹ para comparar los valores obtenidos en los parámetros de bondad de ajuste con los obtenidos con el diseño de una cinética más compleja.

En primer lugar se consideran las diferentes posibilidades de localización del transportador en la cara apical o basolateral de la célula. Un segundo factor a considerar a la hora de establecer la cinética de absorción es la localización del lugar de unión al portador. Si se asume una distribución inmediata del compuesto en el compartimento dador con el interior de las células la presencia del lugar de unión al portador se convierte en un factor de relevancia.

Los posibles modelos se representan en las Figuras II.17 y II.18¹⁵⁹.

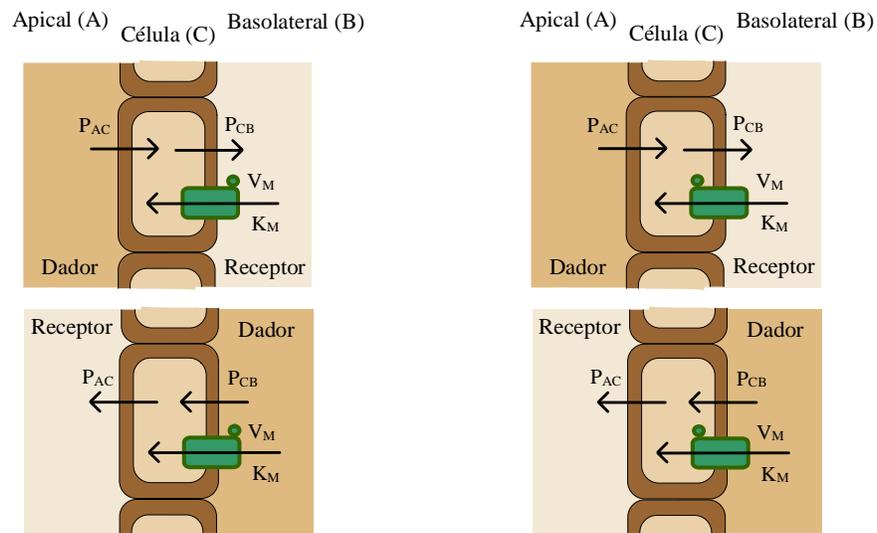


Figura II.17 Posición basolateral del transportador con punto de unión extracelular (dibujo de la izquierda) o intracelular (dibujo de la derecha).¹⁵⁹

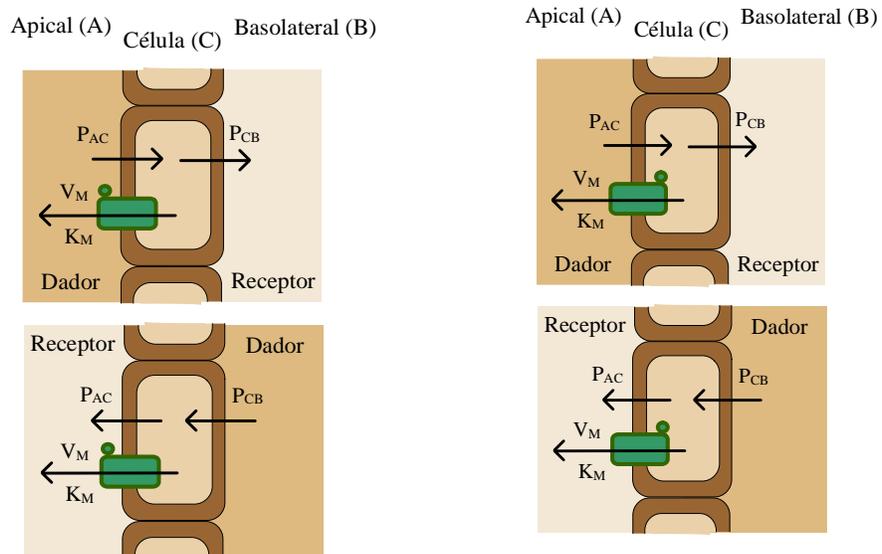


Figura II.18 Posición apical del transportador con punto de unión extracelular (dibujo de la izquierda) o intracelular (dibujo de la derecha).¹⁵⁹

Se realiza el ajustado conjunto de las experiencias en sentido AB y BL utilizando las siguientes ecuaciones para dicho ajuste:

Transportador basolateral con el punto de unión fuera de la célula:

$$\begin{aligned}\frac{dA}{dt} &= P_{AC}(C - A) \\ \frac{dC}{dt} &= -P_{CB}(C - B) - P_{AC}(C - A) + \frac{V_M + B}{K_M + B} \\ \frac{dB}{dt} &= P_{CB}(C - B) - \frac{V_M + B}{K_M + B}\end{aligned}$$

Transportador basolateral con el punto de unión dentro de la célula:

$$\begin{aligned}\frac{dA}{dt} &= P_{AC}(C - A) \\ \frac{dC}{dt} &= -P_{CB}(C - B) - P_{AC}(C - A) + \frac{V_M + C}{K_M + C} \\ \frac{dB}{dt} &= P_{CB}(C - B) - \frac{V_M + C}{K_M + C}\end{aligned}$$

Transportador apical con el punto de unión fuera de la célula:

$$\begin{aligned}\frac{dA}{dt} &= P_{AC}(C - A) + \frac{V_M + A}{K_M + A} \\ \frac{dC}{dt} &= -P_{CB}(C - B) - P_{AC}(C - A) - \frac{V_M + A}{K_M + A} \\ \frac{dB}{dt} &= P_{CB}(C - B)\end{aligned}$$

Transportador apical con el punto de unión dentro de la célula:

$$\begin{aligned}\frac{dA}{dt} &= P_{AC}(C - A) + \frac{V_M + C}{K_M + C} \\ \frac{dC}{dt} &= -P_{CB}(C - B) - P_{AC}(C - A) - \frac{V_M + C}{K_M + C} \\ \frac{dB}{dt} &= P_{CB}(C - B)\end{aligned}$$

en las que dA/dt , dC/dt y dB/dt son las cantidades acumuladas en el compartimento apical, celular o basal respectivamente ^{132,159}.

Si las permeabilidades obtenidas a las diferentes concentraciones estudiadas sugirieran la posible presencia de más de un transportador implicado tanto en el sentido de absorción (influx) como en sentido de secreción (efflux) el modelo sería más complicado, tal y como se detallan en las Figuras II.19 - II.27. Su importancia y la predominancia de uno sobre otro dependerá tanto de la concentración de compuesto a transportar como de los parámetros que caracterizan los transportadores (V_M y K_M) ¹⁶⁰.

En la elaboración de los modelos se definen también dos compartimentos, apical y basolateral aunque se presenta cuatro para facilitar la comprensión. De esta forma, los compartimentos A (1) y A (3) corresponden al compartimento apical, y B (2) y B (4) al basolateral, variando el compartimento que actúa de dador y de receptor. En estos casos los parámetros que definen los transportadores de efflux (secreción) e influx (absorción) son V_M y K_M , y V_{M2} y K_{M2} respectivamente ¹⁶⁰.

De acuerdo con la posición apical o basal de cada transportador, así como del lugar de unión del compuesto con el transportador, extracelular o intramembrana e intracelular se propondrían 16 modelos, asumiendo que existen solo dos transportadores. Debido a que en algunos modelos las ecuaciones resultantes son idénticas, el número de modelos se reduce a 9 que se detallan a continuación ¹⁶⁰.

Modelo 1

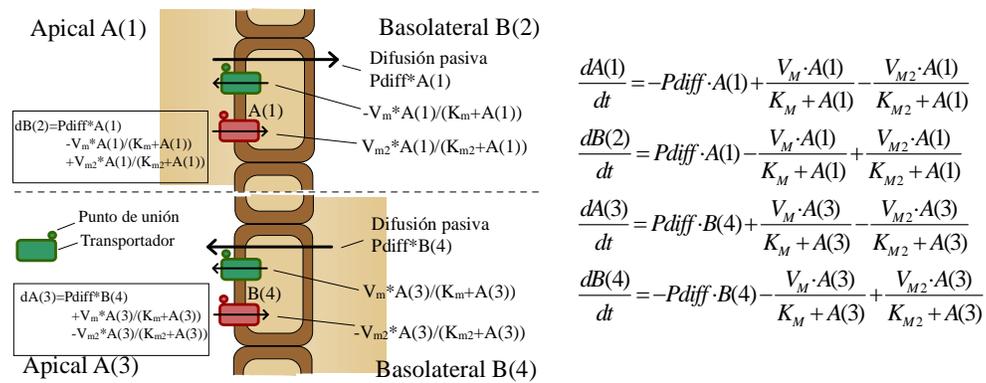


Figura II.19 Posición apical del transportador de efflux con punto de unión extracelular o intramembrana, transportador de influx apical con punto de unión extracelular o intramembrana.

Modelo 2

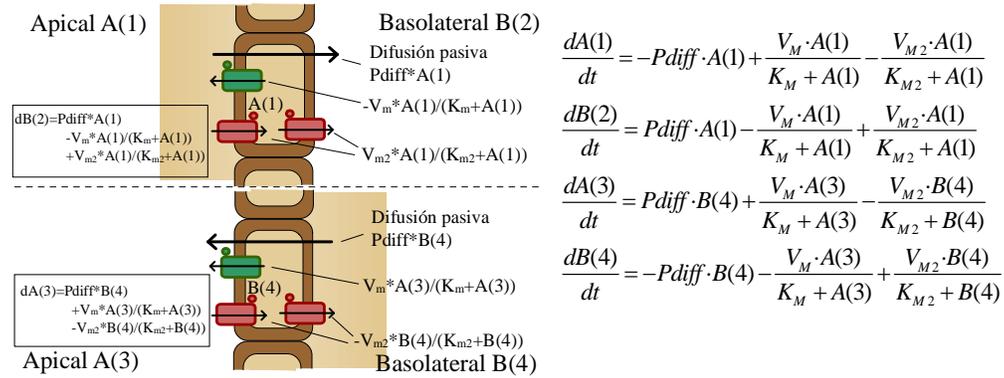


Figura II.20 Posición apical del transportador efflux con punto de unión extracelular o intramembrana, transportador de influx apical o basal con punto de unión intracelular.¹⁶⁰

Modelo 3

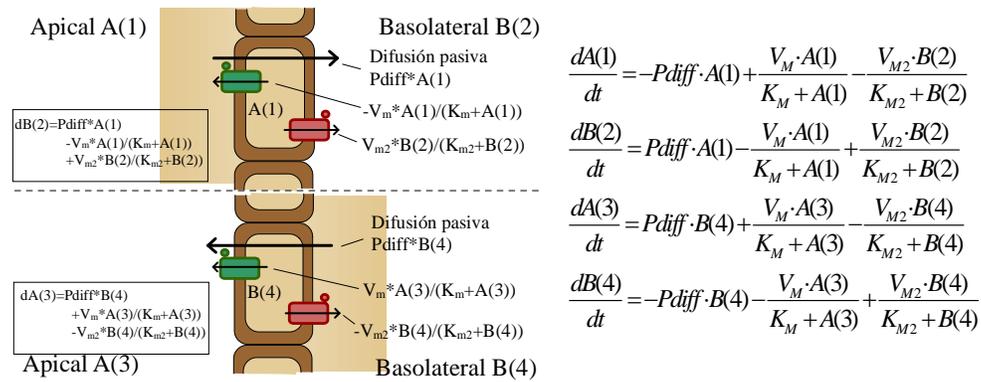


Figura II.21 Posición apical del transportador efflux con punto de unión extracelular o intramembrana, transportador de influx basal con punto de unión extracelular o intramembrana.¹⁶⁰

Modelo 4

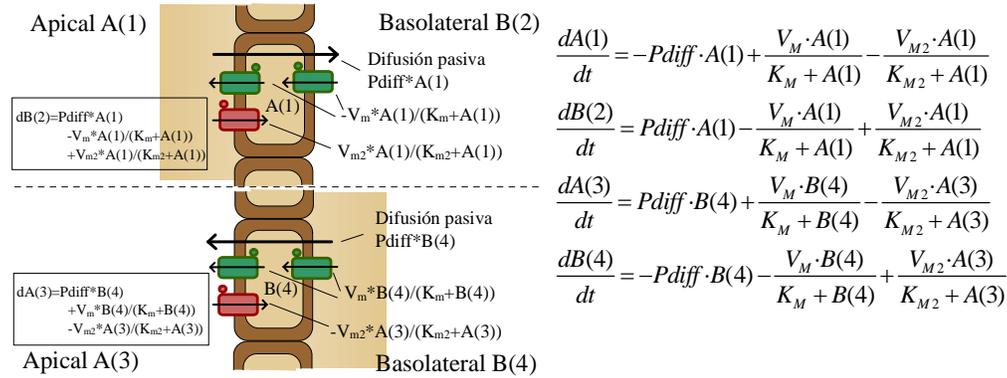


Figura II.22 Posición apical o basal del transportador de efflux con punto de unión intracelular, transportador de influx apical con punto de unión extracelular o intramembrana.¹⁶⁰

Modelo 5

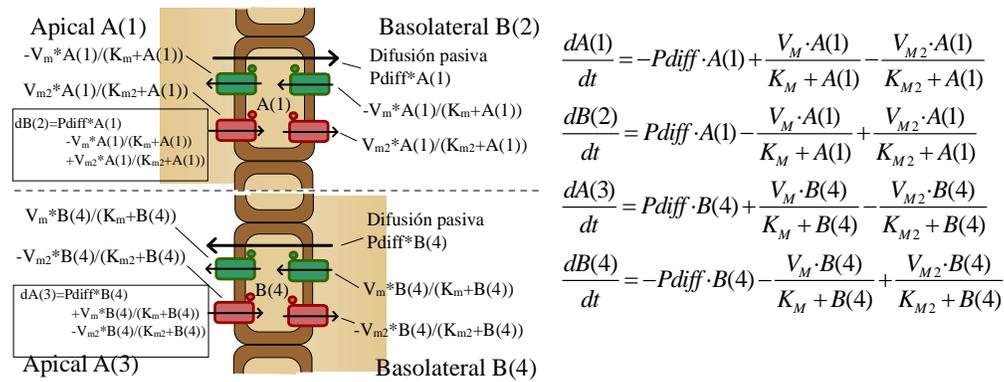


Figura II.23 Posición apical o basal del transportador de efflux con punto de unión intracelular, transportador de influx apical o basal con punto de unión intracelular.¹⁶⁰

Modelo 6

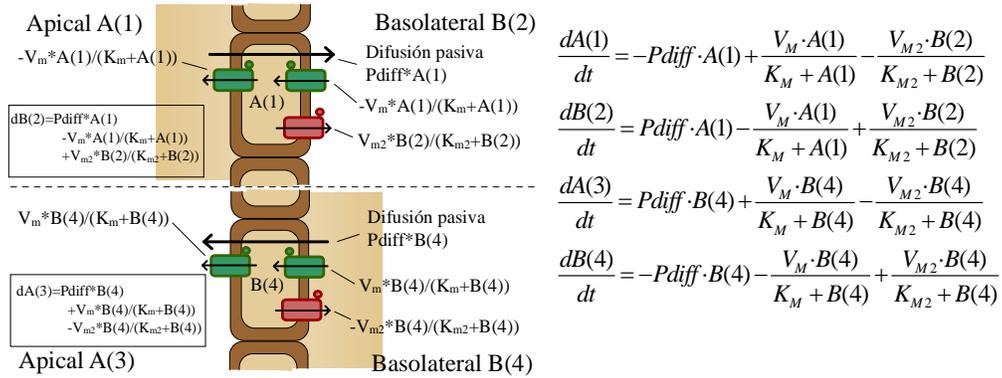


Figura II.24 Posición apical o basal del transportador de efflux con punto de unión intracelular, transportador de influx basal con punto de unión extracelular.¹⁶⁰

Modelo 7

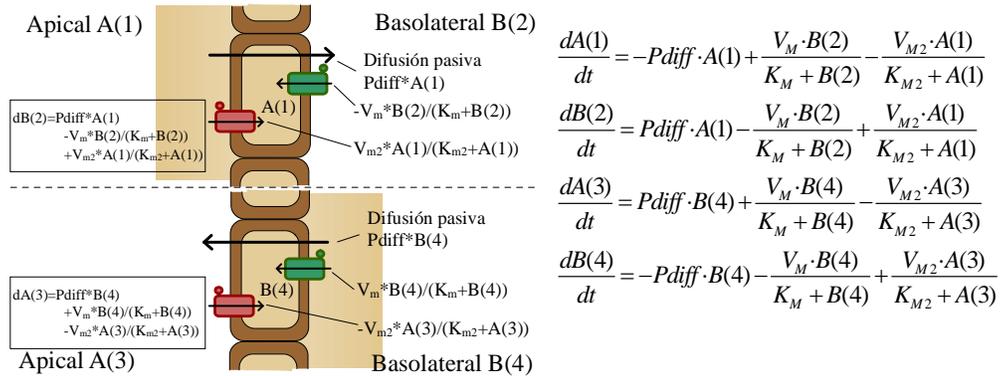


Figura II.25 Posición basal del transportador de efflux con punto de unión extracelular o intramembrana, transportador de influx apical con punto de unión extracelular o intramembrana.¹⁶⁰

Modelo 8

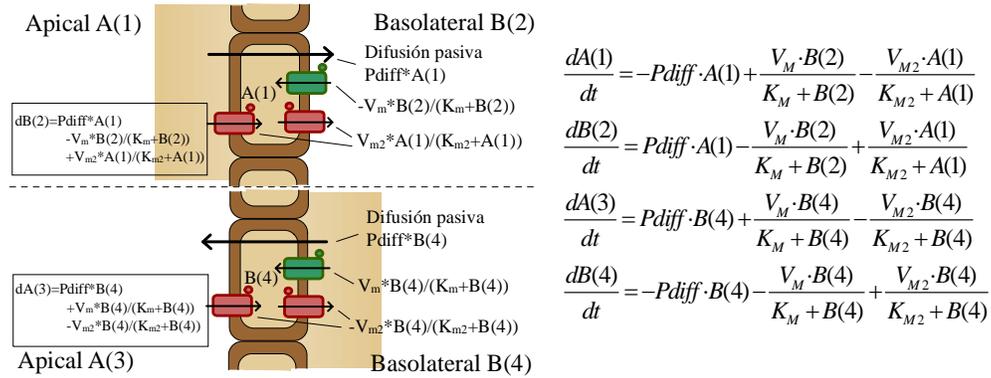


Figura II.26 Posición basal del transportador de efflux con punto de unión extracelular o intramembrana, transportador de influx apical o basal con punto de unión intracelular.¹⁶⁰

Modelo 9

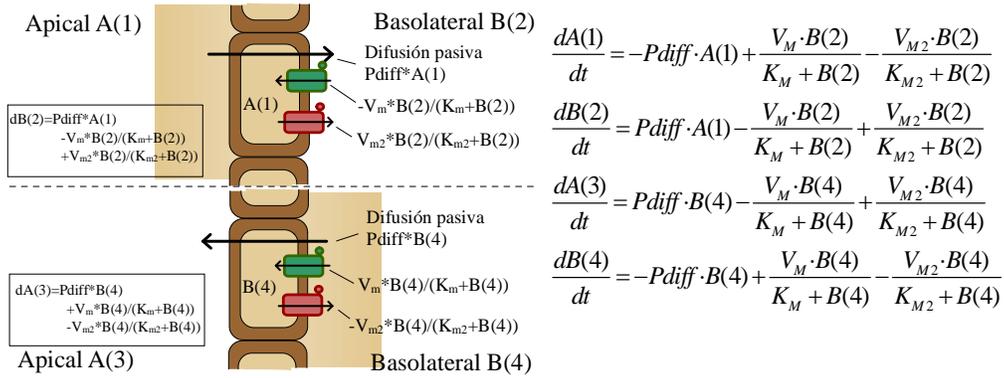


Figura II.27 Posición basal del transportador de efflux con punto de unión extracelular o intramembrana, transportador de influx basal con punto de unión extracelular o intramembrana.¹⁶⁰

4.2.3 Determinar la existencia de metabolismo intestinal

Para averiguar si el compuesto ensayado sufre algún proceso de metabolismo intestinal se determina el balance de masas.

$$C_{\text{inicial}} = C_{\text{Fdador}} + C_{\text{Freceptor}} + C_{\text{celular}}$$

donde C_{inicial} es la concentración inicial del compuesto, C_{Fdador} es la concentración final en la cámara dadora, $C_{\text{Freceptor}}$ es la concentración en la cámara receptora obtenida en la última muestra y C_{celular} es la concentración de fármaco que se ha quedado retenida en la membrana y en el interior de las células intestinales.

Si no se cumple esta igualdad se debe a que el fármaco sufre algún proceso de metabolismo intestinal.

4.2.4 Correlaciones *in vitro-in vivo*

Las monocapas celulares Caco-2 son un modelo *in vitro* ampliamente reconocido para la predicción de la permeabilidad cuando los compuestos se absorben mediante difusión pasiva. Los compuestos que se absorben completamente presentan unos coeficientes altos de permeabilidad ($P_{\text{app}} > 1 \times 10^{-6}$ cm/s) y los compuestos que presentan una absorción incompleta tienen coeficientes de permeabilidad más bajos ($P_{\text{app}} > 1 \times 10^{-7}$ cm/s) en monocapas Caco-2 ¹.

La limitación en muchos estudios tempranos de correlación entre la permeabilidad en Caco-2 y la absorción in vivo es el uso de fármacos que presentan transporte pasivo bien por la ruta paracelular o la transcelular sin considerar los fármacos con un transporte mediado por un transportador. Intentos recientes de incluir fármacos con transporte activo en la correlación dan resultados variables ¹.

Los valores de permeabilidad de los compuestos en monocapas Caco-2, que predicen su absorción completa o incompleta, varían considerablemente entre los distintos laboratorios. Las correlaciones establecidas con la fracción absorbida en humanos son cualitativamente similares entre los laboratorios ¹⁶¹⁻¹⁶³. La comparación que se muestra en la Figura II.2 indica la necesidad de estandarización de los cultivos Caco-2. Las comparaciones directas de los valores de permeabilidad obtenidos en diferentes laboratorios sólo serían posibles usando la misma población de células Caco-2 y las mismas condiciones de cultivo.

La mejor correlación conseguida entre las permeabilidades obtenidas en monocapas Caco-2 y la fracción absorbida en humanos se observa en los compuestos que presentan transporte pasivo ¹.

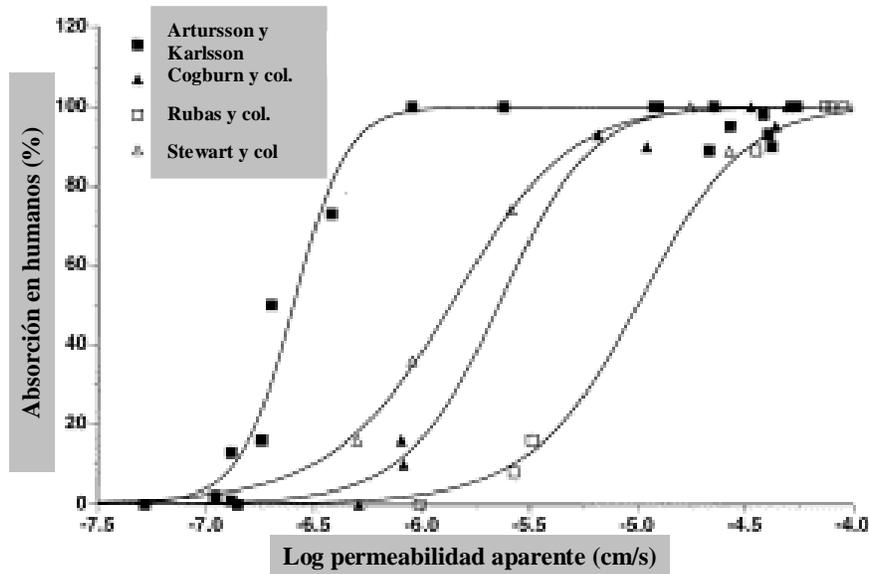


Figura II.28 Correlación entre la fracción absorbida en humanos tras la administración oral (expresado en % de la dosis de fármaco administrada) y la permeabilidad en Caco-2 obtenida en 4 laboratorios diferentes ¹

La comparación del transporte de fármacos en monocapas Caco-2 con el transporte intestinal *in vivo* indica que las Caco-2 pueden ser utilizadas para predecir el transporte de compuestos por diferentes vías a través del epitelio intestinal ^{164, 165}. La mejor correlación se obtiene con los compuestos que tienen un transporte pasivo transcelular. La ruta paracelular es menos permeable en las monocapas celulares que *in vivo*, pero los datos obtenidos hasta ahora indican que la selectividad de esta vía es comparable con la situación *in vivo* ¹.

C. La variabilidad en los ensayos de permeabilidad intestinal

La absorción intestinal es uno de los factores que determinan el éxito de un fármaco que está destinado a la administración por vía oral. Por ello, los modelos predictivos de la absorción intestinal de los fármacos son importantes en las etapas tempranas del desarrollo de medicamentos para acelerar la identificación de compuestos prometedores.

La permeabilidad es uno de los factores que afectan a la absorción intestinal de los fármacos, siendo su determinación el objeto de los modelos experimentales desarrollados por muchos investigadores.

Los cultivos celulares proporcionan una metodología de predicción de la absorción oral de fármacos, utilizando monocapas celulares con un sistema de difusión entre dos compartimentos, que mimetizan el paso del fármaco desde el lumen intestinal al torrente sanguíneo. El modelo de cultivo celular ideal es aquel que imita las características físicas y bioquímicas de la barrera epitelial intestinal. El empleo de estos ensayos en la investigación farmacéutica también permite determinar la presencia o no de mecanismos especializados de transporte, los efectos del pH gastrointestinal en la absorción de fármacos y el efecto de los excipientes en la permeabilidad intestinal.

1. Factores pre-experimentales

1.1 Rata

Las ratas de laboratorio actualmente constituyen uno de los modelos animales de investigación más extendidos. Han sido la clave para muchos avances médicos. Todas ellas son de la especie *Rattus norvegicus*, pero a través de la selección y cruzamiento de generaciones de distintas líneas genéticas se han creado diferentes cepas.

La primera de éstas, diseñada para su uso en laboratorios, fue la Wistar de la ciudad de Filadelfia, Estados Unidos; es considerada la madre de las ratas de laboratorio. A partir de ella se han creado cerca de 500 variedades con una formación genética definida para poder ajustarse a varios experimentos.

Las razas más empleadas en estudios de absorción son la Sprague-Dawley¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ y la Wistar¹⁶⁹⁻¹⁷¹.

Nuestro grupo de investigación ha utilizado ratas Wistar Unilever durante décadas¹⁶⁹⁻¹⁷¹ por ser la raza disponible en nuestro propio estabulario. Las distintas razas de rata están accesibles a través de compañías distribuidoras como Laboratorios Harlan, siendo su tiempo medio de provisión alrededor de 15 días y su precio varía según la raza y el sexo seleccionado. (Tabla II. 4)

		PRECIO (€) (200g peso)	TIEMPO SERVICIO (días)	DISPOSICIÓN ANIMALARIO
WISTAR UNILEVER	MACHO	14,00	1	SI
	HEMBRA	14,75	1	SI
WISTAR HAN	MACHO	11,90	15	NO
	HEMBRA	11,80	15	NO
SPRAGUE DAWLEY	MACHO	12,40	15	NO
	HEMBRA	12,15	15	NO
LONG EVANS	MACHO	22,90	15	NO
	HEMBRA	23,30	15	NO
CD*IGS	MACHO	14,09	15	NO
	HEMBRA	14,09	15	NO

Tabla II.4 Precio por animal, tiempo de servicio del proveedor al animalario y disposición de las diferentes razas en el animalario de la Universidad de Valencia ¹¹⁹⁻¹²³

Entre los factores pre-experimentales en ratas que conducen a la obtención de medidas de permeabilidad diferentes para un mismo fármaco están la raza y el sexo. Es por ello importante detallar al publicar los resultados la raza particular utilizada y el sexo del animal.

1.2 Cultivos celulares

Los ensayos de permeabilidad se dividen en 3 fases de trabajo: cultivo celular, ensayo de permeabilidad y análisis de los datos¹⁷², y cada fase está condicionada por factores que pueden incrementar la variabilidad en los resultados obtenidos.

La fase de cultivo celular consiste en el crecimiento de las células en “flasks” y su posterior cultivo en monocapas sobre membranas semiporosas. El ensayo de permeabilidad consiste en el transporte del fármaco a través de la monocapa celular. La fase de análisis de datos incluye la medida del fármaco en las muestras y el cálculo de la permeabilidad aparente in vitro.

Fase	Parámetros	Efectos
Cultivo celular	Heterogeneidad y diferenciación Medio de cultivo, aditivos Pase celular Edad de la monocapa y confluencia Densidad sembrado celular	Diferenciación de las células Mecanismos de transportadores desarrollados por la monocapa
Ensayo de permeabilidad	Tampón de transporte, pH, Temperatura Concentración del Fármaco Integridad de la monocapa Agitación	Permeabilidad a través de las células y del filtro Ionización del fármaco

Análisis de los datos	Ecuación de Permeabilidad Método de análisis del fármaco Medir aparición en compartimento receptor Medir desaparición en compartimento dador	Resultados P_{app} Correlaciones <i>in vitro-in vivo</i>
-----------------------	---	---

Tabla II.5 Fases de los ensayos de permeabilidad intestinal ¹⁷²

La variabilidad en muchos de estos parámetros conduce a la obtención de medidas de permeabilidad diferentes para un mismo fármaco.

1.2.1 Pase celular

Briske-Anderson y col.¹⁷³ demostraron que en la línea celular Caco-2 existían cambios en las medidas de la resistencia transepitelial (TEER) y en el crecimiento celular producidos por el pase celular. A mayor pase celular, mayor era el TEER y la ratio de crecimiento. Determinaron que el intervalo óptimo de pase celular para la realización de ensayos de permeabilidad en Caco-2 era entre el pase 28 y el 65.

El pase celular afecta a las características biológicas y a las propiedades de la monocapa. Se produce un incremento significativo en las medidas de TEER en pases celulares altos (97-98) con respecto a pases más bajos (43-44) ¹⁷⁴.

El proceso de pase afecta significativamente a las características biológicas y a las propiedades del transporte en monocapas Caco-2. A medida que aumenta

el pase celular se produce una reducción de los enzimas en el borde de cepillo y de varias proteínas de transporte ¹⁷⁵.

Las propiedades metabólicas de los cultivos celulares pueden variar con el pase y dependiendo de la heterogeneidad de la línea celular. En la línea celular MDCK, las medidas de TEER incrementan con el pase celular en algunos subclones pero decrecen en otros ¹⁷⁶.

1.2.2 Medio de cultivo

Los componentes del medio de cultivo y la frecuencia con la cual se cambia dicho medio, influyen en la integridad de la monocapa celular, en la permeabilidad y en la expresión de los transportadores ¹⁷⁷. Así pues, altas concentraciones de glucosa extracelular (25 vs. 0,5 mM) en medio isotónico altera significativamente las propiedades fisiológicas de las monocapas Caco-2. Cuando se cultiva con 25 mM de glucosa la fluidez de la membrana aumenta. También hay un incremento en el transporte del manitol, de la hidrocortisona y la digoxina (compuesto que presenta secreción intestinal) y se obtienen unas medidas de TEER más bajas ¹⁷⁸.

La ausencia de glutamina (necesaria para mantener la integridad de la mucosa intestinal) en el medio de cultivo produce un descenso en las medidas de TEER y un aumento de la permeabilidad del manitol.

La frecuencia con la cual se renueva el medio de cultivo afecta a los enzimas antioxidantes y a la actividad hidrolasa. El grado de expresión de la

catalasa y la glutatión reductasa, así como la actividad de la glutatión S-transferasa varía a medida que aumenta el tiempo entre las renovaciones del medio celular ¹⁷⁹.

1.2.3 Edad de la monocapa

El tiempo de crecimiento de las células en forma de monocapa influye en su morfología, en sus propiedades y en la expresión de los transportadores. El TEER aumenta con la edad de la monocapa en Caco-2 y en MDCK debido a la diferenciación y a la formación de uniones estrechas, así pues la permeabilidad del manitol disminuye en Caco-2 del día 9 al 28, debido a que el transporte que sufre este compuesto es de tipo paracelular. Lo mismo ocurre con el lucifer yellow en la línea celular MDCK ¹⁸⁰.

La ciclosporina es un compuesto sustrato de la Glicoproteína-P. La permeabilidad basal-apical (Pba) de este compuesto aumenta con la edad de la monocapa en cultivos Caco-2, y es mayor que la permeabilidad apical-basal (Pab) en todo momento ¹⁸¹. Este cambio se asocia al tiempo necesario para la completa expresión de los transportadores y la total diferenciación del entericito.

La heterogeneidad de las líneas celulares Caco-2 y MDCK, combinado con la diferencia en las metodologías conduce a una variabilidad en los resultados de P_{app} para un mismo fármaco en diferentes laboratorios. Cambios en la densidad celular alteran la proliferación y morfología de la célula, afectando a la integridad y a las propiedades de transporte de las monocapas. El tamaño del filtro es un

determinante del tiempo de confluencia y cantidad necesaria de soluto para un experimento.

La edad de la monocapa usada en el ensayo de permeabilidad influye en su maduración, formación de uniones estrechas y expresión de transportadores. El pase celular, densidad de sembrado y la edad de la monocapa influyen en el desarrollo de la monocapa. El TEER y los valores de permeabilidad están influenciados por la edad de la monocapa.

2. Factores experimentales

2.1 Rata

Con las técnicas *in situ*, el aporte neural, endocrino, sanguíneo y linfático de la zona en estudio permanece intacto. Estos modelos son, por tanto, sensibles a influencias farmacológicas y fisiológicas, por lo que se observa una gran variabilidad en comparación con los sistemas *in vitro*. Por otra parte, el montaje experimental permite conocer también el acceso del fármaco al torrente sanguíneo.

Una vez aislado el órgano en estudio se puede proceder de dos maneras: la solución a ensayar se puede mantener en el mismo¹²⁷, o bien puede someterse a un proceso de recirculación.

Existen diferentes variantes de estas técnicas en función de que la solución perfundida se someta o no a recirculación con algún sistema de bombeo.

Sistema	Método	Ventajas	Limitaciones
<i>In situ</i>	Con recirculación	Aporte sanguíneo y linfático permanece intacto Buena predicción de K_a pasiva	Menor precisión de la estimación de compuestos hidrófilos Menor rapidez en la obtención de resultados
	Sin recirculación	Aporte sanguíneo y linfático permanece intacto Buena predicción de K_a pasiva	Condiciones hidrodinámicas distintas de los ensayos <i>in vivo</i>

Tabla II. 6 Métodos *in situ* de la absorción intestinal de fármaco ^{127,142}

2.1.1 Método de paso único (con recirculación)

Esta técnica se realiza en tramos o segmentos intestinales de aproximadamente 10 cm. No puede llevarse a cabo en el intestino completo.

La solución a ensayar se perfunde durante 30 minutos para alcanzar el estado estacionario. Una vez alcanzado, el líquido de perfusión se recoge a intervalos de 10 a 15 minutos. Al menos son necesarios 6 determinaciones de estas permeabilidades individuales para evaluar la permeabilidad media con precisión. Así pues, la perfusión se realiza durante un total de 90 a 120 minutos.

2.1.2 Método de Doluisio (sin recirculación)

Esta técnica in situ es una técnica de perfusión sin recirculación. Está basada en el método de Doluisio. Puede llevarse a cabo en intestino completo como en tramos intestinales. Se crea un compartimento estanco de absorción, del que observamos cómo va desapareciendo el fármaco del lumen intestinal.

Las muestras se toman cada 5 minutos alternando las jeringas del compartimento estanco, durante 30 minutos. Esta técnica mantiene intacto el flujo sanguíneo intestinal así como la integridad de la membrana absorbente.

2.2 Cultivos celulares

2.2.1 pH

La mayor parte de la absorción de los fármacos administrados por vía oral se produce en el intestino delgado donde pH oscila de 5 a 8, aunque en el líquido intersticial y en el plasma el pH es más constante con un valor entre 7,2 y 7,4. El pH del tracto gastrointestinal afecta al grado de ionización de los fármacos. Los fármacos que sean bases débiles estarán ionizados en medio ácido, y en forma no ionizada en medio básico^{182, 183}, lo que finalmente condicionará su velocidad de transporte ya que la fracción no ionizada es la que difunde mayoritariamente¹⁷².

En los ensayos de permeabilidad se utiliza un tampón de transporte con un pH determinado para el compartimento apical y el basolateral.

Johnson y col.¹⁸⁴ estudiaron el efecto del pH del tampón tanto en el transporte Apical-Basolateral como en el Basolateral-Apical. El cambio del pH en el compartimento apical de 7,4 a 6,5, cuando se estudia el transporte Apical-Basolateral, produce un aumento en el valor de permeabilidad de los compuestos ácidos como, por ejemplo, el ibuprofeno; y un descenso de la permeabilidad en los fármacos básicos, como el propranolol, el verapamilo y la vinblastina. Cuando se estudia el transporte en dirección Basolateral-Apical y cambiamos el pH en la cámara apical de 7,4 a 6,5 se encuentra un descenso en los valores de permeabilidad de los compuestos ácidos y un incremento de la permeabilidad en los compuestos básicos. Estos cambios de pH no afectan a los compuestos neutros^{185, 186}.

El metoprolol es una base débil. Como se puede observar en la Figura II. 29, los valores de la permeabilidad efectiva de este compuesto varían conforme se va cambiando el pH en el compartimento apical. Las barras negras representan la permeabilidad Apical-Basolateral y las barras blancas, la permeabilidad Basolateral-Apical¹⁸⁵.

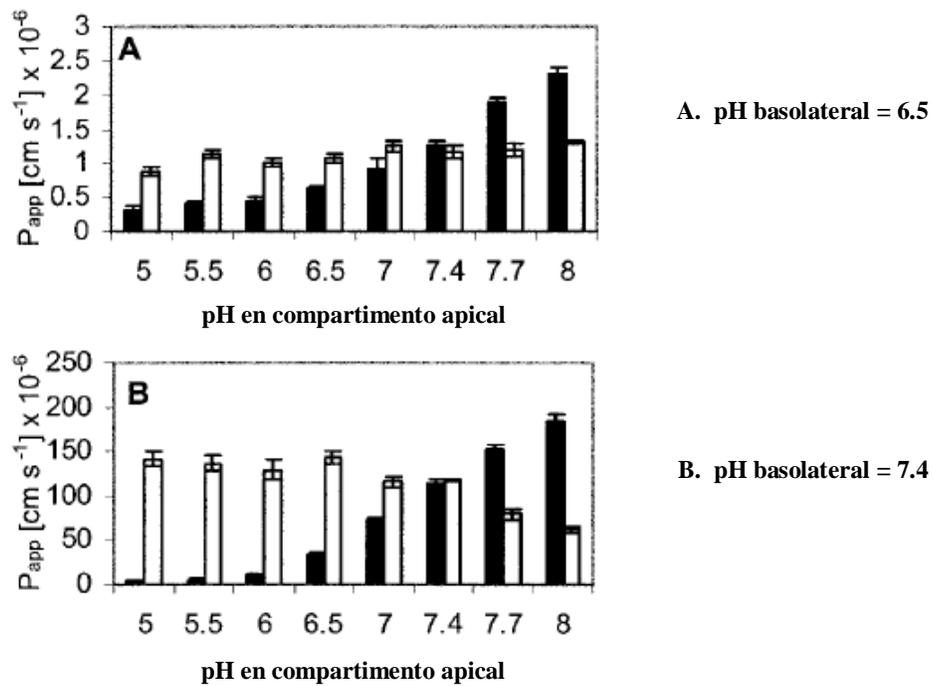


Figura II.29 Transporte bidireccional pH-dependiente del metoprolol a través de monocapas celulares Caco-2.¹⁸⁵

En el caso de la indometacina (Figura II. 30), que es un compuesto ácido, la permeabilidad Apical-Basolateral (barras negras) disminuye si aumentamos el pH en el compartimento apical, en cambio la permeabilidad Basolateral-Apical (barras blancas) va aumentando¹⁸⁶.

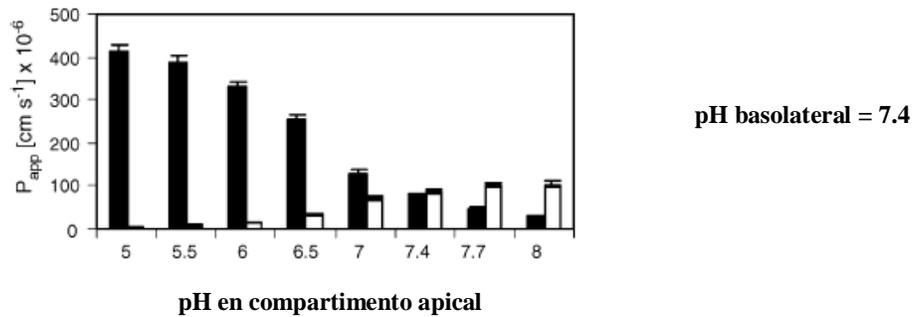


Figura II.30 Transporte bidireccional pH-dependiente de la Indometacina a través de monocapas celulares Caco-2.¹⁸⁶

2.2.2 Utilización de agitador orbital // Capa de difusión acuosa

El transporte pasivo a través de una barrera celular es una combinación de difusión a través de la monocapa y de la capa de difusión acuosa (UWL) a ambos lados de la membrana¹⁷². La agitación durante el experimento de transporte reduce el grosor de la capa acuosa estática.

Se ha demostrado un aumento del transporte transcelular y paracelular de la testosterona y del manitol, respectivamente, la Peff aumentó durante el experimento de transporte¹⁷².

Las condiciones de transporte, especialmente el pH del tampón de transporte y la agitación durante el ensayo, afectan al flujo del compuesto a través de la monocapa. Los ensayos de permeabilidad pueden realizarse en condiciones isocráticas (el pH en ambos compartimentos será de 7,4) o en gradiente (pH de la

cámara apical = 6, y pH de la cámara basolateral = 7,4). Esto va a afectar al grado de ionización de los fármacos y por tanto a su transporte pasivo y activo.

También hay que tener en cuenta el tiempo de toma de muestras así como el personal técnico experimentador encargado de realizar los ensayos de transporte que pueden incrementar o disminuir el error residual del parámetro a estimar.

3. Factores post-experimentales

3.1 Rata

3.1.1 Método de paso único (con recirculación)

La permeabilidad efectiva (P_{eff}) en los estudios de perfusión de paso único se determina a través de la siguiente ecuación:

$$P_{eff} = \frac{Q \cdot \left(1 - \frac{C}{C_0}\right)}{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L}$$

donde Q es el flujo de perfusión (ml/min), C es la concentración de fármaco a tiempo t, C_0 corresponde a la concentración inicial de fármaco disponible para la absorción ($t = 0$), R es el radio del segmento intestinal y L es la longitud del segmento de perfusión¹⁸⁷.

3.1.2 Método de Doluisio (sin recirculación)

La constante aparente de velocidad de absorción (K_{ap}) se obtiene mediante ajuste por regresión no lineal a esta ecuación:

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{ap} \cdot t}$$

donde C es la concentración de fármaco a tiempo t y C_0 corresponde a la concentración inicial de fármaco disponible para la absorción ($t = 0$).

Para obtener un valor representativo de la constante de velocidad de absorción, el ensayo se realiza en un mínimo de 6 animales para cada concentración ensayada. Tras esto se obtiene un valor medio que se considera característico de las condiciones del ensayo.

Es posible determinar los valores de permeabilidad intestinal efectiva (P_{eff}) por transformación de la constante aparente de velocidad de absorción según la siguiente ecuación:

$$P_{eff} = \frac{k_a \cdot R}{2}$$

donde R es el radio del segmento intestinal.

3.2 Cultivos celulares

3.2.1 Cálculo Peff

Condiciones Sink

El ensayo debe realizarse en condiciones de mínima concentración, condiciones sumidero o de gradiente máximo ("sink"), de modo que la concentración de fármaco en el compartimento receptor a tiempo t no rebase nunca el 10% de la concentración inicial en el compartimento dador. De esta forma el proceso puede describirse mediante la siguiente expresión:

$$\frac{dQ}{dt} = P_{ef} \cdot S \cdot C$$

en la que dQ/dt representa la velocidad de cantidad permeada, P_{ef} , el coeficiente de permeabilidad efectiva, S el área de difusión y C , la concentración inicial del fármaco en estudio.

Condiciones no Sink

En este caso no se cumple que la concentración de fármaco en el compartimento receptor a tiempo t no rebase nunca el 10% de la concentración inicial en el compartimento dador. Esto ocurre con compuestos que tienen una alta permeabilidad, como por ejemplo el paracetamol.

Se debe corregir el valor de la concentración en el compartimento dador para cada tiempo para evitar que los valores calculados de la P_{ef} estén infravalorados¹⁸².

$$\frac{M_R}{M_{D(0)}} = \left(\frac{V_R}{V_R + V_D} \right) \cdot (1 - e^{-\alpha \cdot \beta \cdot t})$$

$$\alpha = A \cdot P_{app} / V_D$$

$$\beta = \frac{V_R + V_D}{V_R}$$

donde M_R es la cantidad de fármaco en la cámara receptora, $M_{D(0)}$ es la cantidad en la cámara dadora a tiempo igual a 0, V_R y V_D son los volúmenes de ambas cámara (receptora y dadora), A es el área de difusión y P_{app} es el coeficiente de permeabilidad aparente.

3.2.2 Estimación de los componentes del transporte

Los enfoques clásicos están basados en la valoración de la velocidad inicial para obtener el coeficiente de permeabilidad aparente para una barrera simple. Este enfoque incluye la suposición de condiciones sink y la ausencia de problemas en el balance de masas. En algunos casos, este enfoque conduce a inexactitudes en la valoración del parámetro.

Por otra parte, el uso de modelos moleculares de transporte requiere de programas más sofisticados para determinar los componentes del transporte que son los parámetros cinéticos que intervienen en la ecuación matemática que explica la evaluación de la concentración de fármaco en el organismo. De esta manera se identifica la afinidad del sustrato por el portador (K_m) la velocidad máxima (V_m) a la que se realiza el modelo cinético y de los parámetros de difusión a niveles moleculares.

Los métodos para determinar los parámetros que rigen la cinética del fármaco en el organismo son dos:

Concentraciones o cantidades frente al tiempo

En este método se usan los datos obtenidos del experimento, es decir, las concentraciones (o cantidades) en la cámara receptora y se describe el sistema en forma de ecuaciones diferenciales y se realiza la integración numérica. Ejemplo de esta metodología son las ecuaciones descritas en los epígrafes 2.3.3, 2.3.4 y 4.4.4.

Permeabilidad frente a la Concentración

Este es el método clásico en el cual se representa permeabilidad efectiva a cada concentración inicial y se separa el componente difusional del componente mediado por transportadores.

D. Fármacos en estudio

1. Metoprolol

El metoprolol es un bloqueante β -adrenérgico cardioselectivo, con actividad específica sobre receptores β_1 . Tiene efecto antianginoso, antihipertensivo y antiarrítmico por reducir la frecuencia cardiaca, la contractilidad y la velocidad de conducción (efectos cronotrópico e inotrópico negativo). A dosis altas también puede bloquear los receptores beta-2 de la

musculatura lisa de los bronquios y vasos sanguíneos y causar efectos colaterales¹⁸⁸.

1.1 Mecanismo de acción

El metoprolol es un β -bloqueador cardioselectivo; es decir, que actúa sobre los receptores β_1 , localizados principalmente en el corazón, a dosis menores que las necesarias para influir sobre los receptores β_2 , que se encuentran ante todo en los bronquios y los vasos periféricos.

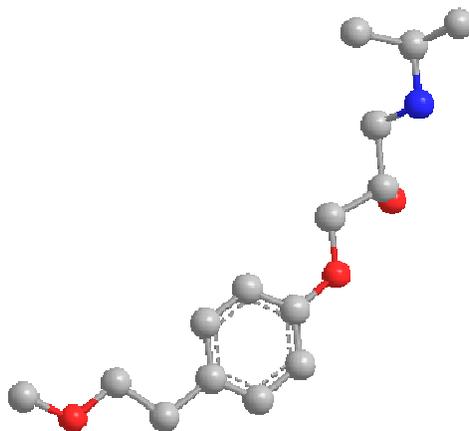
El metoprolol no ejerce una acción estabilizante de membrana ni posee una actividad agonista parcial. El metoprolol disminuye o inhibe el efecto estimulante de las catecolaminas en el corazón, lo que da lugar a una reducción de la frecuencia cardiaca y del volumen minuto cardiaco.

El metoprolol regula la frecuencia cardiaca en caso de taquicardias supraventriculares, fibrilación auricular y extrasístoles ventriculares. Su efecto antiarrítmico se basa en primer lugar en que inhibe el automatismo de las células marcapasos y alarga el tiempo de conducción auriculoventricular.

El metoprolol es adecuado para el tratamiento de los trastornos cardiovasculares funcionales con palpitaciones, la profilaxis de la migraña y como suplemento de la terapéutica del hipertiroidismo¹⁸⁸.

1.2 Propiedades físico-químicas

El metoprolol es una molécula de carácter básico¹⁸⁵. En la Figura II.31 se muestran las características físico-químicas y la estructura química de este compuesto.



Propiedades Físico-químicas	Valor
Estado Físico	polvo cristalino
Color	blanco
Olor	inodoro
Peso molecular (g/mol)	267,36
Punto de Fusión (°C)	159
Constante de disociación (pK _a)	9,7
Log P (octanol-agua)	1,9
Solubilidad en agua (g/l)	3

Figura II. 31 Estructura química y propiedades físico-químicas del metoprolol¹⁸⁵

1.3 Farmacocinética

El metoprolol se absorbe completamente tras la administración oral. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan al cabo de hora y media a dos horas, aproximadamente ¹⁸⁹.

Su biodisponibilidad es del 40-50% debido a que sufre metabolismo de primer paso. Si se repite la dosis, el porcentaje de la dosis disponible sistémicamente es mayor que con una dosis simple, y se eleva también en función de la dosis.

La biodisponibilidad se reduce un 20-30% con la preparación de liberación controlada en comparación con las formas convencionales, pero carece de significación clínica. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan al cabo de aproximadamente 1,5-2 h con formulaciones convencionales de metoprolol. La preparación de liberación controlada se absorbe durante 20 h ¹⁸⁹.

La disponibilidad sistémica de una dosis simple oral puede aumentar en un 20-40% aproximadamente si se administra junto con alimentos. Menos del 5% de la dosis se excreta de forma inalterada en la orina en la mayoría de los sujetos.

Los malos hidroxiladores pueden excretar hasta un 30% en forma inalterada. El promedio de la vida media de eliminación es de unas tres horas y media (extremos: una y nueve horas). El aclaramiento sistémico de una dosis intravenosa es de 1 litro/min aproximadamente y la fijación proteica se eleva a cerca del 10%.

Se ha observado una acumulación significativa de metabolitos en los pacientes con una tasa de filtración glomerular de unos 5 ml/min, pero la acumulación de metabolitos no disminuye las propiedades β -bloqueadoras del metoprolol¹⁸⁹.

La cirrosis hepática puede incrementar la biodisponibilidad del metoprolol inalterado y reducir el aclaramiento total.

1.4 Precauciones y Contraindicaciones

- **Asma u otras enfermedades broncoespásticas:** debe tenerse en cuenta el riesgo de broncoespasmo aunque es menor por tratarse de un β -bloqueante cardioselectivo.
- **Cardiopatía isquémica:** debe evitarse la retirada brusca del tratamiento por el riesgo de precipitar una angina de pecho.
- **Diabetes mellitus:** puede enmascarar la taquicardia asociada a hipoglucemia.
Enfermedad vascular periférica: disminuye la circulación periférica y puede agravar la enfermedad.
- **Hipertiroidismo:** puede enmascarar la taquicardia asociada. La retirada brusca puede agravar los síntomas.
- **Antecedentes de anafilaxia:** puede aumentar la sensibilidad frente a alérgenos.
- **Miastenia gravis:** puede enmascarar los signos de la enfermedad, como la debilidad muscular o los trastornos visuales.

- **Embarazo:** categoría C de la FDA. Los β -bloqueantes se consideran de elección en la hipertensión arterial durante el embarazo, aunque se han descrito casos de retraso en el crecimiento intrauterino. Debe retirarse 2 o 3 días antes del parto por el riesgo de bradicardia, hipotensión e hipoglucemia neonatal.
- **Lactancia:** se distribuye en leche materna. Aunque se considera compatible, se debe controlar a los lactantes la aparición de signos de bloqueo β -adrenérgico.
- **Pediatría:** no se recomienda en menores de 18 años porque no se ha establecido su seguridad.
- **Geriatría:** son más susceptibles a los efectos adversos. Debe considerarse la reducción de dosis.¹⁹⁰

1.5 Efectos adversos

En la mayoría de los casos los efectos adversos están íntimamente relacionados con las acciones farmacológicas:

- **Cardiovascular:** Bradicardia (casos aislados), deterioro de la insuficiencia cardiaca, hipotensión que se puede asociar con síncope, extremidades frías. En pacientes sensibles: precipitación del bloqueo cardiaco, exacerbación de la claudicación intermitente si ya está presente, fenómeno de Raynaud.
- **Sistema nervioso central:** Ocasionalmente, astenia, mareo, cefalea. Excepcionalmente, confusión, alteraciones del humor, pesadillas, depresión, ansiedad, parestesia. Casos aislados de psicosis.

- **Gastrointestinal:** Sequedad de boca, diarrea, náuseas.
- **Hepatobiliares:** Infrecuentemente se ha observado incremento de los valores de transaminasas, y se han comunicado casos de toxicidad hepática incluyendo colastasis intrahepática.
- **Hematológico:** Rara vez, trombopenia.
- **Metabólicos:** Excepcionalmente, aumento de peso¹⁹⁰.

2. Verapamilo

El verapamilo es un bloqueante de los canales de calcio activo por vía oral y administración intravenosa, que se utiliza para el tratamiento de la angina, la hipertensión y las taquiarritmias supraventriculares. Se le considera como antiarrítmico de la clase IV, siendo más eficaz que la Digoxina en el control de la fibrilación auricular. El verapamilo reduce la post-carga y, por tanto, puede ser útil en el tratamiento de la hipertrofia del ventrículo izquierdo. El verapamilo puede ser beneficioso en la cardiomiopatía hipertrofica y se ha comprobado que reduce el porcentaje de reinfartos aunque no reduce la mortalidad de los pacientes con disfunción ventricular izquierda.

Aunque el verapamilo es considerado como un fármaco cardiovascular, tiene otras muchas aplicaciones como son el tratamiento de las manías y la profilaxis de las migrañas. Las diferentes presentaciones que existen en el mercado están diseñadas para una u otra indicación, desde el tratamiento de la angina con comprimidos de liberación sostenida hasta gotas oftálmicas para el tratamiento de la hipertensión ocular y/o el glaucoma¹⁸⁸.

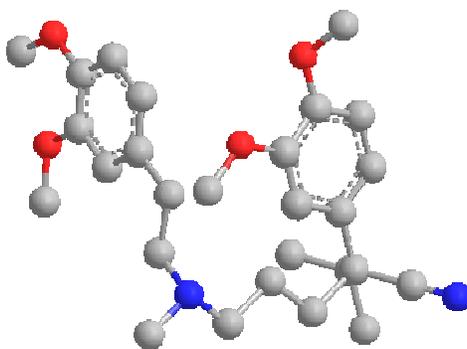
2.1 Mecanismo de acción

El verapamilo inhibe la entrada de calcio extracelular a través de las membranas de las células del miocardio y del músculo liso, así como en las células contráctiles y del sistema de conducción del corazón. Los niveles plasmáticos de calcio permanecen sin alterar. El verapamilo se fija a los canales lentos de calcio deformándolos, lo que impide la entrada de calcio, con lo que actúa sobre los mecanismos iónicos que regulan el automatismo. En el interior de las células, el verapamilo interfiere con la liberación del calcio intracelular que se almacena en el retículo sarcoplásmico. La reducción de los niveles de calcio intracelular afecta al mecanismo contráctil del tejido del miocardio produciendo una dilatación. El mismo efecto en las células del músculo liso vascular, con la consiguiente vasodilatación, reduce las resistencias periféricas y, por tanto la postcarga. Estos mecanismos explican los efectos beneficiosos del verapamilo en la angina y la hipertensión. Sin embargo, estos efectos son menos potentes que los producidos por los antagonistas del calcio de la familia de las 1,4-dihidropiridinas¹⁹⁰.

Se cree que la inhibición de la contracción en los vasos del cerebro es la responsable de los efectos antimigrañosos del verapamilo.

2.2 Propiedades físico-químicas

El verapamilo es una molécula de carácter básico. En la Figura II.32 se resumen las propiedades físico-químicas de este compuesto y se muestra su estructura química¹⁹¹.



Propiedades Físico-químicas	Valor
Estado Físico	polvo cristalino
Color	blanco
Olor	inodoro
Peso molecular (g/mol)	454,60
Punto de Fusión (°C)	141-144
Constante de disociación (pK _a)	8,6 – 8,9
Log P (octanol-agua)	4,47 – 5,69
Solubilidad en agua (g/l)	50

Figura II.32 Estructura química y propiedades físico-químicas del verapamilo¹⁹¹

2.3 Farmacocinética

El verapamilo se puede administrar por vía oral e intravenosa. Después de una dosis oral, se absorbe rápidamente, aunque experimenta un extenso metabolismo de primer paso, lo que hace que su biodisponibilidad sea sólo del 20-

35%. La comida reduce la biodisponibilidad de las formulaciones retardadas de verapamilo, pero no de las formulaciones convencionales. Los fármacos que inducen las enzimas hepáticas como la Rifampina o los Barbitúricos o las enfermedades hepáticas afectan en gran medida la biodisponibilidad del verapamilo ¹⁹².

El comienzo de los efectos hemodinámicos y electrofisiológicos del verapamilo tiene lugar a las 1-2 horas después de su administración oral. Los efectos son máximos entre las 2 y 5 horas en el caso de las formulaciones convencionales y a las 5 horas en el caso de las formulaciones retardadas. La actividad farmacológica del verapamilo se mantiene durante 8-10 horas en el caso de las formulaciones convenciones y durante 24 horas en el caso de las retardadas. Después de la administración intravenosa, la actividad del verapamilo es máxima a los 5 minutos y dura entre 10-20 minutos. El verapamilo y su metabolito activo, el norverapamilo, se distribuyen muy bien por todo el organismo, incluyendo el sistema nervioso central. El fármaco se excreta en la leche materna alcanzando concentraciones próximas a las concentraciones plasmáticas de la madre, lo que representa un problema en la lactancia. También se ha comprobado que pasa fácilmente la barrera placentaria ¹⁹².

El verapamilo se une en un 90% a las proteínas del plasma y aproximadamente un 70% es eliminado en la orina en forma de metabolitos. Aunque se conocen más de 12 metabolitos, sólo el norverapamilo es detectable en el plasma. El norverapamilo posee un 20% de la actividad del verapamilo y carece de efectos sobre la frecuencia cardíaca o el intervalo PR. El metabolismo de primer paso es estereoselectivo, siendo preferentemente metabolizado el isómero L.

La semivida de eliminación del verapamilo es de unas 2-5 horas después de dosis únicas, aumentando a 5-12 horas después de dosis múltiples. En los pacientes con insuficiencia renal, puede extenderse hasta las 14 horas. La eliminación del verapamilo tiene lugar por vía renal, eliminándose en las heces tan solo el 16% de la dosis administrada. Menos del 5% de la dosis se excreta como verapamilo sin alterar en la orina ¹⁹².

2.4 Precauciones y Contraindicaciones

El verapamilo se debe utilizar con precaución en pacientes con disfunción ventricular, bradicardia grave, shock cardiogénico o insuficiencia cardíaca congestiva o en pacientes tratados con β -bloqueantes dado que el fármaco puede exacerbar o precipitar un fallo cardíaco o producir una excesiva bradicardia o anomalías en la conducción. No obstante, el verapamilo puede ser utilizado en la disfunción ventricular debida a una taquiarritmia supraventricular. Los efectos reductores de las postcarga son beneficiosos en estos pacientes y pueden contrarrestar los efectos inotrópicos negativos del fármaco. El verapamilo no se debe utilizar en los pacientes con infarto agudo de miocardio y disfunción del ventrículo izquierdo ¹⁸⁹.

El verapamilo disminuye las resistencias periféricas y puede empeorar una hipotensión. Por lo tanto, su uso está contraindicado en pacientes con una presión sistólica inferior a 90 mm de Hg. En los pacientes con hipotensión moderada o ligera, se deberá controlar la presión arterial si se administra el verapamilo. Si la hipotensión es el resultado de una taquicardia supraventricular, se puede utilizar el verapamilo ya que la corrección de la arritmia mejora la hipotensión. Por el

contrario, el verapamilo no se debe utilizar en pacientes con síndrome de bloqueo sinusal u otros bloqueos (de segundo o tercer grado) que no lleven implantado un marcapasos artificial. En estos pacientes, la administración de verapamilo puede resultar en una grave hipotensión, bradicardia y asistolia ¹⁸⁹.

Los ancianos, los pacientes con enfermedades renales o con enfermedades hepáticas tales como cirrosis o insuficiencia renal, muestran un aclaramiento retardado del verapamilo y de sus metabolitos y, por tanto, tienen un riesgo mayor de que el fármaco se acumule y muestre toxicidad. En los ancianos, el verapamilo tiene una semivida de eliminación más prolongada, por lo que a estos pacientes se les administran dosis iniciales menores.

El 70% del verapamilo se excreta en forma de metabolitos en la orina y se debe administrar con precaución en pacientes con insuficiencia renal. Estos enfermos deberán ser monitorizados por si apareciera una prolongación anormal del intervalo PR u otros síntomas de unas dosis excesivas. En la insuficiencia hepática, el aclaramiento del verapamilo disminuye hasta un 30% y la semivida puede aumentar hasta las 14-16 horas, por lo que las dosis en estos pacientes deberán reducirse y ajustarse según la respuesta clínica.

En los pacientes en enfermedades neuromusculares, el verapamilo se debe utilizar con precaución. Se han comunicado casos en los que observó una disminución de la transmisión neuromuscular en pacientes con distrofia muscular de Duchenne y también se sabe que alarga el tiempo de recuperación después de un bloqueo neuromuscular con vecuronio.

El verapamilo se clasifica dentro de la categoría C de riesgo en el embarazo. Aunque se ha comprobado que el verapamilo puede tener efectos negativos sobre el crecimiento fetal no se sabe si tiene propiedades teratogénicas y no se han realizado estudios controlados en el hombre. Por lo tanto, el uso del verapamilo en el embarazo deberá restringirse a aquellas enfermas en las que el beneficio sea superior al riesgo potencial para el feto.

El verapamilo está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad al fármaco o a alguno de los componentes de su formulación.

2.5 Efectos adversos

Las reacciones adversas más serias asociadas a los tratamientos con verapamilo representan una extensión de sus efectos terapéuticos sobre el nodo A-V. Estos efectos secundarios incluyen bradicardia sinusal, taquicardia sinusal refleja, bloqueo A-V de grado diverso que puede necesitar de un tratamiento con atropina, e hipotensión. La incidencia de efectos adversos es mayor en los pacientes que reciben el fármaco por vía intravenosa¹⁹⁰.

Aunque el verapamilo tiene propiedades inotrópicas negativas, el riesgo de desarrollar un fallo cardiaco congestivo o edema pulmonar queda paliado de alguna forma por el efecto reductor de la postcarga. Sin embargo, los pacientes con disfunción del ventrículo izquierdo deberán ser vigilados por si aparecieran signos o síntomas de empeoramiento de la insuficiencia cardiaca.

Puede ocurrir taquicardia, incluyendo fibrilación ventricular en pacientes con conducción A-V accesoria y por lo tanto, aunque el fármaco es eficaz en el tratamiento de la fibrilación auricular o del flutter, no se debe administrar a pacientes que muestren este desarreglo de la conducción. Tampoco se debe administrar el verapamilo si se sospecha en los enfermos un síndrome de Wolff-Parkinson-White o de Lown-Ganong-Levine.

Los efectos vasodilatadores del verapamilo son los responsables de algunos efectos secundarios como los mareos o los sofocos. También se han descrito letargia, cefaleas, fatiga y tinnitus en los pacientes tratados con este fármaco. La constipación es la reacción adversa gastrointestinal más frecuente del verapamilo y ocurre con una mayor frecuencia que en el caso de otros antagonistas del calcio. Otros efectos gastrointestinales son la náusea y el vómito, la dispepsia y el dolor abdominal¹⁸⁹.

Se han descrito elevaciones transitorias de las enzimas hepáticas en algunos pacientes tratados con verapamilo, elevaciones que desaparecieron espontáneamente al proseguir el tratamiento. Sin embargo, en algún caso se ha observado hepatotoxicidad al reutilizar el fármaco.

Ocasionalmente, se ha observado disfunción sexual, incluyendo impotencia, en algunos pacientes tratados con antagonistas del calcio. También se han comunicado casos de ginecomastia asociados al tratamiento con estos fármacos.

3. Absorción intestinal de los fármacos en estudio en distintos modelos experimentales

En las siguientes tablas se resumen los valores encontrados en la bibliografía de permeabilidad de metoprolol y verapamilo en distintos modelos celulares *in vitro*. Estos valores permiten tener una estimación de la variabilidad inter e intralaboratorio.

		METOPROLOL	Cita
Mecanismo de absorción		Pasivo	Neuhoff y col. 2003 ¹⁸⁵
Peff (cm/s) x 10 ⁻⁵ (DE)/CV Bibliografía	Caco-2 Pab (Apical- Basolateral)	2,67 (0,27)/ 10,11	Artursson y Magnusson, 1990 ¹⁹⁴
		1,80 (0,25)/ 13,89	Gres y col. 1998 ¹⁹⁵
		2,16 (ND)	Bock y col. 2009 ⁴
		14,00 (1,00)/ 7,14	Salphati y col. 2001 ¹⁹⁹
		8,76 (0,36)/ 4,11	Hayeshi y col. 2008 ²⁰⁰
		5,88 (0,26)/ 4,42	
		7,11 (0,22)/ 3,09	
4,55 (0,29)/ 6,37			
4,29 (0,03)/ 6,99			
0,77 (0,05)/ 6,49			

		2,47 (0,21)/ 8,50 4,37 (0,11)/ 2,52 3,51 (0,19)/ 5,41 6,22 (0,27)/ 4,34	
	MDCK Pab	2,25 (ND)	Bock y col. 2009 ⁴
		15,00 (1,00)/ 6,67	Salphati y col. 2001 ¹⁹⁹
	MDCK-MDR1 Pab	1,58 (ND)	Bock y col. 2009 ⁴
	Rata	2,00 (0,4)/ 20,00	Kim, Mitchell y col. 2006 ¹⁶⁷
		3,3 (1,50)/ 45,45	Zakeri-Milania y col. 2007 ²⁰¹
		5,90 (1,30)/ 22,03	Salphati y col. 2001 ¹⁹⁹
Peff (cm/s) x 10 ⁻⁵ (DE)/CV Experimental	Caco-2 Pab (Apical-Basolateral)	2,36 (0,28)/ 11,86	Nalda Molina, JR. 2003 ¹⁹⁸
Interacciones		-	

Peff, permeabilidad efectiva; DE, desviación estandar; CV, coeficiente de variación; N.D., parámetro no determinado.

Tabla II.7 Valores de la permeabilidad intestinal del metoprolol, obtenidos en distintos modelos experimentales, presentes en la bibliografía y los obtenidos en nuestro laboratorio.

		VERAPAMILO	Cita
Mecanismo de absorción		Combinado	Karlsson y col. 1993 ¹⁹³
Peff (cm/s) x 10 ⁻⁵ (DE)/CV Bibliografía	Caco-2 Pab (Apical- Basolateral)	6,94 (ND)	Mandagere y col. 2002 ¹⁹⁶
		3,38 (0,41)/ 12,13	Korjamo y col. 2005 ¹⁹⁷
		1,3 (0,05)/ 3,85 0,91 (0,02)/ 2,20 1,29 (1,10)/ 85,27 1,17 (0,09)/ 7,69	Shirasaka y col. 2006 ³
		MDCK Pab	1,29 (0,04)/ 3,10 Shirasaka y col. 2006 ³
	MDCK- MDR1 Pab	0,83 (0,02)/ 2,41 Shirasaka y col. 2006 ³	
	Rata	6,50 (0,50)/ 7,69	Kim, Mitchell y col. 2006 ¹⁶⁷
		5,45 (0,22)/ 4,04	Varma y Panchagnula, 2005 ¹⁶⁶
Peff (cm/s) x 10 ⁻⁵ (DE)/CV Experimental	Caco-2 Pab (Apical- Basolateral)	3,51 (0,27)/ 7,69	Nalda Molina, JR. 2003 ¹⁹⁸
Interacciones		Zumo de pomelo	Romiti y col. 2004 ²⁰²

Peff, permeabilidad efectiva; DE, desviación estandar; CV, coeficiente de variación; N.D., parámetro no determinado.

Tabla II.8 Valores de la permeabilidad intestinal del verapamilo, obtenidos en distintos modelos experimentales, presentes en la bibliografía y los obtenidos en nuestro laboratorio.

III. Materiales y Métodos

A. Compuestos ensayados

En este trabajo se ha caracterizado la permeabilidad intestinal de dos fármacos modelo: metoprolol y verapamilo.

Se seleccionó metoprolol porque es el patrón utilizado para clasificar los compuestos en alta o baja permeabilidad y verapamilo como conocido sustrato de Glicoproteína-P.

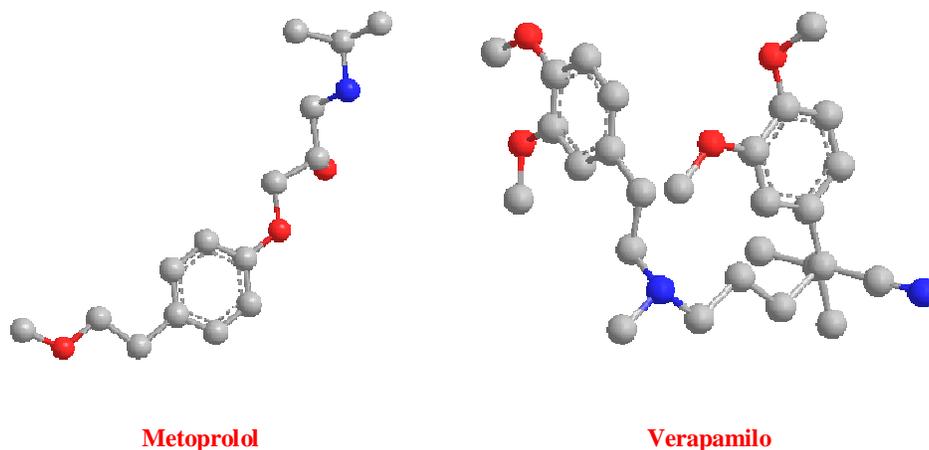


Figura III.1 Estructura de los compuestos en estudio

B. Animales de experimentación

Los animales seleccionados para este estudio fueron 5 razas de ratas no consanguíneas de ambos sexos:

- Sprague Dawley[®]TM
- Wistar Han TM
- Wistar Unilever
- Long-Evans
- CD*IGS

Los animales se mantuvieron con una dieta equilibrada y en perfectas condiciones de higiene y climatización.

Para los ensayos se seleccionaron animales con edad comprendida entre dos y tres meses. Su peso, tras 8 horas de ayuno, osciló entre 230 y 280g.

C. Técnicas experimentales

1. Ensayos de absorción en animales

El protocolo de trabajo consiste en el cálculo de la permeabilidad intestinal, utilizando una única concentración del compuesto, en cinco razas distintas de ratas no consanguíneas, en machos y hembras. En el ensayo se han seguido las normas de correcto uso y manipulación de animales de laboratorio que dicta la normativa europea.

1.1 Soluciones de trabajo

A continuación se describen las distintas soluciones de trabajo utilizadas en los ensayos *in situ*.

Solución anestésica

Para llevar a cabo la intervención quirúrgica previa a los ensayos de perfusión *in situ*, se requiere anestesia general profunda del animal. A tal efecto se empleó una solución de tiopental sódico (Tiobarbital braun[®]) 60 mg/kg.

Esta solución se administra atemperada a 37°C, por vía intraperitoneal en dosis de 0.02 mL por cada 100 g de peso del animal. Tras la inyección se efectúa

un ligero masaje en la zona administrada para facilitar la difusión del anestésico y su paso a la circulación general.

El grado de anestesia profunda necesario para el inicio de la intervención quirúrgica se alcanza unos 10 minutos tras la administración.

Soluciones de lavado intestinal

1.1.2.1 Solución de lavado A

Se trata de una solución isotónica que permite eliminar los restos de quimo que pudieran quedar en la luz intestinal. Su composición es:

NaCl.....	9.00 g
KCl.....	0.34 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	0.19 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O.....	0.76 g
H ₂ O destilada.....	c.s.p. 1 L

1.1.2.2 Solución de lavado B

Esta solución se utiliza para acondicionar la mucosa intestinal antes de realizar los ensayos de absorción. Se trata de una solución de suero fisiológico regulada a pH 7.00 mediante una solución de tampón fosfato según Sørensen a razón de 10 mL de tampón por litro de solución.

La composición cuantitativa de la solución es:

NaCl.....	9.00 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 1/15 M.....	3.9 ml
Na ₂ HPO ₄ 1/15 M.....	6.1 ml
H ₂ O destilada.....	c.s.p. 1 L

1.1.3 Soluciones de perfusión

La solución de trabajo se preparó mediante pesada del compuesto a ensayar y disolución posterior en solución de lavado B. El pH se ajusta siempre antes de su perfusión a un pH final de 7.00 ± 0.02 . La regulación del pH se realiza mediante la adición de NaOH 0.1N, ya que debido al bajo porcentaje de la solución tampón puede producirse una ligera variación del pH original. Este problema podría evitarse aumentando la proporción de tampón en la solución de lavado, pero concentraciones superiores de fosfato podrían ser perjudiciales para la integridad de la mucosa intestinal²⁰³.

Las constantes aparentes de velocidad de absorción se determinaron mediante perfusión *in situ* sin recirculación. La técnica experimental utilizada es una modificación de la propuesta por Doluisio y colaboradores¹²⁷ adaptada a las condiciones de nuestro laboratorio²⁰⁴.

1.2 Técnica experimental

1.2.1 Técnica experimental en intestino delgado completo

El animal se sometió a un periodo de ayuno de 8 horas, durante el cual se permite su acceso libre al agua para garantizar su hidratación. Las jaulas deben ser siempre de doble fondo para evitar la coprofagia.

Tras este tiempo, el animal se anestesia por inyección intraperitoneal con la dosis correspondiente a su peso, tal y como se ha descrito anteriormente.

A continuación, el animal se coloca bajo una lámpara que suministre calor ya que la anestesia provoca relajación muscular generalizada que puede llevar a hipotermia.

A los 10 minutos de administrar el anestésico, el animal alcanza el grado de anestesia profunda y carece del reflejo palpebral. Se coloca en posición decúbito supino sobre un tablero quirúrgico y se inmoviliza por las extremidades con cinta adhesiva, de forma que no adquiera una posición forzada.

El grado de anestesia se comprueba cada 10 minutos a lo largo de toda la cirugía y el periodo de toma de las muestras.

El primer paso consiste en descubrir la cavidad abdominal mediante sección de la piel, desde 2 cm por encima del poro genital hasta 1 cm del apéndice xifoides. Para ello se sujeta la piel con unas pinzas en forma de diente de ratón y se realiza la incisión con tijeras de punta roma. A continuación se separan los

rectos abdominales cortando por la línea alba para provocar la mínima hemorragia.

Una vez abierta la cavidad abdominal, se localiza el duodeno, en el que desemboca el conducto biliar. Este conducto debe ligarse con ayuda de un hilo de seda, para evitar el paso de la secreción biliar al intestino y la aparición de un posible ciclo enterohepático.

A continuación, se practica un pequeño corte en bisel en el extremo duodenal. Se introduce el extremo de una cánula de vidrio acodada, la cual se fija al intestino con hilo de seda. El otro extremo de la cánula se conecta mediante un tubo de polietileno, a una llave de tres pasos tipo *Stopcock*, que se esquematiza en la Figura III.2. A su vez, ésta encaja a rosca con una jeringa de 10 mL de capacidad, sujeta mediante una pinza a un soporte vertical.

Posteriormente, se localiza el otro extremo (íleo-cecal) y se efectúa una incisión de forma que se proceda sin dificultad a la limpieza de la mucosa.

Para que el ensayo de absorción sea reproducible, se debe evitar toda obstrucción en las cánulas. Es necesario que la mucosa intestinal quede totalmente libre de residuos y de las sales biliares, que actuarían como tensioactivos. La limpieza se realiza con ayuda de la jeringa conectada a la cánula; se hace pasar varias veces las soluciones de lavado, termostatadas a 37°C, por la jeringa y a través del intestino. En primer lugar se utiliza la *solución de lavado A*, para eliminar restos sólidos (unos 50 ml), y después se perfunden 50 ml de *solución de lavado B* para acondicionar la mucosa y restaurar el pH de la zona.

Una vez finalizado el lavado, se conecta otra cánula en el extremo final. Esta cánula se une a su vez a una llave de tres pasos y a otra jeringa. Todo el conjunto se sujeta a un soporte vertical, con la ayuda de unas pinzas.

Por último se bombea aire a través del intestino en ambas direcciones con objeto de eliminar los restos de la *solución de lavado B*, aunque siempre queda un volumen residual aproximadamente de 0.7 ml²⁰⁵. Este proceso es necesario para asegurar que la solución perfundida no se diluya.

Durante el proceso de lavado hay que evitar ejercer una excesiva presión sobre el émbolo para no dañar la mucosa intestinal y no alterar la perfusión sanguínea, factores que, si se modificasen, podrían condicionar cambios en la constante de absorción de las sustancias ensayadas.

Otro factor a considerar es la posible desecación de la cavidad abdominal. Con objeto de evitarla se vierte en ella pequeños volúmenes de suero fisiológico atemperado a 37°C y se cubre con una torunda de algodón empapada en el mismo líquido a igual temperatura. Esta operación se repite a lo largo del ensayo, para mantener el grado adecuado de hidratación y la temperatura fisiológica del intestino, ya que una deshidratación puede incrementar la reabsorción de agua y, por lo tanto, aumenta la concentración de la solución perfundida. Por otra parte la disminución de la temperatura corporal local puede conducir a un descenso reflejo del flujo sanguíneo mesentérico y, en ocasiones, a una disminución en la velocidad de absorción.

Jeringa-exterior

Permite el paso de solución o aire desde la jeringa al exterior.



Jeringa-intestino

Permite el paso de solución o aire desde la jeringa al intestino o viceversa.



Intestino-exterior

Permite el paso de solución o aire desde el intestino al exterior



Figura III.2 Esquema de las tres posiciones de la llave de tres pasos de tipo Stopcock

1.3 Protocolo del ensayo

1.3.1 Perfusión

La solución del compuesto a ensayar se dispone en la jeringa proximal, tras atemperarla a 37°C. Se utiliza un volumen de 10 ml de solución. La llave de tres pasos se mantiene en posición intestino-exterior.

A continuación, la llave distal se coloca en posición intestino-exterior y la llave proximal en posición jeringa-intestino.

Se introduce la solución en el intestino presionando ligeramente el émbolo de la jeringa proximal. De este modo, el aire contenido en dicha cavidad es desplazado al exterior sin provocar una distensión excesiva de la pared intestinal. Se coloca las llaves en posición jeringa-exterior y el intestino se convierte en un compartimento estanco. En este momento se pone en marcha el cronómetro.

1.3.2 Toma de muestra

La toma de muestras se realiza cada 5 minutos alternativamente por cada una de las jeringas. La primera muestra se toma por la jeringa distal y la última, por la proximal. Se recoge un total de seis muestras (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min) de 200 μ l de solución cada una.

Para extraer la muestra, se colocan las dos llaves en posición jeringa-intestino. Se toma aire con la jeringa opuesta al muestreo y se introduce en el intestino a la vez que la solución asciende por la otra jeringa. A continuación se toma la muestra mientras se mantiene presionada la cavidad abdominal. Se vuelve a introducir la solución en el intestino mientras la jeringa opuesta comunica el lumen intestinal con el exterior. Simultáneamente, se recoge cualquier líquido que sea arrastrado con el aire que se desplaza al exterior. De esta forma se puede estimar la variación del volumen remanente en el intestino durante el ensayo. Una vez introducida la solución, se colocan las llaves en posición jeringa-exterior y se transforma, de nuevo, el intestino en un compartimento estanco.

1.4 Ensayo de reabsorción de agua

Después de tomar la última muestra se lleva a cabo el ensayo de reabsorción de agua. Para ello, se desconecta la cánula de la jeringa íleo-cecal y se coloca en un tubo de centrífuga de 15 ml. Con la jeringa que queda conectada, se toma aire y se ejerce presión para extraer el líquido remanente a través de la cánula. Seguidamente se corta el mesenterio y se separa el asa intestinal del resto del animal.

Una vez aislado el intestino, se presiona desde el principio hasta el final, con ayuda de un algodón húmedo, asegurando que se vacíe completamente. Finalizado el ensayo, el animal se sacrifica mediante dislocación cervical.

El volumen recogido se centrifuga durante 15 minutos a 3000 rpm. De esta forma sedimentan en el tubo de muestra los restos de mucosa que se han arrastrado. Se retira el residuo y se mide el sobrenadante. Para calcular el volumen final, a este valor se adiciona el volumen recogido durante la toma de muestras y el de las muestras extraídas.

1.5 Tratamiento de muestras

Las muestras biológicas se centrifugan a 8000 rpm durante 8 minutos. De este modo se obtiene un sobrenadante que contiene en disolución el compuesto ensayado y un sedimento sólido que son restos de mucosa, que podrían alterar la valoración, por obstrucción del sistema cromatográfico, y que pueden causar la aparición de picos aleatorios u oscilaciones de la línea base. Por lo tanto, en el cromatógrafo sólo se introduce el sobrenadante de las muestras.

Aproximadamente 0.15 ml de este sobrenadante se coloca en los viales adecuados según el tipo de inyector automático que se vaya a utilizar. En nuestro caso se utilizaron viales Snap Cap ámbar de 2 ml de capacidad, con un inserto de vidrio en su interior con una capacidad de 0.2 ml, y con un tapón Septum propileno PTFE, con el fin de evitar evaporaciones. Se inyectaron 50 μ l de cada muestra en el equipo de CLAR, por triplicado para poder comprobar la reproducibilidad de los resultados.

1.5.1 Cálculo de la velocidad de reabsorción de agua

Existe un proceso de reabsorción de agua simultáneo al proceso de absorción de la sustancia ensayada¹²⁷ de modo que la solución remanente en lumen se concentra. Este proceso puede falsear por exceso el valor de la concentración remanente en lumen, sobre todo en las últimas muestras (25 y 30 min).

Con el fin de estimar las concentraciones reales de compuesto se calculó el volumen remanente a cada tiempo de toma de muestra. Dado que el volumen varía según una cinética de orden cero²⁰⁵, la ecuación diferencial representativa del proceso es:

$$\frac{dV}{dt} = -k_0$$

Su forma integrada es:

$$V = V_0 - k_0 \cdot t$$

en la que V es el volumen remanente en el intestino a cada tiempo, V_0 es el volumen remanente a tiempo inicial y k_0 representa la constante de velocidad de reabsorción de agua (ml/min).

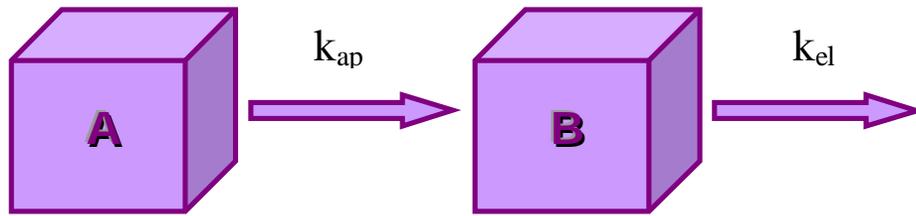
Mediante regresión lineal por mínimos cuadrados de los volúmenes obtenidos, se obtienen los parámetros V_0 como ordenada en el origen y k_0 como pendiente. Estos parámetros permiten determinar los volúmenes teóricos para cada tiempo de toma de muestra (V_t), y con ellos se corrigen los valores experimentales de las concentraciones de soluto en las muestras, utilizando la ecuación:

$$C = E \cdot \frac{V_t}{V_0}$$

en la que C corresponde a la concentración de soluto corregida y E es la concentración obtenida experimentalmente.

1.5.2 Cálculo de la constante aparente de la velocidad de absorción

Las constantes aparentes de velocidad de absorción de los compuestos en estudio se han determinado a diferentes concentraciones de perfusión a partir del siguiente modelo:



Considera dos compartimentos: un compartimento A que representa el lugar donde se produce la absorción (intestino) y un compartimento B que representa el organismo.

En este estudio se considera que la desaparición del compuesto del compartimento A se debe únicamente a absorción y sigue una cinética aparente de primer orden según la siguiente ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{ap} \cdot C$$

donde C corresponde a la concentración remanente de fármaco en el intestino y k_{ap} la constante de velocidad de absorción aparente de primer orden. Su forma integrada es:

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{ap} \cdot t}$$

donde C es la concentración de fármaco a tiempo t y C_0 corresponde a la concentración inicial de fármaco disponible para la absorción ($t = 0$).

El valor de C_0 obtenido es siempre menor que la concentración perfundida debido a varios procesos simultáneos: dilución con el resto de solución de lavado, adsorción a la membrana intestinal y entrada rápida del compuesto en los enterocitos. El descenso de C_0 se debe mayoritariamente a la carga de la sustancia en la mucosa, cuyo equilibrio se alcanza en los primeros minutos de la perfusión, con lo que pasados 5 minutos el proceso ha finalizado totalmente. Por esta razón, la toma de muestra se inicia a ese tiempo.

Para obtener un valor representativo de la constante de velocidad de absorción, el ensayo se realiza en un mínimo de 4 animales para cada concentración ensayada. Tras esto se obtiene un valor medio que se considera característico de las condiciones del ensayo.

El uso de animales en experimentación debe ser ponderado y buscarse un equilibrio entre la finalidad perseguida en la investigación o formación y la protección animal. Según el Comité Ético de Experimentación Animal se debe tender al empleo de cualquier estrategia encaminada a utilizar el mínimo número de animales necesario para alcanzar el objetivo propuesto en el procedimiento. Aplicar diseños estadísticos correctos que permitan utilizar sólo el número de animales necesario para obtener una información fiable y precisa. Tan inadecuado resulta un procedimiento experimental que utiliza más animales de los necesarios, como el que utiliza tan pocos que sus resultados no proporcionan la calidad científica exigible, y que a la larga resultan inútiles por no ser fiables²⁰⁶.

2. Estudio de permeabilidad *in vitro*

Los estudios de permeabilidad *in vitro* se han realizado en monocapas de carcinoma de colon, Caco-2 ATCC, cedidas por el Dr. Hu de Washington State University (USA) y TC7 donadas por la Dra. Monique Rouscet INSERM (Francia); y en monocapas de células de origen canino, MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) y MDCK-MDR1, donadas por e Dr. Michael Gottesman de NCI (USA).

Se ha determinado el coeficiente de permeabilidad apical-basal P_{AB} y basal-apical P_{BA} de los compuestos a una única concentración.

Los requisitos básicos para el mantenimiento de las líneas celulares son:

- ✓ Estufa de incubación a una temperatura de 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Estas condiciones son las adecuadas para el crecimiento de estas células.

- ✓ Cámara de flujo laminar vertical de seguridad biológica, para trabajar en condiciones de mínimo riesgo de contaminación bacteriana y fúngica. La manipulación de las células siempre tendrá lugar en el interior de la cámara.

- ✓ Baño termostático. Permite que todas las soluciones que estarán en contacto con el cultivo se encuentren a 37°C.

✓ Bomba de vacío por membrana. Conectada a un dispositivo consistente en un kitasato con un tubo de silicona hacia la bomba y otro que asciende hasta la cámara de flujo. Facilita la aspiración del medio de cultivo y la filtración en la preparación de las diferentes soluciones de trabajo.

✓ Incubador con sistema de giro circular a 100 rpm., en el que se lleva a cabo el ensayo de permeabilidad. Permite simular las condiciones fisiológicas de movimiento y temperatura.

Los procedimientos normalizados de trabajo con este tipo de cultivos fueron preparados previamente por el equipo de investigación y se describen a continuación.

2.1 Soluciones de trabajo

2.1.1 Medio de cultivo

Se prepara como mezcla estéril, conservándose viable dos meses en nevera aproximadamente, según la fórmula siguiente:

Caco-2, TC7 y MDCK:

L-Glutamina 200 mM.....	10 ml
Solución Penicilina-Estreptomicina.....	10 ml
Solución de aminoácidos no esenciales.....	5 ml
HEPES 1 mM.....	5 ml
Suero bovino fetal.....	50 ml
DMEM sin piruvato.....	420 ml

MDCK-MDR1:

L-Glutamina 200 mM.....	10 ml
Solución Penicilina-Estreptomicina.....	10 ml
HEPES 1 mM.....	5 ml
Suero bovino fetal.....	50 ml
DMEM con piruvato.....	435 ml
Colchicina 80 ng/ml.....	2 ml

En la fórmula se detallan como elementos distintas soluciones cuya composición se describe a continuación:

L-Glutamina 200 mM

L-Glutamina (Gibco®). Se utiliza como uno de los componentes nutritivos, ya que es un aminoácido esencial.

Solución Penicilina-Estreptomicina

Es una solución estéril compuesta por:

Penicilina G (sal sódica) 10.000 unidades/ml

Estreptomicina (sulfato) 10.000 µg/ml

Ambas suministradas por Gibco®, evita la contaminación de los cultivos.

Suplemento de aminoácidos no esenciales

Solución acuosa de aminoácidos no esenciales suministrada por Gibco®.

DMEM

Líquido DMEM con alta concentración de glucosa (4.5 g/l) de Gibco®

2.1.2 Soluciones utilizadas para el pase

PBS-EDTA

Se comercializa en solución estéril por Gibco®. Se utiliza para el lavado de la monocapa y la eliminación de los residuos de suero que inactivarían la tripsina.

Tripsina-EDTA

Está compuesta por 0.5% de tripsina y 0.2% de EDTA-disódico exenta de Ca^{+2} y Mg^{+2} . Se comercializa en solución estéril por Gibco®. Esta solución se diluye 1/5 en PBS-EDTA estéril. Se utiliza para separar las células de los frascos en el proceso de pase de uno a otro.

2.1.3 Soluciones tampón para el ensayo

Solución de HBSS-HEPES

Solución compuesta de 99 ml de solución HBSS y 1 ml de solución HEPES 1 M. Esta solución se utilizará siempre en la cámara apical y basolateral, ya sea con fármaco o en ausencia de éste. También se emplea para lavar las células antes del ensayo.

2.1.4 Solución de compuesto a ensayar

Compuesto en solución libre

- Metoprolol: 100 μ M en solución HBSS-HEPES
- Verapamilo: 100 μ M en solución HBSS-HEPES

2.2 Técnica experimental

2.2.1 Congelación y descongelación

Congelación

Las células se pueden conservar, de forma indefinida, inmersas en nitrógeno líquido. Para ello es necesario un tratamiento previo de las mismas, pues el proceso de congelación entraña ciertos inconvenientes.

La congelación de las células puede producir daños a nivel de sus membranas, así como en otras estructuras celulares. La velocidad de disminución de la temperatura, junto con la formación de cristales de gran tamaño podría provocar su muerte. El procedimiento estándar se describió inicialmente para células de mama, con un alto porcentaje de recuperación de células viables tras la descongelación²⁰⁷.

Con el fin de evitar estos inconvenientes:

- ✓ Se utiliza una solución de alto contenido en proteínas, generalmente compuesta por suero de ternero y dimetilsulfóxido DMSO (1/10), estéril y

apirógeno. Ello evita la formación de cristales de agua que pudieran producir daños en las células. El DMSO es un crioprotector que incrementa la permeabilidad de las membranas, disminuyendo su fragilidad. El inconveniente de su uso es que resulta tóxico para las células y su manipulación requiere siempre la mayor rapidez posible^{208, 209}.

✓ Se controla la velocidad a la que decrece la temperatura gracias a un contenedor específico de criopreservación (Nalgene Cryo[®]). La temperatura desciende a una velocidad de 1°C/minuto, hasta los -80°C, a partir de aquí, la temperatura puede descender a mayor velocidad. El recipiente posee unas hendiduras adecuadas para los crioviales y se encuentra en un baño de isopropanol, de bajo punto de congelación. Tras permanecer un día en un congelador convencional, se pasa 2 días más a otro a -80°C y de ahí se sumergen en nitrógeno líquido.

Para la congelación se procede a separar las células del frasco de 75 cm² en el que crecen adheridas. A continuación, la suspensión tripsinizada se coloca en un tubo de plástico estéril, se centrifuga 4 minutos a 1500 rpm. y se elimina el sobrenadante. Al sedimento de células remanente se adiciona unos 5 ml de medio de cultivo atemperado adicionado con DMSO al 10%. Se separan las células del fondo del tubo con ayuda de una pipeta y pipeteador eléctrico deslizando la suspensión repetidas veces por la pipeta y, rápidamente, se introduce 1 ml en los crioviales, convenientemente rotulados, que, dentro del criocongelador se almacenan durante 24 horas en un congelador de -20°C. Tras este tiempo, se mantienen unas 48 horas en un congelador a -80°C y finalmente se trasladan a un tanque de nitrógeno líquido.

Descongelación

Se lleva a cabo en un baño termostataado a 37°C para acelerar el proceso de descongelación. Una vez se ha descongelado, se pulveriza con alcohol al 70%, se introduce en la cámara de flujo laminar y se pipetea su contenido, depositándolo en un tubo de plástico estéril con medio de cultivo atemperado, con objeto de diluir el DMSO presente en el vial. Este proceso debe llevarse a cabo con la máxima rapidez posible para evitar la toxicidad celular del disolvente. Se centrifuga para separar el medio líquido durante 4 minutos a 1500 rpm. Eliminado el sobrenadante, se adiciona medio de cultivo, libre ya de DMSO; con ayuda de la pipeta y pipeteador se agita la suspensión celular, para evitar que queden grupos celulares y se introduce en un frasco de 25 cm² de superficie. Este tamaño resulta adecuado para la dilución a la que las células fueron congeladas.

2.2.2 Crecimiento en frascos

Las células crecen en frascos de plástico estériles, en cuya base se forma una monocapa adherida. Para un correcto crecimiento hay que controlar dos aspectos:

1. La renovación frecuente de medio, puesto que las células producen metabolitos que pueden alterar el pH fisiológico del mismo.
2. La densidad de crecimiento, ya que las células deben tener siempre espacio para poder seguir desarrollando la monocapa.

El cambio del medio se realiza como se describe a continuación. Los frascos, situados en la estufa, se extraen, se pulverizan con alcohol al 70% y se

introducen en la cámara de flujo laminar. El medio de cultivo atemperado se pulveriza con el mismo alcohol y se introduce también en la cámara. Cuando se ha evaporado el alcohol se abren parcialmente ambos tapones, frasco y botella de medio. Se coloca una pipeta Pasteur estéril en el tubo de silicona conectado a la bomba de vacío. Se introduce la pipeta evitando tocar el cuello del frasco o poner la mano derecha sobre la boca del frasco. Siempre se trabaja en posición oblicua, para disminuir así el riesgo de que cualquier tipo de partícula penetre por el cuello. La bomba aspira el medio que se recoge en el kitasato, se extrae la pipeta con cuidado y se cierra el frasco con los dedos pulgar e índice que en todo momento han sujetado el tapón sin permitir que este contactara con ningún objeto o superficie. A continuación, se rompe la cubierta de papel de una pipeta estéril de volumen adecuado por la parte superior, se conecta al pipeteador automático y, una vez insertada en éste, se desenvuelve totalmente, sosteniendo el pipeteador de forma análoga a como se procedía con la pipeta. Con la mano izquierda se abre la botella de medio colocada en un recipiente que permite mantenerla inclinada, haciendo más fácil la introducción de una pipeta en su interior. Se toma la cantidad adecuada de medio, se tapa la botella, se toma el frasco como se ha descrito previamente y se deposita con la pipeta el medio de cultivo procurando no tocar las paredes del frasco. El frasco se cierra completamente, se saca de la cámara, se pulveriza (especialmente el cuello) con alcohol al 70% y se introduce en la estufa.

Los cambios de medio se suelen realizar los lunes, miércoles y viernes. El volumen de medio es de unos 12 ml para los frascos de 75 cm² y de 5 ml para los de 25 cm².

2.2.3 Dilución celular y cambio a nuevo frasco

La velocidad de crecimiento de este tipo de cultivos es muy rápida. Las células crecen formando monocapas que se adhieren a la base de los frascos. Cuando la monocapa ocupa toda la superficie disponible se deben despegar las células y sembrar en un nuevo frasco una dilución de la suspensión celular. En el caso de que no se realizara esta operación, las células comenzarían a degenerar, a formar vacuolas de reserva y a producir alteraciones importantes en las características típicas de la línea celular.

El procedimiento incluye primero un lavado de la monocapa con D-PBS, un tratamiento con tripsina y, por último, la dilución y cambio a un nuevo frasco.

El frasco contenedor se extrae de la estufa y se introduce en la cámara de la forma descrita en el epígrafe anterior. Las soluciones de medio de cultivo, D-PBS y Tripsina-EDTA, atemperadas y pulverizadas con alcohol, se introducen también en la cámara. Una vez evaporado el alcohol, se aspira el medio de cultivo y se reemplaza por un volumen de D-PBS similar al volumen de medio correspondiente. Se deja actuar en la estufa durante 10 minutos, sacándolo de la cámara de la forma descrita anteriormente. Esta solución contiene Ca^{+2} y Mg^{+2} que eliminarán cualquier traza de suero presente en la monocapa, que podría disminuir la eficacia de la tripsina.

A continuación se saca de nuevo el frasco de la estufa y, en la cámara, se aspira el D-PBS y se sustituye por la cantidad adecuada de una solución de tripsina (1/5 del volumen de medio que se añade al frasco que se está utilizando). Se incuba de nuevo durante unos 10 minutos aproximadamente. La concentración

de tripsina utilizada, el tipo de cultivo, la presencia de suero y de otros factores de crecimiento determinan la eficacia de la tripsina para despegar las células de la base del recipiente. En función de esto, se calcula el tiempo de actuación de la misma. Conviene eliminar o desactivar lo antes posible la tripsina, pues produce daños en las células.

Transcurridos los 10 minutos, las células se encuentran en suspensión en el medio tripsinizado; se adiciona medio de cultivo al recipiente, consiguiendo una dilución de la tripsina 1/5 e inactivándola gracias tanto a la dilución, como a la presencia de los diferentes factores de crecimiento y el suero bovino fetal del medio. Esta suspensión se agita con ayuda de la pipeta y el pipeteador; así, se separan las células. De esta suspensión se toma una pequeña cantidad que se introduce en un nuevo frasco que posee medio de cultivo de tal forma que se practica una dilución 1/5 sobre la inicial.

Es conveniente, al día siguiente de haber realizado esta operación, cambiar el medio de cultivo de los nuevos frascos. Se eliminan así las células que hayan muerto en el proceso y las trazas de tripsina. 24 horas son suficientes para que las células se fijen a la base del recipiente.

2.2.4 Preparación del ensayo

El ensayo se lleva a cabo generando una monocapa sobre membranas de policarbonato de 1 μm de tamaño de poro, con una superficie de 0.9 cm^2 . Estas membranas están insertadas en unas sujeciones de plástico que se colocan en el interior de los pocillos de unas placas de plástico, de tal forma que, el interior de

las membranas simula la zona luminal y el pocillo en el que se coloca la zona basolateral. El montaje se esquematiza en la Figura III.3.

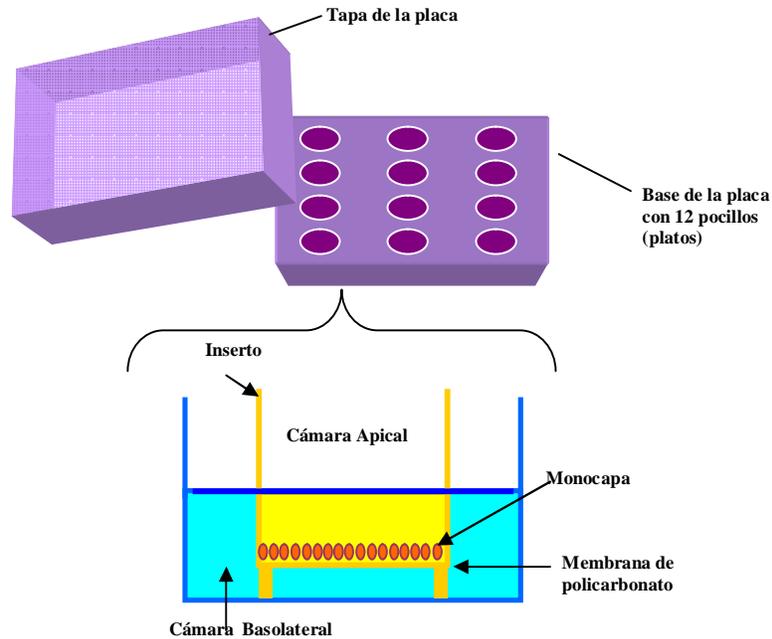


Figura III.3 Esquema del montaje de los pocillos y platos.

Sembrado celular

En primer lugar se lleva a cabo un lavado de la monocapa con D-PBS y el tratamiento con tripsina, según el procedimiento descrito. A continuación, la suspensión celular se coloca en un tubo de centrifuga estéril, se centrifuga 3 minutos a 1500 rpm y se elimina el sobrenadante, que incluye la tripsina. Esta operación se repite, para asegurar que no quedan trazas de la enzima.

El sembrado se realiza a una concentración de 250 células/ μ L. Así pues, hay que ajustar la suspensión celular a esta concentración con ayuda del microscopio y un hemocitómetro. Esta concentración está calculada para obtener la confluencia entre los 19-21 días postsembrado, en el caso de Caco-2 y TC7, y 7-8 días postsembrado en MDCK y MDCK-MDR1, lo que a su vez garantiza el desarrollo de todas las proteínas transportadoras características de este cultivo^{210, 211}.

Tras la aspiración del sobrenadante se adiciona medio de cultivo y, con ayuda del pipeteador, se provoca la separación de las células para obtener una suspensión lo más homogénea posible. En este tubo se introduce una pipeta Pasteur y, por capilaridad, asciende parte de la suspensión de células. Ésta se coloca en el hemocitómetro y se lleva al microscopio para hacer el recuento.

El recuento se realiza en tres de los cuatro recuadros de los vértices. Se cuentan todas las células que quedan en el interior del cuadrado sin tocar los márgenes y sólo las células que se sitúan sobre dos de ellos, seleccionados de antemano. En la Figura III.4 se han dibujado en blanco las células que se admitirían en el recuento y en negro las que se excluirían de la selección, tomándose como válidos los márgenes superior e izquierdo. El número de células presentes en 0.1 μ l, se obtiene como media de los tres recuentos.

Una vez conocida la densidad celular de la suspensión se calcula la dilución necesaria de la misma.

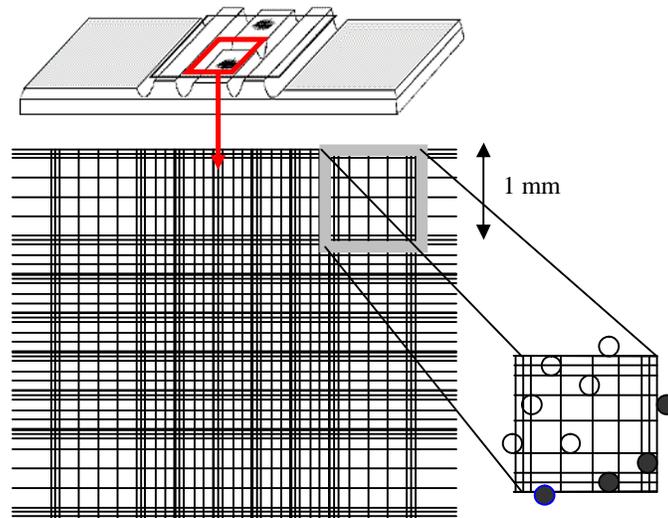


Figura III.4 Hemocitómetro y vista microscópica para el conteo de células.

En el interior de la cámara de flujo laminar se destapan las membranas y con unas pinzas se colocan en los pocillos tras comprobar que no existe ninguna alteración morfológica en la superficie. A los platos preparados, se adiciona 2 ml de medio de cultivo al pocillo y se comprueba que no quedan burbujas entre la membrana y el medio. En estas condiciones, se procede a sembrar la membrana con la suspensión celular preparada. Conviene dejar los platos inmóviles aproximadamente media hora, antes de llevarlos a la estufa, para que las células se asienten antes de ser sometidas a movimientos.

A partir del día de siembra los experimentos se podrán realizar entre el día 19 y el 21, ambos inclusive, en el caso de Caco-2 y TC7, y entre el día 7 y el 9, en el caso de MDCK y MDCK-MDR1. Antes se considera que la confluencia no se ha alcanzado y después se manifiestan fenómenos de envejecimiento celular y comienza a faltar espacio en el inserto para su adecuado desarrollo.

Crecimiento y desarrollo de las monocapas

Al día siguiente del sembrado debe cambiarse el medio de cultivo para eliminar las células que se mueren en este proceso. A partir de este momento, el medio se renueva en días alternos. El día previo al experimento se realiza un cambio de medio, pero esta vez con medio de cultivo sin antibióticos para evitar la interacción con nuestro fármaco el día del experimento.

El cambio de medio se realiza en la cámara de flujo, con ayuda de una pipeta Pasteur y la bomba de vacío; se aspira el medio del interior del pocillo y del inserto. Se sustituye por medio nuevo atemperado.

2.2.5 Experimento

El ensayo se realiza en un incubador con agitación controlada (Rotamax[®]) a 37°C. No son necesarias medidas de seguridad para evitar una posible contaminación pues el experimento dura pocas horas.

Comprobación de la monocapa.

Para comprobar la integridad de la monocapa se utilizó un micro-polímetro (Millicell-ERS[®]). La medida de la resistencia eléctrica del inserto comparada con un inserto sin ningún tipo de crecimiento (control) es un índice contrastado de la seguridad de la monocapa²¹².

Las células se lavan tres veces con una solución atemperada de HBSS con HEPES. Con este tampón se lleva a cabo la medida de resistencia eléctrica.

En primer lugar se coloca un plato con un inserto sin crecimiento en el que sólo se encuentra la solución de HBSS con HEPES. Los electrodos se colocan uno en el interior del pocillo y el otro en el interior del inserto y se ajusta a cero el voltaje. De esta forma se calibra el micro-polímetro. A continuación, se mide la resistencia de este blanco en tres direcciones diferentes, para asegurar la confluencia en toda la superficie y se mide la resistencia de los insertos con crecimiento, inmersos en la misma solución que el blanco para mantener las condiciones (Figura III. 5). Si la resistencia en los insertos es 100 unidades superior a la del blanco, se considera íntegra la monocapa; en caso contrario, se desecha el pocillo.

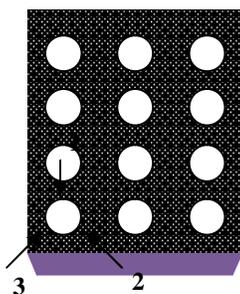


Figura III.5 Puntos del pocillo en los que se comprueba la resistencia para verificar la integridad de la monocapa.

Tras comprobar la integridad de la monocapa, los insertos se incuban en la estufa durante una hora con la solución de HBSS con HEPES con la que se midió la resistencia, con objeto de que las células expulsen cualquier residuo de suero e iones que pudieran interferir en el ensayo.

Ensayo de permeabilidad

Los platos utilizados constan de 12 pocillos. Los ensayos se realizan de modo que en seis de los pocillos se estudia el transporte del metoprolol, en tres de ellos en sentido Apical-Basolateral, adicionando el fármaco en solución libre en el interior del inserto (cámara apical), y en otros tres se estudia el transporte Basolateral-Apical del fármaco, que se adiciona en el interior del pocillo (cámara basolateral). En los otros 6 pocillos se estudia el transporte del verapamilo de igual forma.

Se disponen 0.5 ml de solución en la cámara apical y 1.2 ml en la cámara basolateral. Cuando adicionemos el fármaco en la cámara dadora se dispondrán 0.2 ml más, que serán retirados inmediatamente a fin de tener una muestra a tiempo cero para conocer la concentración inicial exacta de la solución, a la vez que se pone en marcha el cronómetro. Las siguientes tomas de muestras se realizan en la cámara receptora y se repone el volumen extraído con HBSS-HEPES.

Ensayo de recuperación

Finalizada la toma de muestras, las membranas se separan del inserto y se introducen en 1 ml de solución tampón. El fármaco retenido por las células, bien en su citoplasma o adherido a estructuras subcelulares, se extrae en dos operaciones:

1. Congelación-descongelación rápida de la membrana en solución tampón, que se sumerge en nitrógeno líquido primero y en un baño a 37°C a

continuación. Este proceso se realiza tres veces consecutivas. A continuación se centrifuga y se extraen 500 μ l para valorarlo y que corresponde a la cantidad de compuesto retenido por la célula en solución.

2. La otra alícuota se completa hasta 1 ml con metanol y se somete a agitación energética con el objetivo de romper las estructuras subcelulares para que liberen el compuesto, se centrifugan y, posteriormente se valora.

La cantidad de compuesto retenido en total corresponde a la suma de ambas valoraciones. Ello permite comprobar el balance de masas.

2.3 Tratamiento de muestras

Las muestras recogidas se centrifugan a 3000 rpm durante 3 minutos. De este modo, se obtiene un sobrenadante que contiene en disolución el compuesto ensayado y un sedimento sólido, que son restos de membrana que podrían alterar la valoración por obstrucción del sistema cromatográfico y causar la aparición de picos aleatorios u oscilaciones de la línea base. Por lo tanto, en el cromatógrafo sólo se introduce el sobrenadante de las muestras.

Aproximadamente 0.15 ml de este sobrenadante se coloca en los viales adecuados según el tipo de inyector automático que se vaya a utilizar. En nuestro caso se utilizaron viales Snap Cap ámbar de 2 ml de capacidad, con un inserto de vidrio en su interior con una capacidad de 0.2 ml, y con un tapón Septum propileno PTFE, con el fin de evitar evaporaciones.

2.4 Tratamiento matemático

2.4.1. Cálculo de la permeabilidad

La valoración de las muestras permite conocer la cantidad de fármaco que aparece en el compartimento receptor a cada tiempo.

El proceso puede tratarse como una difusión pasiva, de forma que puede describirse mediante la siguiente expresión (condiciones sink):

$$\frac{dQ}{dt} = P_{ef} \cdot S \cdot C$$

en la que dQ/dt representa la velocidad de cantidad permeada, P_{ef} , el coeficiente de permeabilidad efectiva, S el área de difusión y C , la concentración inicial del fármaco en estudio.

Si se estima la pendiente de la recta obtenida al representar las cantidades acumuladas en compartimento receptor frente al tiempo, se puede conocer la permeabilidad efectiva en este modelo *in vitro*, ya que:

$$P_{ef} = \frac{b}{S \cdot C}$$

expresión en la que b es la pendiente de la recta mencionada.

En el caso que no se cumpla que la concentración de fármaco en el compartimento receptor a tiempo t no rebase nunca el 10% de la concentración inicial en el compartimento dador corregiremos el valor de la concentración en el

compartimento dador para cada tiempo para evitar que los valores calculados de la Peff estén infravalorados (condiciones non-sink) ¹⁸².

$$\frac{M_R}{M_{D(0)}} = \left(\frac{V_R}{V_R + V_D} \right) \cdot (1 - e^{-\alpha \cdot \beta \cdot t})$$

$$\alpha = A \cdot P_{app} / V_D$$

$$\beta = \frac{V_R + V_D}{V_R}$$

donde M_R es la cantidad de fármaco en la cámara receptora, $M_{D(0)}$ es la cantidad en la cámara dadora a tiempo igual a 0, V_R y V_D son los volúmenes de ambas cámara, A es el área de difusión y P_{app} es el coeficiente de permeabilidad aparente.

La permeabilidad efectiva se ha determinado en los dos sentidos. Así se diferencia entre la permeabilidad en sentido Apical-Basolateral P_{AB} y la permeabilidad en el sentido contrario, P_{BA} , Basolateral-Apical.

El cociente de ambas permeabilidades R (P_{BA}/P_{AB}), proporciona una información muy útil acerca del mecanismo de transporte implicado en el proceso, siempre que las soluciones de las cámaras apical y basal estén ajustadas al mismo pH.

Si R se aproxima a la unidad, implica que la permeabilidad en sentido Apical-Basolateral es prácticamente igual a la permeabilidad en sentido Basolateral-Apical. Por lo tanto, se considera que el fármaco se transporta únicamente por difusión pasiva.

Si R es mayor que la unidad, implica que la permeabilidad en sentido Basolateral-Apical es mayor que la permeabilidad en sentido Apical-Basolateral, es decir, el fármaco atraviesa la membrana a mayor velocidad en el sentido Basolateral-Apical que en el opuesto. Si el camino difusional se supone el mismo, puede deducirse la existencia de un transportador que funcione, con o sin aporte energético, que tiene lugar en la membrana basolateral.

Si R es menor que la unidad, representa que la permeabilidad en sentido Basolateral-Apical es menor que en el opuesto. Por lo tanto, se puede hablar de la existencia de un transportador en el sentido Apical-Basolateral para el verapamilo.

La regresión lineal por mínimos cuadrados para el cálculo de la permeabilidad se ha llevado a cabo mediante el paquete estadístico SPSS 15.0[®].

3. Detección de la apoptosis por citometría de flujo

El porcentaje de apoptosis *in vitro* producida en los diferentes pases celulares se determinó por citometría de flujo usando el Kit de detección de apoptosis anexina V- fluoresceína isotiocianato (FITC), que cuantifica los residuos de fosfatidilserina (PS) de la parte exterior de la membrana. Se determinó en el pase celular inicial y en el final de cada línea celular.

En las células normales la distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática es asimétrica, la membrana interna contiene fosfolípidos aniónicos como fosfatidilserina (PS), y la externa fundamentalmente fosfolípidos neutros. En una célula apoptótica se produce una traslocación de los restos de PS de membrana interna a membrana externa, exponiendo de esta manera los restos de

PS al exterior. Esto ocurre en las primeras etapas, en la fase de apoptosis temprana, donde se mantiene la integridad de la membrana plasmática.

La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, la cual tiene una gran afinidad de unión a los restos PS. Por tanto, la anexina puede unirse a los restos PS de las células apoptóticas al ser accesibles por estar en el exterior. De esta manera se puede discriminar entre células apoptóticas y células normales.

La anexina V usada está conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) pudiendo detectar esta fluorescencia por citometría de flujo.

3.1 Material

Annexin V FITC Kit:

- Anexina V humana recombinante, conjugada con FITC
- Yoduro de propidio
- Tampón de unión concentrado (Annexin V-Binding Buffer 10x)
- Agua bidestilada
- Medio de cultivo
- PBS
- Tubos de polipropileno 12x75 mm
- Citómetro de Flujo: COULTER® EPICS® XL-MCL

3.2 Procedimiento:

1. Obtener suspensiones de células individuales por los procedimientos específicos descritos anteriormente.
2. Lavar las células dos veces con PBS frío y centrifugar 3 minutos a 1500 rpm.
3. Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón celular en tampón de unión diluido (Annexin V-Binding Buffer 10x) a una concentración de 10^6 células/ml.
4. Dispensar en tubo de propileno 200 μ l de suspensión celular y añadir 10 μ l de anexina V-FITC y 10 μ l de solución de yoduro de propidio, excepto a los 3 controles que llevarán o anexina V-FITC, o yoduro de propicio o nada.
5. Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos.
6. Añadir 600 μ l de tampón de unión (Annexin V-Binding Buffer 10x).
7. Analizar la muestra por citometría de flujo.

Dado que la membrana de las células necróticas se permeabiliza, para distinguirlas de las apoptóticas se utiliza un colorante de unión a DNA, el yoduro de propidio (IP). Sólo las células con la membrana permeabilizada (necróticas) podrán tomar el fluorocromo.

De esta manera distinguimos:

- Células viables: no unen anexina y excluyen IP
- Células en apoptosis temprana: unen anexina y excluyen IP
- Células en apoptosis tardía: unen anexina e incorporan IP
- Células necróticas: no unen anexina e incorporan IP, o sólo incorporan IP.

D. Valoración de muestras

La valoración de las muestras se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) de fase inversa y detección por Fluorescencia. El método analítico empleado para este trabajo ha sido validado en nuestro departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

La funcionalidad del método analítico se comprobó diariamente a través de una curva de calibración con patrones de concentración conocida.

1. Elementos cromatográficos

Se ha utilizado un sistema cromatográfico compuesto por los siguientes módulos:

- Sistema Alliance (Waters) compuesto por una bomba cuaternaria y un inyector automático.
- Detector programable de Fluorescencia Waters
- Integrador: programa Empower

2. Condiciones cromatográficas

2.1. Determinación del metoprolol

- La *fase estacionaria* seleccionada fue un sistema de fase reversa compuesto por:

- Una columna de acero inoxidable Novopack C-18 de 250 mm de longitud, 3,9 mm de diámetro y tamaño de partícula de 4 μm .
- La *fase móvil* es una mezcla en proporción volumétrica 20: 20:60 de:
 - Acetonitrilo para HPLC
 - Metanol
 - Tampón fosfato pH: 3 (Agua ácida+TFA)
- Detector Fluorescencia: $\lambda_{\text{emisión}} = 231$ $\lambda_{\text{excitación}} = 307$
- Tiempo de retención: 3 min

2.2 Determinación del verapamilo

- La *fase estacionaria* seleccionada fue un sistema de fase reversa compuesto por:
 - Una columna de acero inoxidable Novopack C-18 de 250 mm de longitud, 3,9 mm de diámetro y tamaño de partícula de 4 μm .
- La *fase móvil* es una mezcla en proporción volumétrica 40: 60 de:
 - Acetonitrilo para HPLC
 - Tampón fosfato pH: 3 (Agua ácida+TFA)
- Detector Fluorescencia: $\lambda_{\text{emisión}} = 275$ $\lambda_{\text{excitación}} = 320$
- Tiempo de retención: 3 min

La fase móvil se hace pasar a través de un filtro Millipore GVWP de 230 nm de diámetro de poro, para eliminar posibles partículas en suspensión. Este mismo proceso desgasifica la mezcla.

El flujo de elución fue de 1 ml/min a temperatura ambiente.

E. Validación del método analítico

Con el fin de obtener la concentración de compuesto en cada muestra se construyeron curvas de calibración. Se partió de la premisa de que las áreas del cromatograma y las concentraciones de las curvas de calibración se correlacionan linealmente. Para asegurar la calidad de los resultados, es necesario comprobar la linealidad del modelo, la precisión y exactitud del método analítico y los límites de detección y cuantificación.

1. Ensayo de linealidad

Se elaboraron rectas de calibración, que abarcaban el ámbito de concentraciones necesario para valorar las muestras por interpolación. Las diluciones patrón correspondientes a las curvas de calibrado se sometieron al mismo tratamiento que las muestras experimentales a valorar. Se realizó una regresión lineal entre las áreas del cromatograma (eje de ordenadas) obtenidas y las concentraciones teóricas (eje de abcisas), de acuerdo con la ecuación:

$$y = mx + b$$

donde y corresponde al área del cromatograma y x a la concentración de patrón.

2. Ensayo de precisión y exactitud

Con el fin de determinar la exactitud y precisión de los modelos se valoraron patrones de concentración conocida dentro de las curvas de calibración. Para cada concentración de patrón se determinó la exactitud del modelo partiendo de los errores absolutos y relativos de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\varepsilon_{\text{absoluto}} = C_{\text{teórica}} - C_{\text{experimental}}$$

$$\varepsilon_{\text{relativo}} = \frac{C_{\text{teórica}} - C_{\text{experimental}}}{C_{\text{teórica}}} \times 100$$

en las que $C_{\text{teórica}}$ corresponde a la concentración teórica del patrón y $C_{\text{experimental}}$ corresponde a la concentración del patrón calculada experimentalmente mediante interpolación en la curva de calibración.

La precisión se calculó mediante el coeficiente de variación de la media de los valores de las concentraciones estimadas.

3. Límite de detección y cuantificación

Se estableció el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$LD = \frac{3.3 \cdot \sigma}{m}$$

$$LC = \frac{10 \cdot \sigma}{m}$$

en las que σ es la desviación estándar de la ordenada en el origen de la recta de regresión y m es la pendiente de la misma.

F. Métodos matemáticos y estadísticos

1. Análisis de regresión

Se empleó un análisis lineal simple por mínimos cuadrados para determinar la rectas de calibración para la valoración del fármaco y el coeficiente de permeabilidad de los ensayos *in vitro* (P_{AB} , P_{BA}). Todo ello se realizó con el programa SPSS 15.0[®] para Windows.

Para comprobar la dependencia lineal de las rectas se utilizó el coeficiente de correlación r . Cuanto más próximo está r a la unidad, mejor es el modelo.

2. Pruebas de comparación de medias

En este trabajo se han utilizado diferentes pruebas paramétricas de comparación de medias de los diferentes grupos de ensayos, fijando un nivel de confianza del 95% de modo que se determina la existencia de diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de probabilidad p es menor del 5%. Para poder aplicar este tipo de pruebas paramétricas deben cumplirse las

condiciones de que la distribución siga la ley normal y que las varianzas sean homogéneas.

Por ello, antes de realizar el análisis comparativo, se ha realizado un ensayo de homogeneidad de varianzas, mediante la prueba de Levene. Si se cumple que p es mayor de 0.05, es decir si las varianzas son homogéneas, pueden aplicarse:

- Anova de un factor
- Prueba de Scheffé

2.1. Análisis de varianza global: Anova de un factor

Este análisis se realiza para detectar diferencias significativas entre las permeabilidades aparentes (P_{app}). Se seleccionó un nivel de confianza del 95%, de modo que se determina la existencia de diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de probabilidad p es menor del 5%, para discriminar si los coeficientes de permeabilidad (P_{AB} , P_{BA}) presentan o no diferencias significativas.

2.2. Pruebas de comparación múltiple: Prueba de Scheffé

Esta prueba se basa en comparar todos los grupos de valores uno por uno con todos los demás de forma independiente, para poder así establecer las diferencias significativas entre dos grupos de datos. Se seleccionó un nivel de significación $\alpha=0.05$.

Por otro lado, si no se cumplen los criterios de homocedasticidad, se debe recurrir a pruebas de comparación no paramétricas, como el contraste de Kruskal-Wallis.

2.3. Contraste de Kruskal-Wallis

El contraste de **Kruskall-Wallis** es la alternativa no paramétrica del método ANOVA, es decir, sirve para contrastar la hipótesis de que k muestras cuantitativas han sido obtenidas de la misma población. La única exigencia versa sobre la aleatoriedad en la extracción de las muestras, no haciendo referencia a ninguna de las otras condiciones adicionales de homocedasticidad y normalidad necesarias para la aplicación del test paramétrico ANOVA.

2.4. Análisis de varianza factorial univariante

Los modelos factoriales de análisis de varianza sirven para evaluar el efecto individual y conjunto de dos o más factores (variables independientes categóricas) sobre una variable dependiente cuantitativa. Utilizar más de un factor en un mismo diseño posee la ventaja de poder estudiar el efecto de la interacción entre los factores.

El procedimiento univariante ofrece la posibilidad de trabajar tanto con factores de efectos fijos como factores de efectos aleatorios.

La sintaxis establecida para el análisis de varianza factorial univariante en este trabajo tanto para el metoprolol como para el verapamilo se representa a continuación:

UNIANOVA

Nper BY Direccion Pase Linea Plato WITH teerRATIO

/RANDOM = Plato

/CONTRAST (Direccion)=Difference/CONTRAST (Pase)=Difference/CONTRAST

(Linea)=Difference

/METHOD = SSTYPE(3)

/INTERCEPT = EXCLUDE

/EMMEANS = TABLES(Pase) WITH(teerRATIO=MEAN)

/EMMEANS = TABLES(Linea) WITH(teerRATIO=MEAN)

/EMMEANS = TABLES(Plato) WITH(teerRATIO=MEAN)

/EMMEANS = TABLES(Direccion) WITH(teerRATIO=MEAN)

/PRINT = PARAMETER

/CRITERIA = ALPHA(.05)

/DESIGN = Pase Linea Pase*Linea Plato(Pase*Linea) Direccion Direccion*Linea
teerRatio.

IV. Resultados

A. Ensayo de reabsorción de agua

Según se explicó en materiales y métodos la variación del volumen de solución se calcula por ajuste a una cinética de orden cero del volumen a tiempo cero (V_0) y el volumen final (V_f).

El cálculo del volumen a tiempo cero (V_0) se ha realizado mediante ensayos de reabsorción con tres animales de experimentación. La técnica experimental coincide con la desarrollada en el capítulo de materiales y métodos,

pero se perfunde solución B. Una vez perfundido se hace el ensayo de reabsorción inmediatamente y se mide el volumen remanente (V_0). En la Tabla IV.1 se muestran los valores individuales del volumen a tiempo cero, así como el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de dichas medidas.

No se ha considerado la influencia de las distintas concentraciones de los fármacos ya que se ha demostrado en trabajos anteriores que no es estadísticamente significativa.

Animal de experimentación			
Volumen a tiempo cero V_0 (ml)	1	2	3
	10.8	11.0	10.9
$V_0 \pm DE = 10.9 \pm 0.1$ ml			
CV = 1%			

Tabla IV.1 Valores individuales y valor medio de los volúmenes remanentes (ml) a tiempo cero en intestino completo de rata Wistar. DE: desviación estándar.

B. Constante de velocidad de absorción

En las tablas que se muestran a continuación se exponen los resultados de los experimentos individuales realizados *in situ* con los compuestos metoprolol (MET) y verapamilo (VER) a una única concentración de 100 μ M.

En cada Tabla se detalla:

- Concentraciones remanentes en lumen, expresadas en $\mu\text{g/ml}$, y los tiempos de toma de muestras para cada animal, expresados en minutos.
- Constantes de absorción individuales (K_{ap}) y sus desviaciones estándar (DE) expresadas ambas en horas^{-1} .
- Valores del coeficiente de permeabilidad (P_{ap}) y su desviaciones estándar (DE) expresadas ambas en (cm/s)

1. Estudios en intestino completo

1.1 Metoprolol

1.1.1 Wistar Unilever

W. UNILEVER MACHO MET-100 μM						
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)					
	Animal de experimentación					
	1	2	3	4	5	6
5	40,59	35,89	84,09	38,31	42,07	74,61
10	32,11	32,57	74,59	33,83	42,55	62,53
15	28,56	24,76	60,57	27,32	33,33	52,51
20	21,44	22,47	50,56	17,54	29,19	42,07
25	16,58	14,34	40,09	17,61	21,34	35,42
30	11,48	13,21	31,62	13,32	15,17	26,44
$K_{ap}(\text{h}^{-1})$	2,94	2,59	2,38	2,63	2,50	2,44
$K_{ap} \pm \text{DE} = 2,58 \pm 0,20 \text{ h}^{-1}$						
$P_{ap} \pm \text{DE} = 6,39 \cdot 10^{-5} \pm 4,93 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$						

Tabla IV.2 Concentración de metoprolol remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución metoprolol a una concentración de 100 μM en ratas macho de la raza Wistar Unilever.

W. UNILEVER HEMBRA MET-100 μM								
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g}/\text{ml}$)							
	Animal de experimentación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5	49,01	45,55	87,62	61,37	49,92	44,16	86,64	88,50
10	41,84	36,80	76,32	52,62	39,67	37,96	72,55	73,64
15	34,01	29,95	62,52	45,45	30,46	31,37	57,76	49,62
20	28,64	25,15	51,71	38,06	22,63	24,44	40,72	38,99
25	23,05	17,62	40,31	30,57	15,89	18,21	32,30	32,22
30	17,59	12,26	31,75	23,42	10,83	12,71	23,68	24,14
$K_{\text{ap}}(\text{h}^{-1})$	2,43	3,07	2,46	2,27	3,66	2,98	3,18	3,16
$K_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 2,90 \pm 0,47 \text{ h}^{-1}$								
$P_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 7,19 \cdot 10^{-5} \pm 1,17 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$								

Tabla IV.3 Concentración de metoprolol remanente ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución metoprolol a una concentración de $100 \mu\text{M}$ en ratas hembra de la raza Wistar Unilever.

1.1.2 Wistar Han

W. HAN MACHO MET-100 μM								
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)							
	Animal de experimentación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5	69,69	87,73	72,74	66,55	72,90	70,65	66,17	74,26
10	64,94	76,93	61,51	59,06	66,07	60,53	54,22	63,18
15	47,49	57,67	45,98	45,23	44,69	48,70	44,70	47,78
20	39,78	45,91	38,37	38,89	40,01	40,09	34,10	39,32
25	27,06	33,95	28,56	28,12	25,90	31,34	25,41	27,53
30	23,37	25,92	21,15	23,08	21,66	26,55	19,37	20,85
$K_{ap}(\text{h}^{-1})$	2,83	3,01	2,97	2,63	3,08	2,42	2,98	3,10
$K_{ap} \pm \text{DE} = 2,88 \pm 0,24 \text{ h}^{-1}$								
$P_{ap} \pm \text{DE} = 7,13 \cdot 10^{-5} \pm 5,92 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$								

Tabla IV.4 Concentración de metoprolol remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución metoprolol a una concentración de 100 μM en ratas macho de la raza Wistar Han.

W. HAN HEMBRA MET-100 μM								
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)							
	Animal de experimentación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5	84,29	78,60	88,14	94,00	87,78	77,85	71,16	73,59
10	72,70	77,47	79,40	80,45	77,12	63,24	62,72	69,84
15	55,97	59,90	56,15	59,58	60,48	50,52	43,07	53,40
20	48,51	51,36	35,30	49,76	54,74	43,38	35,14	44,54
25	34,36	39,33	33,05	36,78	43,44	33,91	30,39	32,61
30	32,25	32,08	28,13	29,86	37,42	27,20	25,36	28,09
$K_{\text{ap}}(\text{h}^{-1})$	2,47	2,29	3,02	2,83	2,09	2,50	2,58	2,50
$K_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 2,54 \pm 0,29 \text{ h}^{-1}$								
$P_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 6,28 \cdot 10^{-5} \pm 7,19 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$								

Tabla IV.5 Concentración de metoprolol remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución metoprolol a una concentración de 100 μM en ratas hembra de la raza Wistar Han.

1.1.3 CD*IGS

CD MACHO MET-100 μM								
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)							
	Animal de experimentación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5	47,18	44,26	55,90	60,38	57,31	58,08	52,04	60,78
10	36,66	33,08	49,57	50,69	52,22	51,74	49,67	53,35
15	27,70	27,52	36,10	37,92	40,66	38,72	36,70	40,25
20	22,58	18,80	31,71	27,43	33,97	32,42	31,45	35,12
25	15,04	13,43	23,78	17,72	25,78	21,97	22,06	26,70
30	10,84	7,50	20,58	10,06	21,07	19,00	17,93	22,27
$K_{ap}(h^{-1})$	3,51	4,10	2,51	4,26	2,50	2,86	2,71	2,48
$K_{ap} \pm DE = 3,12 \pm 0,74 h^{-1}$								
$P_{ap} \pm DE = 7,72 \cdot 10^{-5} \pm 1,83 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$								

Tabla IV.6 Concentración de metoprolol remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución metoprolol a una concentración de 100 μM en ratas macho de la raza CD*IGS.

CD HEMBRA MET-100 μM								
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)							
	Animal de experimentación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5	63,28	66,72	60,54	67,24	56,81	63,45	68,27	57,92
10	53,25	60,33	54,91	55,85	51,70	57,89	62,97	49,24
15	44,97	49,39	45,39	51,12	43,62	49,20	54,15	37,10
20	39,90	43,81	38,39	43,55	38,50	43,18	47,74	39,91
25	33,87	36,42	30,65	36,65	32,20	36,40	40,94	32,64
30	29,99	31,69	25,84	31,02	27,99	30,62	30,39	27,91
$K_{ap}(\text{h}^{-1})$	1,79	1,84	2,12	1,81	1,74	1,77	1,87	1,65
$K_{ap} \pm \text{DE} = 1,82 \pm 0,14 \text{ h}^{-1}$								
$P_{ap} \pm \text{DE} = 4,52 \cdot 10^{-5} \pm 3,40 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$								

Tabla IV.7 Concentración de metoprolol remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución metoprolol a una concentración de $100 \mu\text{M}$ en ratas hembra de la raza CD*IGS.

1.1.4 Long Evans

LE MACHO MET-100 μM					
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)				
	Animal de experimentación				
	1	2	3	4	5
5	49,75	71,99	66,76	55,29	45,22
10	45,38	67,63	65,76	57,40	45,90
15	28,39	41,09	49,38	32,38	33,91
20	28,93	45,79	43,32	34,71	30,49
25	13,69	25,39	30,85	19,10	21,82
30	17,51	28,15	27,62	19,22	18,60
$K_{ap}(\text{h}^{-1})$	3,02	2,58	2,34	2,92	2,32
$K_{ap} \pm \text{DE} = 2,64 \pm 0,32 \text{ h}^{-1}$					
$P_{ap} \pm \text{DE} = 6,53 \cdot 10^{-5} \pm 7,98 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$					

Tabla IV.8 Concentración de metoprolol remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución metoprolol a una concentración de $100 \mu\text{M}$ en ratas macho de la raza Long Evans.

LE HEMBRA MET-100 μM						
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)					
	Animal de experimentación					
	1	2	3	4	5	6
5	43,34	40,31	39,37	51,84	54,92	55,23
10	39,99	38,89	35,66	55,57	52,26	53,51
15	30,83	29,44	27,44	34,27	41,01	41,83
20	26,51	24,88	23,47	30,66	35,27	37,79
25	19,52	19,02	17,46	22,95	27,68	29,57
30	15,35	15,57	14,20	21,07	22,65	24,71
$K_{ap}(\text{h}^{-1})$	2,57	2,42	2,54	2,49	2,22	2,02
$K_{ap} \pm \text{DE} = 2,38 \pm 0,21 \text{ h}^{-1}$						
$P_{ap} \pm \text{DE} = 5,89 \cdot 10^{-5} \pm 5,26 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$						

Tabla IV.9 Concentración de metoprolol remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución metoprolol a una concentración de $100 \mu\text{M}$ en ratas hembra de la raza Long Evans.

1.1.5 Sprague Dawley

SD MACHO MET-100 μM								
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)							
	Animal de experimentación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5	65,11	60,28	71,12	60,13	71,28	68,90	149,73	70,76
10	64,45	67,81	64,44	69,31	61,68	66,16	136,73	65,84
15	50,89	40,59	50,19	46,33	50,40	54,38	110,41	52,20
20	48,91	50,88	43,38	47,85	48,29	49,73	105,73	46,92
25	36,35	34,66	36,20	35,37	34,91	39,79	87,75	38,82
30	33,66	31,47	30,63	31,73	35,04	34,08	80,19	33,70
$K_{\text{ap}}(\text{h}^{-1})$	1,73	1,73	2,09	1,78	1,82	1,76	1,54	1,85
$K_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 1,79 \pm 0,15 \text{ h}^{-1}$								
$P_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 4,43 \cdot 10^{-5} \pm 3,78 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$								

Tabla IV.10 Concentración de metoprolol remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución metoprolol a una concentración de 100 μM en ratas macho de la raza Sprague Dawley.

SD HEMBRA MET-100 μM								
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)							
	Animal de experimentación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5	77,32	81,85	83,89	86,04	66,82	109,06	100,08	63,71
10	74,24	75,10	76,57	77,53	62,07	97,17	88,87	58,61
15	60,27	64,04	65,01	66,11	53,31	83,20	77,24	48,94
20	57,09	56,11	58,03	62,19	47,14	75,91	69,83	42,79
25	44,43	47,61	52,23	52,71	40,30	66,45	60,60	36,05
30	41,80	43,86	45,90	47,33	35,59	60,83	54,87	30,96
$K_{\text{ap}}(\text{h}^{-1})$	1,60	1,58	1,47	1,44	1,57	1,42	1,46	1,78
$K_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 1,54 \pm 0,12 \text{ h}^{-1}$								
$P_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 3,82 \cdot 10^{-5} \pm 2,97 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$								

Tabla IV.11 Concentración de metoprolol remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución metoprolol a una concentración de 100 μM en ratas hembra de la raza Sprague Dawley.

En la Figura IV. 1 se muestran gráficamente las constantes aparentes de velocidad de absorción (K_{ap}) a la concentración de 100 μM de metoprolol frente a las distintas razas y sexos de las ratas ensayadas.

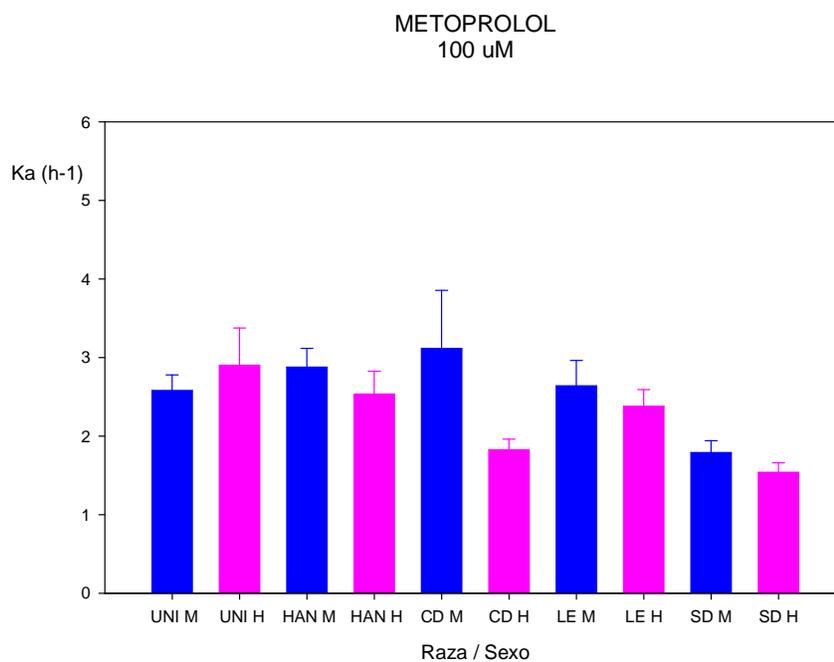


Figura IV.1 Representación gráfica de las constantes aparentes de velocidad (K_{ap}) de metoprolol 100 μ M frente a las distintas razas y sexos de las ratas ensayadas.

METOPROLOL	$K_{ap} \pm DE$ (h ⁻¹)	
	MACHO	HEMBRA
Wistar Han	$2,88 \pm 2,39 \cdot 10^{-1}$	$2,54 \pm 2,90 \cdot 10^{-1}$
Wistar Unilever	$2,58 \pm 1,99 \cdot 10^{-1}$	$2,90 \pm 4,74 \cdot 10^{-1}$
CD* IGS	$3,12 \pm 7,38 \cdot 10^{-1}$	$1,82 \pm 1,37 \cdot 10^{-1}$
Long Evans	$2,64 \pm 3,22 \cdot 10^{-1}$	$2,38 \pm 2,12 \cdot 10^{-1}$
Sprague Dawley	$1,79 \pm 1,52 \cdot 10^{-1}$	$1,54 \pm 1,20 \cdot 10^{-1}$

Tabla IV.12 Constantes aparentes de velocidad de absorción (K_{ap}) de metoprolol en las distintas razas y sexos.

Con el fin de establecer si la raza y el sexo del animal empleado para los ensayos de absorción son factores que influyen en los valores de las constantes aparentes de velocidad de absorción (K_{ap}) obtenidos se procedió a realizar un análisis estadístico de comparación de las K_{ap} obtenidas para cada animal a una única concentración ensayada del compuesto.

Los resultados obtenidos tras realizar una prueba no paramétrica de comparación múltiple (Kruskal-Wallis) se detallan en la Tabla IV.13. Previamente se aplicó la prueba de Levene que demostró que las varianzas no son homogéneas.

MET 100 μ M		W UNI		W HAN		CD		LE		SD	
		M	H	M	H	M	H	M	H	M	H
W UNI	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W HAN	M	NS	NS	-	-	-	-	-	-	-	-
	H	NS	NS	NS	-	-	-	-	-	-	-
CD	M	NS	NS	NS	NS	-	-	-	-	-	-
	H	NS	S	S	NS	S	-	-	-	-	-
LE	M	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-	-	-	-
	H	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-	-	-
SD	M	NS	S	S	S	S	NS	S	NS	-	-
	H	S	S	S	S	S	NS	S	S	NS	-

Tabla IV.13 Resultado de la comparación múltiple de las K_{ap} de metoprolol 100 μ M obtenidas en las distintas razas y sexos de las ratas ensayadas. S o NS indican si existen o no diferencias significativas, respectivamente.

Finalmente se calcularon los coeficientes de variación (CV) para cada raza y sexo. Los resultados obtenidos se detallan en las Tablas IV. 14, IV. 15 y IV. 16.

Raza y Sexo		Kap Media(h ⁻¹)	DE(h ⁻¹)	CV(%)
W. Unilever	Macho	2,58	0,20	7,72
	Hembra	2,90	0,47	16,33
W. Han	Macho	2,88	0,24	8,31
	Hembra	2,54	0,29	11,44
CD*IGS	Macho	3,12	0,74	23,69
	Hembra	1,82	0,14	7,52
Long Evans	Macho	2,64	0,32	12,22
	Hembra	2,38	0,21	8,92
Sprague Dawley	Macho	1,79	0,15	8,53
	Hembra	1,54	0,12	7,78

Tabla IV.14 Resultado de los Coeficientes de variación calculados a partir de las K_{ap} de metoprolol 100 μ M obtenidas en las distintas razas y sexos de las ratas ensayadas.

Raza	Kap Media(h⁻¹)	DE(h⁻¹)	CV(%)
W. Unilever	2,76	0,40	14,62
W. Han	2,71	0,31	11,52
CD*IGS	2,47	0,84	34,08
Long Evans	2,49	0,29	11,48
Sprague Dawley	1,66	0,18	11,04

Tabla IV.15 Resultado de los Coeficientes de variación calculados a partir de las K_{ap} de metoprolol 100 μ M obtenidas en las distintas razas de las ratas ensayadas.

Sexo	Kap Media(h⁻¹)	DE(h⁻¹)	CV(%)
Macho	2,60	0,62	23,84
Hembra	2,23	0,57	25,79

Tabla IV.16 Resultado de los Coeficientes de variación calculados a partir de las K_{ap} de metoprolol 100 μ M obtenidas en los distintos sexos de las ratas ensayadas.

1.2 Verapamilo

1.2.1 Wistar Unilever

W. UNILEVER MACHO VER-100 μM								
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)							
	Animal de experimentación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5	63,02	62,07	60,12	75,49	81,36	60,04	53,74	50,96
10	46,51	48,34	44,04	58,02	53,40	49,43	47,87	44,60
15	29,69	33,58	25,76	39,65	23,31	28,09	24,07	27,95
20	22,25	25,59	21,48	30,75	26,16	24,23	22,85	23,86
25	12,43	16,54	9,90	21,01	18,15	13,49	14,74	12,43
30	8,61	13,39	9,14	16,22	14,38	9,81	9,22	11,32
$K_{ap}(\text{h}^{-1})$	4,87	3,83	4,83	3,77	4,04	4,49	4,25	3,95
$K_{ap} \pm \text{DE} = 4,25 \pm 0,43 \text{ h}^{-1}$								
$P_{ap} \pm \text{DE} = 1,05 \cdot 10^{-4} \pm 1,08 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$								

Tabla IV.17 Concentración de verapamilo remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución verapamilo a una concentración de $100 \mu\text{M}$ en ratas macho de la raza Wistar Unilever.

W. UNILEVER HEMBRA VER-100 μM								
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g}/\text{ml}$)							
	Animal de experimentación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5	53,94	60,78	58,49	57,02	70,77	58,01	62,15	64,57
10	45,67	50,89	51,52	48,09	56,77	47,39	53,26	58,62
15	34,75	38,21	41,72	37,20	45,02	40,96	42,73	47,10
20	28,75	32,35	35,82	32,80	39,08	36,48	35,90	39,95
25	23,14	25,66	30,17	25,16	29,87	30,57	30,56	33,57
30	18,51	21,11	25,52	21,61	25,97	27,11	26,16	30,10
$K_{\text{ap}}(\text{h}^{-1})$	2,60	2,57	2,02	2,37	2,43	1,79	2,11	1,94
$K_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 2,23 \pm 0,34 \text{ h}^{-1}$								
$P_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 5,52 \cdot 10^{-5} \pm 7,54 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$								

Tabla IV.18 Concentración de verapamilo remanente ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución verapamilo a una concentración de $100 \mu\text{M}$ en ratas hembra de la raza Wistar Unilever.

1.2.2 Wistar Han

W. HAN MACHO VER-100 μM							
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)						
	Animal de experimentación						
	1	2	3	4	5	6	7
5	56,72	54,53	53,31	61,12	69,30	73,95	65,57
10	46,86	45,34	45,23	49,34	57,96	59,84	54,24
15	36,71	33,67	34,03	38,77	44,78	49,93	41,34
20	32,05	28,71	28,87	32,14	40,43	41,06	33,42
25	24,82	20,91	22,14	24,94	32,68	34,35	24,98
30	21,86	19,25	18,96	21,54	28,71	30,26	21,89
$K_{ap}(\text{h}^{-1})$	2,34	2,64	2,56	2,55	2,14	2,17	2,75
$K_{ap} \pm \text{DE} = 2,45 \pm 0,24 \text{ h}^{-1}$							
$P_{ap} \pm \text{DE} = 6,07 \cdot 10^{-5} \pm 5,85 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$							

Tabla IV.19 Concentración de verapamilo remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución verapamilo a una concentración de 100 μM en ratas macho de la raza Wistar Han.

W. HAN HEMBRA VER-100 μM							
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)						
	Animal de experimentación						
	1	2	3	4	5	6	7
5	51,30	52,81	54,00	62,70	57,17	59,34	52,50
10	42,33	44,29	44,69	49,92	47,76	46,91	40,57
15	30,12	33,49	31,42	38,74	36,07	35,27	27,50
20	24,67	27,25	28,47	31,83	31,28	29,50	23,06
25	18,94	19,16	21,93	23,62	23,31	22,02	17,80
30	15,53	18,11	18,76	20,65	22,20	18,59	14,85
$K_{\text{ap}}(\text{h}^{-1})$	2,94	2,77	2,58	2,74	2,41	2,83	3,07
$K_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 2,76 \pm 0,22 \text{ h}^{-1}$							
$P_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 6,85 \cdot 10^{-5} \pm 5,44 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$							

Tabla IV.20 Concentración de verapamilo remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución verapamilo a una concentración de 100 μM en ratas hembra de la raza Wistar Han.

1.2.3 CD*IGS

CD MACHO VER-100 μM							
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)						
	Animal de experimentación						
	1	2	3	4	5	6	7
5	44,22	55,75	53,88	50,24	54,33	46,52	53,99
10	32,65	40,21	41,82	37,18	43,29	37,62	45,17
15	18,41	24,31	31,58	28,37	26,83	22,32	25,32
20	16,10	19,51	25,46	14,75	22,41	17,95	22,93
25	8,94	9,45	16,85	14,99	16,71	8,41	12,42
30	6,77	7,78	8,95	8,25	8,74	7,09	8,84
$K_{ap}(h^{-1})$	4,60	4,94	4,09	4,26	4,17	4,84	4,46
$K_{ap} \pm DE = 4,48 \pm 0,33 h^{-1}$							
$P_{ap} \pm DE = 1,11 \cdot 10^{-4} \pm 8,17 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$							

Tabla IV.21 Concentración de verapamilo remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución verapamilo a una concentración de 100 μM en ratas macho de la raza CD*IGS.

CD HEMBRA VER-100 μM							
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)						
	Animal de experimentación						
	1	2	3	4	5	6	7
5	54,74	68,35	67,01	53,14	44,29	48,75	46,95
10	47,01	50,55	55,89	41,36	36,24	40,97	37,94
15	34,73	41,24	45,18	30,50	28,15	30,50	28,68
20	27,06	33,12	36,78	24,27	23,23	23,44	23,58
25	19,52	26,39	29,21	18,19	18,81	15,47	16,28
30	16,07	23,44	24,46	14,05	15,20	13,93	12,38
$K_{\text{ap}}(\text{h}^{-1})$	3,09	2,58	2,47	3,20	2,57	3,24	3,22
$K_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 2,91 \pm 0,35 \text{ h}^{-1}$							
$P_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 7,21 \cdot 10^{-5} \pm 8,70 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$							

Tabla IV.22 Concentración de verapamilo remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución verapamilo a una concentración de 100 μM en ratas hembra de la raza CD*IGS.

1.2.4 Long Evans

LE MACHO VER-100 μM						
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)					
	Animal de experimentación					
	1	2	3	4	5	6
5	46,42	51,38	56,58	52,79	54,75	54,00
10	39,57	40,95	44,10	39,32	43,37	44,28
15	17,74	24,50	28,26	26,47	30,70	20,33
20	20,14	20,28	22,06	21,87	24,79	23,75
25	8,83	10,27	11,08	13,63	16,58	14,88
30	8,92	8,26	9,27	11,04	13,40	8,27
$K_{\text{ap}}(\text{h}^{-1})$	4,33	4,62	4,61	3,84	3,47	4,28
$K_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 4,19 \pm 0,45 \text{ h}^{-1}$						
$P_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 1,04 \cdot 10^{-4} \pm 1,12 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$						

Tabla IV.23 Concentración de verapamilo remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución verapamilo a una concentración de $100 \mu\text{M}$ en ratas macho de la raza Long Evans.

LE HEMBRA VER-100 μM								
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)							
	Animal de experimentación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5	61,23	41,66	57,29	57,75	55,84	51,43	55,91	60,15
10	49,28	50,42	50,06	45,01	45,17	47,22	51,16	53,78
15	34,41	24,01	29,70	31,47	33,53	33,85	32,35	35,14
20	29,52	25,77	31,61	28,26	27,98	27,18	29,74	30,77
25	19,40	13,67	16,81	19,11	22,06	20,07	22,21	22,68
30	17,93	14,37	18,83	18,39	19,77	17,15	18,34	20,08
$K_{\text{ap}}(\text{h}^{-1})$	3,12	3,14	3,01	2,88	2,58	2,84	2,80	2,81
$K_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 2,90 \pm 0,19 \text{ h}^{-1}$								
$P_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 7,18 \cdot 10^{-5} \pm 4,61 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$								

Tabla IV.24 Concentración de verapamilo remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución verapamilo a una concentración de 100 μM en ratas hembra de la raza Long Evans.

1.2.5 Sprague Dawley

SD MACHO VER-100 μM						
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)					
	Animal de experimentación					
	1	2	3	4	5	6
5	56,12	63,47	52,81	52,65	48,96	57,81
10	39,90	46,25	43,48	40,94	38,90	45,14
15	28,21	37,04	27,62	29,86	27,63	33,12
20	24,04	28,63	22,95	24,62	23,81	26,05
25	16,91	21,11	20,16	17,19	14,28	20,19
30	14,44	19,02	13,54	14,73	13,67	16,18
$K_{\text{ap}}(\text{h}^{-1})$	3,26	2,96	3,19	3,14	3,27	3,09
$K_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 3,15 \pm 0,12 \text{ h}^{-1}$						
$P_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 7,81 \cdot 10^{-5} \pm 2,89 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$						

Tabla IV.25 Concentración de verapamilo remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución verapamilo a una concentración de 100 μM en ratas macho de la raza Sprague Dawley.

SD HEMBRA VER-100 μM					
Tiempo (min)	Concentraciones remanentes en lumen ($\mu\text{g/ml}$)				
	Animal de experimentación				
	1	2	3	4	5
5	79,99	62,40	67,55	63,43	58,01
10	61,59	50,20	53,76	50,00	45,10
15	51,75	41,80	44,21	37,64	32,26
20	42,44	32,23	30,99	29,80	24,65
25	32,08	25,47	22,05	22,21	17,75
30	24,44	21,09	18,48	18,31	13,86
$K_{\text{ap}}(\text{h}^{-1})$	2,77	2,65	3,26	3,04	3,51
$K_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 3,12 \pm 0,37 \text{ h}^{-1}$					
$P_{\text{ap}} \pm \text{DE} = 7,55 \cdot 10^{-5} \pm 8,71 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$					

Tabla IV.26 Concentración de verapamilo remanente ($\mu\text{g/ml}$) en el lumen intestinal a distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución verapamilo a una concentración de $100 \mu\text{M}$ en ratas hembra de la raza Sprague Dawley.

En la Figura IV-2 se muestran gráficamente las constantes aparentes de velocidad de absorción (K_{ap}) a la concentración de $100 \mu\text{M}$ de verapamilo frente a las distintas razas y sexos de las ratas ensayadas.

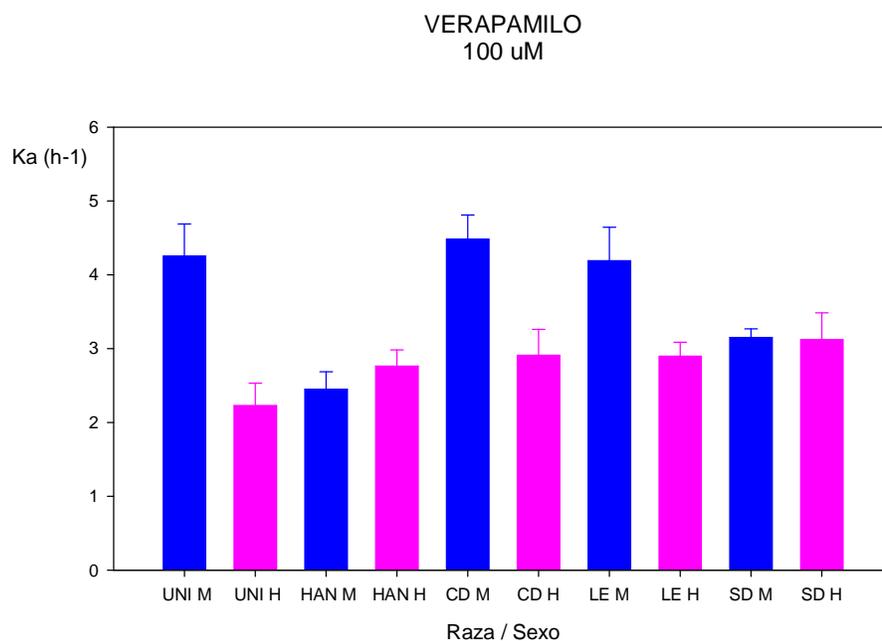


Figura IV.2 Representación gráfica de las constantes aparentes de velocidad (K_{ap}) de verapamilo 100 μ M frente a las distintas razas y sexos de las ratas ensayadas.

VERAPAMILO	$K_{ap} \pm DE$ (h ⁻¹)	
	MACHO	HEMBRA
Wistar Han	$2,45 \pm 2,36 \cdot 10^{-1}$	$2,76 \pm 2,19 \cdot 10^{-1}$
Wistar Unilever	$4,25 \pm 4,34 \cdot 10^{-1}$	$2,23 \pm 3,04 \cdot 10^{-1}$
CD* IGS	$4,48 \pm 3,30 \cdot 10^{-1}$	$2,91 \pm 3,51 \cdot 10^{-1}$
Long Evans	$4,19 \pm 4,54 \cdot 10^{-1}$	$2,90 \pm 1,86 \cdot 10^{-1}$
Sprague Dawley	$3,15 \pm 1,17 \cdot 10^{-1}$	$3,12 \pm 3,65 \cdot 10^{-1}$

Tabla IV.27 Constantes aparentes de velocidad de absorción (K_{ap}) de verapamilo en las distintas razas y sexos.

Con el fin de establecer si la raza y el sexo del animal empleado para los ensayos de absorción son factores que influyen en los valores de las constantes aparentes de velocidad de absorción (K_{ap}) obtenidos se procedió a realizar un análisis estadístico de comparación de las K_{ap} obtenidas para cada animal a una única concentración ensayada del compuesto.

Los resultados obtenidos tras realizar una prueba no paramétrica de comparación múltiple (Kruskal-Wallis) se detallan en la Tabla IV.28. Previamente se aplicó la prueba de Levene que demostró que las varianzas no son homogéneas.

VER 100 μ M		W UNI		W HAN		CD		LE		SD	
		M	H	M	H	M	H	M	H	M	H
W UNI	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W HAN	M	S	NS	-	-	-	-	-	-	-	-
	H	S	NS	NS	-	-	-	-	-	-	-
CD	M	NS	S	S	S	-	-	-	-	-	-
	H	S	NS	NS	NS	S	-	-	-	-	-
LE	M	NS	S	S	S	NS	S	-	-	-	-
	H	S	NS	NS	NS	S	NS	S	-	-	-
SD	M	S	S	NS	NS	S	NS	S	NS	-	-
	H	S	S	NS	NS	S	NS	S	NS	NS	-

Tabla IV.28 Resultado de la comparación múltiple de las K_{ap} de verapamilo 100 μ M obtenidas en las distintas razas y sexos de las ratas ensayadas. S o NS indican si existen o no diferencias significativas, respectivamente.

Finalmente se calcularon los coeficientes de variación (CV) para cada raza y sexo. Los resultados obtenidos se detallan en las Tablas IV. 29, IV. 30 y IV. 31.

Raza y Sexo		Kap Media(h ⁻¹)	DE(h ⁻¹)	CV(%)
W. Unilever	Macho	4,25	0,43	10,21
	Hembra	2,23	0,30	13,65
W. Han	Macho	2,45	0,24	9,64
	Hembra	2,76	0,22	7,94
CD*IGS	Macho	4,48	0,33	7,36
	Hembra	2,91	0,35	12,07
Long Evans	Macho	4,19	0,45	10,83
	Hembra	2,90	0,19	6,42
Sprague Dawley	Macho	3,15	0,12	3,70
	Hembra	3,12	0,36	11,71

Tabla IV.29 Resultado de los Coeficientes de variación calculados a partir de las K_{ap} de verapamilo 100 μ M obtenidas en las distintas razas y sexos de las ratas ensayadas.

Raza	Kap Media(h⁻¹)	DE(h⁻¹)	CV(%)
W. Unilever	3,24	1,11	34,14
W. Han	2,61	0,27	10,46
CD*IGS	3,70	0,88	23,76
Long Evans	3,45	0,73	21,28
Sprague Dawley	3,10	0,24	7,84

Tabla IV.30 Resultado de los Coeficientes de variación calculados a partir de las K_{ap} de verapamilo 100 μ M obtenidas en las distintas razas de las ratas ensayadas.

Sexo	Kap Media(h⁻¹)	DE(h⁻¹)	CV(%)
Macho	3,72	0,86	23,04
Hembra	2,74	0,40	14,51

Tabla IV.31 Resultado de los Coeficientes de variación calculados a partir de las K_{ap} de verapamilo 100 μ M obtenidas en los distintos sexos de las ratas ensayadas.

Con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los valores de las constantes de velocidad de absorción (K_{ap}) entre los machos y las hembras dentro de una misma raza de rata se procedió a realizar la prueba t de Student para cada compuesto.

W Unilever	t	Grados de libertad	Sig.
MET 100 μ M	1,726	9,916	NS
VER 100 μ M	10,803	14	S

Tabla IV.32 Prueba de t de Student para la comparación de las K_{ap} obtenidas para cada sexo dentro de la raza de rata Wistar Unilever y para cada uno de los compuestos, metoprolol y verapamilo, a una única concentración de 100 μ M.

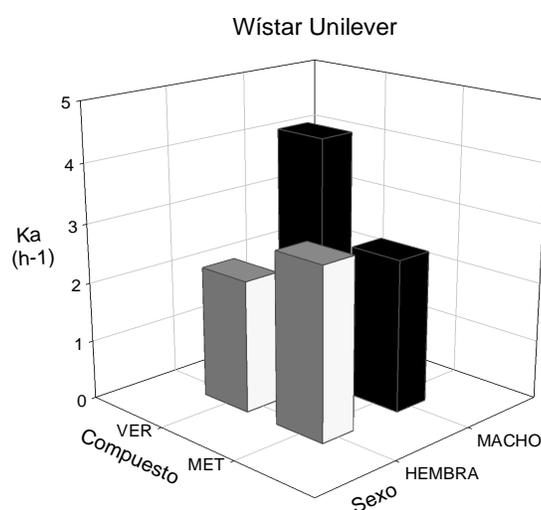


Figura IV.3 Representación gráfica de las K_{ap} obtenidas para cada sexo dentro de la raza de rata Wistar Unilever y para cada uno de los compuestos, metoprolol y verapamilo, a una única concentración de 100 μ M.

W Han	t	Grados de libertad	Sig.
MET 100 μ M	2,577	14	S
VER 100 μ M	-2,568	12	S

Tabla IV.33 Prueba de *t* de Student para la comparación de las K_{ap} obtenidas para cada sexo dentro de la raza de rata Wistar Han y para cada uno de los compuestos, metoprolol y verapamilo, a una única concentración de 100 μ M.

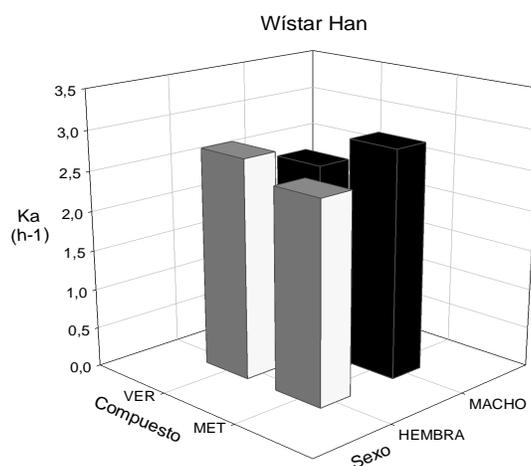


Figura IV.4 Representación gráfica de las K_{ap} obtenidas para cada sexo dentro de la raza de rata Wistar Han y para cada uno de los compuestos, metoprolol y verapamilo, a una única concentración de 100 μ M.

CD*IGS	t	Grados de libertad	Sig.
MET 100 μ M	4,869	14	S
VER 100 μ M	8,623	12	S

Tabla IV.34 Prueba de *t* de Student para la comparación de las K_{ap} obtenidas para cada sexo dentro de la raza de rata CD*IGS y para cada uno de los compuestos, metoprolol y verapamilo, a una única concentración de 100 μ M.

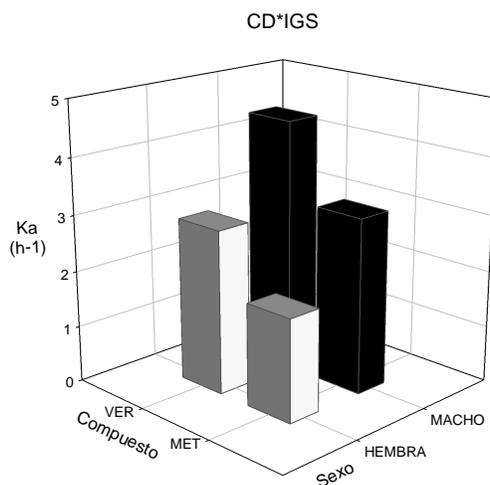


Figura IV.5 Representación gráfica de las K_{ap} obtenidas para cada sexo dentro de la raza de rata CD*IGS y para cada uno de los compuestos, metoprolol y verapamilo, a una única concentración de 100 μ M.

Long Evans	t	Grados de libertad	Sig.
MET 100 μ M	1,595	9	NS
VER 100 μ M	6,582	6,27	S

Tabla IV.35 Prueba de t de Student para la comparación de las K_{ap} obtenidas para cada sexo dentro de la raza de rata Long Evans y para cada uno de los compuestos, metoprolol y verapamilo, a una única concentración de 100 μ M.

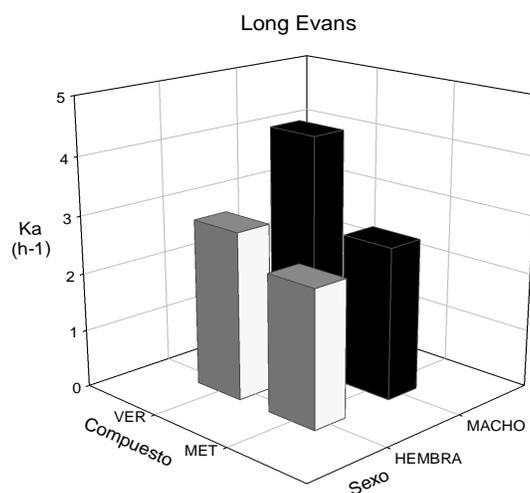


Figura IV.6 Representación gráfica de las K_{ap} obtenidas para cada sexo dentro de la raza de rata Long Evans y para cada uno de los compuestos, metoprolol y verapamilo, a una única concentración de 100 μ M.

Sprague Dawley	t	Grados de libertad	Sig.
MET 100 μ M	3,601	14	S
VER 100 μ M	0,643	4,63	NS

Tabla IV.36 Prueba de *t* de Student para la comparación de las K_{ap} obtenidas para cada sexo dentro de la raza de rata Sprague Dawley y para cada uno de los compuestos, metoprolol y verapamilo, a una única concentración de 100 μ M.

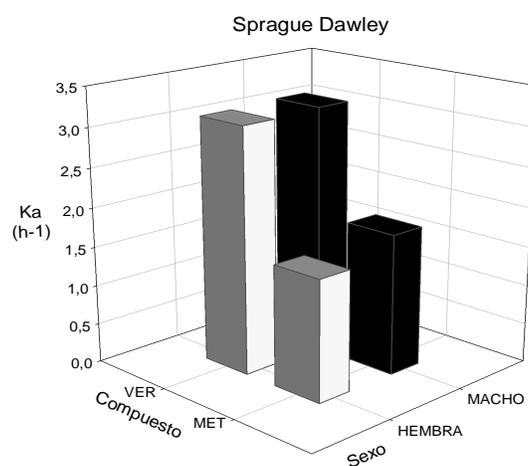


Figura IV.7 Representación gráfica de las K_{ap} obtenidas para cada sexo dentro de la raza de rata Sprague Dawley y para cada uno de los compuestos, metoprolol y verapamilo, a una única concentración de 100 μ M.

C. Estudios de permeabilidad *in vitro*

1. Metoprolol

1.1 Estudios en ATCC Caco-2

Caco-2 p38 MET-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,64	5,73	5,45	6,93	6,30	6,36
60	16,80	14,99	14,27	14,71	14,29	14,25
90	25,79	23,18	22,07	22,86	22,41	22,35
120	32,64	30,33	29,16	30,21	30,08	29,81
P (cm/s)	$4,39 \cdot 10^{-05}$	$4,14 \cdot 10^{-05}$	$3,99 \cdot 10^{-05}$	$3,94 \cdot 10^{-05}$	$4,01 \cdot 10^{-05}$	$3,96 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$4,17 \cdot 10^{-05} \pm 2,06 \cdot 10^{-06}$			$3,97 \cdot 10^{-05} \pm 3,84 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,95						

Tabla IV.37 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol $100\mu\text{M}$ en monocapas Caco-2 p38 (MET 1).

Caco-2 p38 MET-2 100 (µM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,96	8,95	5,06	5,56	6,21	6,86
60	15,17	18,45	14,03	13,29	14,54	15,44
90	25,74	27,74	24,08	21,14	22,65	24,06
120	34,08	35,98	31,86	29,42	31,36	33,30
P (cm/s)	$4,79 \cdot 10^{-05}$	$4,56 \cdot 10^{-05}$	$4,57 \cdot 10^{-05}$	$4,01 \cdot 10^{-05}$	$4,22 \cdot 10^{-05}$	$4,44 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$4,64 \cdot 10^{-05} \pm 1,32 \cdot 10^{-06}$			$4,22 \cdot 10^{-05} \pm 2,15 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,91$						

Tabla IV.38 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100µM en monocapas Caco-2 p38 (MET 2).

Caco-2 p38 MET-3 100 (µM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	7,51	6,40	6,03	6,11	6,09	5,74
60	19,34	15,21	15,15	13,29	13,80	13,87
90	28,36	23,78	22,99	21,22	21,77	22,14
120	38,14	30,84	30,22	28,94	28,68	30,02
P (cm/s)	$5,10 \cdot 10^{-05}$	$4,14 \cdot 10^{-05}$	$4,06 \cdot 10^{-05}$	$3,86 \cdot 10^{-05}$	$3,83 \cdot 10^{-05}$	$4,10 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$4,43 \cdot 10^{-05} \pm 5,78 \cdot 10^{-06}$			$3,93 \cdot 10^{-05} \pm 1,48 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,89$						

Tabla IV.39 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100µM en monocapas Caco-2 p38 (MET 3).

Caco-2 p38	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$4,17 \cdot 10^{-05}$	$2,06 \cdot 10^{-06}$	$3,97 \cdot 10^{-05}$	$3,84 \cdot 10^{-07}$	0,95
MET-2	$4,64 \cdot 10^{-05}$	$1,32 \cdot 10^{-06}$	$4,22 \cdot 10^{-05}$	$2,15 \cdot 10^{-06}$	0,91
MET-3	$4,43 \cdot 10^{-05}$	$5,78 \cdot 10^{-06}$	$3,93 \cdot 10^{-05}$	$1,48 \cdot 10^{-06}$	0,89

Tabla IV.40 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p38.

Caco-2 p48 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,73	0,34	0,22	2,08	1,81	1,84
60	4,72	3,95	3,64	5,06	4,88	4,86
90	8,21	7,09	6,62	8,19	7,99	7,97
120	10,78	9,80	9,30	10,98	10,92	10,81
P (cm/s)	$1,70 \cdot 10^{-05}$	$1,59 \cdot 10^{-05}$	$1,53 \cdot 10^{-05}$	$1,51 \cdot 10^{-05}$	$1,54 \cdot 10^{-05}$	$1,52 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,61 \cdot 10^{-05} \pm 8,78 \cdot 10^{-07}$			$1,52 \cdot 10^{-05} \pm 1,64 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,95$						

Tabla IV.41 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p48 (MET 1).

Caco-2 p48 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,99	1,66	0,98	3,55	3,72	3,62
60	5,16	5,60	4,62	7,96	8,01	7,62
90	8,09	9,01	8,71	12,61	11,70	11,38
120	10,61	12,19	11,62	16,53	15,37	15,88
P (cm/s)	$1,61 \cdot 10^{-05}$	$1,77 \cdot 10^{-05}$	$1,82 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$1,95 \cdot 10^{-05}$	$2,05 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,73 \cdot 10^{-05} \pm 1,12 \cdot 10^{-06}$			$2,07 \cdot 10^{-05} \pm 1,27 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,19$						

Tabla IV.42 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas Caco-2 p48 (MET 2).

Caco-2 p48 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,37	1,43	1,03	3,47	3,12	2,90
60	4,92	5,52	5,73	7,51	7,10	6,98
90	9,04	9,65	8,64	11,98	11,86	10,57
120	11,76	11,84	11,22	15,49	15,57	13,92
P (cm/s)	$1,78 \cdot 10^{-05}$	$1,79 \cdot 10^{-05}$	$1,69 \cdot 10^{-05}$	$2,05 \cdot 10^{-05}$	$2,13 \cdot 10^{-05}$	$1,85 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,75 \cdot 10^{-05} \pm 5,33 \cdot 10^{-07}$			$2,01 \cdot 10^{-05} \pm 1,42 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,15$						

Tabla IV.43 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas Caco-2 p48 (MET 3).

Caco-2 p48	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$1,61 \cdot 10^{-05}$	$8,78 \cdot 10^{-07}$	$1,52 \cdot 10^{-05}$	$1,64 \cdot 10^{-07}$	0,95
MET-2	$1,73 \cdot 10^{-05}$	$1,12 \cdot 10^{-06}$	$2,07 \cdot 10^{-05}$	$1,27 \cdot 10^{-06}$	1,19
MET-3	$1,75 \cdot 10^{-05}$	$5,33 \cdot 10^{-07}$	$2,01 \cdot 10^{-05}$	$1,42 \cdot 10^{-06}$	1,15

Tabla IV.44 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p48.

Caco-2 p58 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,41	3,03	3,02	3,58	3,80	4,04
60	7,53	7,85	7,81	7,76	8,26	8,41
90	13,10	12,05	11,78	12,10	12,49	12,96
120	17,21	16,31	15,51	17,76	17,55	17,99
P (cm/s)	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$2,09 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,30 \cdot 10^{-05}$	$2,34 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,23 \cdot 10^{-05} \pm 1,39 \cdot 10^{-06}$			$2,34 \cdot 10^{-05} \pm 3,62 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,05$						

Tabla IV.45 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p58 (MET 1).

Caco-2 p58 MET-2 100 (µM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,38	2,89	3,18	4,04	3,71	3,38
60	8,05	7,87	8,00	8,68	8,60	8,11
90	12,48	10,78	11,74	13,93	12,81	12,38
120	19,24	15,31	15,81	19,19	18,35	17,34
P (cm/s)	$2,63 \cdot 10^{-05}$	$2,03 \cdot 10^{-05}$	$2,10 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,25 \cdot 10^{-05} \pm 3,26 \cdot 10^{-06}$			$2,44 \cdot 10^{-05} \pm 1,14 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB}=1,08$						

Tabla IV.46 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100µM en monocapas Caco-2 p58 (MET 2).

Caco-2 p58 MET-3 100 (µM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,30	2,04	2,68	3,46	3,14	2,78
60	7,96	5,24	7,11	7,48	6,88	7,25
90	11,60	9,17	10,45	11,57	10,95	11,02
120	14,61	12,31	15,49	15,67	16,13	15,18
P (cm/s)	$1,90 \cdot 10^{-05}$	$1,75 \cdot 10^{-05}$	$2,11 \cdot 10^{-05}$	$2,06 \cdot 10^{-05}$	$2,17 \cdot 10^{-05}$	$2,07 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,92 \cdot 10^{-05} \pm 1,79 \cdot 10^{-06}$			$2,10 \cdot 10^{-05} \pm 6,33 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB}= 1,09$						

Tabla IV.47 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100µM en monocapas Caco-2 p58 (MET 3).

Caco-2 p58	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$1,39 \cdot 10^{-06}$	$2,34 \cdot 10^{-05}$	$3,62 \cdot 10^{-07}$	1,05
MET-2	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$3,26 \cdot 10^{-06}$	$2,44 \cdot 10^{-05}$	$1,14 \cdot 10^{-06}$	1,08
MET-3	$1,92 \cdot 10^{-05}$	$1,79 \cdot 10^{-06}$	$2,10 \cdot 10^{-05}$	$6,33 \cdot 10^{-07}$	1,09

Tabla IV.48 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p58.

Caco-2 p68 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,85	1,36	0,97	2,45	2,73	2,45
60	5,44	6,25	4,88	6,49	6,87	6,47
90	9,44	10,45	8,86	10,27	10,98	10,81
120	12,76	14,03	12,10	14,00	15,22	14,89
P (cm/s)	$2,01 \cdot 10^{-05}$	$2,13 \cdot 10^{-05}$	$1,89 \cdot 10^{-05}$	$1,94 \cdot 10^{-05}$	$2,10 \cdot 10^{-05}$	$2,11 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,01 \cdot 10^{-05} \pm 1,22 \cdot 10^{-06}$			$2,05 \cdot 10^{-05} \pm 9,32 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,02$						

Tabla IV.49 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p68 (MET 1).

Caco-2 p68 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,33	1,18	1,27	2,84	2,72	2,73
60	6,02	5,00	5,68	7,08	6,92	7,07
90	9,24	8,63	8,69	11,05	10,87	11,02
120	12,82	12,77	12,70	14,49	15,59	15,43
P (cm/s)	$1,90 \cdot 10^{-05}$	$1,94 \cdot 10^{-05}$	$1,88 \cdot 10^{-05}$	$1,97 \cdot 10^{-05}$	$2,15 \cdot 10^{-05}$	$2,12 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,91 \cdot 10^{-05} \pm 2,72 \cdot 10^{-06}$			$2,08 \cdot 10^{-05} \pm 9,94 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,09$						

Tabla IV.50 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas Caco-2 p68 (MET 2).

Caco-2 p68 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,49	1,34	1,35	3,04	3,04	2,82
60	5,55	5,41	5,54	7,19	7,19	6,92
90	9,50	9,60	9,81	12,04	12,04	11,82
120	13,07	12,67	12,79	15,90	15,90	15,66
P (cm/s)	$1,95 \cdot 10^{-05}$	$1,93 \cdot 10^{-05}$	$1,95 \cdot 10^{-05}$	$2,19 \cdot 10^{-05}$	$2,19 \cdot 10^{-05}$	$2,19 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,94 \cdot 10^{-05} \pm 1,42 \cdot 10^{-07}$			$2,19 \cdot 10^{-05} \pm 2,48 \cdot 10^{-11}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,13$						

Tabla IV.51 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas Caco-2 p68 (MET 3).

Caco-2 p68	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
MET-1	$2,01 \cdot 10^{-05}$	$1,22 \cdot 10^{-06}$	$2,05 \cdot 10^{-05}$	$9,32 \cdot 10^{-07}$	1,02
MET-2	$1,91 \cdot 10^{-05}$	$2,72 \cdot 10^{-06}$	$2,08 \cdot 10^{-05}$	$9,94 \cdot 10^{-06}$	1,09
MET-3	$1,94 \cdot 10^{-05}$	$1,42 \cdot 10^{-07}$	$2,19 \cdot 10^{-05}$	$2,48 \cdot 10^{-11}$	1,13

Tabla IV.52 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p68.

Caco-2 p78 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,97	1,51	1,17	3,24	2,71	2,63
60	6,51	5,70	5,16	7,74	6,90	6,41
90	10,97	9,46	9,69	12,05	11,14	10,57
120	12,53	12,69	12,42	16,03	14,22	14,22
P (cm/s)	$1,82 \cdot 10^{-05}$	$1,88 \cdot 10^{-05}$	$1,93 \cdot 10^{-05}$	$2,16 \cdot 10^{-05}$	$1,96 \cdot 10^{-05}$	$1,97 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,88 \cdot 10^{-05} \pm 5,50 \cdot 10^{-07}$			$2,03 \cdot 10^{-05} \pm 1,12 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,08$						

Tabla IV.53 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p78 (MET 1).

Caco-2 p78 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,04	1,67	2,02	2,72	3,00	2,22
60	6,26	6,21	5,85	6,77	7,18	5,75
90	10,00	9,23	10,66	11,22	11,65	9,02
120	13,77	13,37	15,58	15,80	15,74	12,52
P (cm/s)	$1,97 \cdot 10^{-05}$	$1,93 \cdot 10^{-05}$	$2,30 \cdot 10^{-05}$	$2,21 \cdot 10^{-05}$	$2,16 \cdot 10^{-05}$	$1,73 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,06 \cdot 10^{-05} \pm 2,03 \cdot 10^{-06}$			$2,03 \cdot 10^{-05} \pm 2,64 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,98						

Tabla IV.54 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas Caco-2 p78 (MET 2).

Caco-2 p78 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,26	2,27	2,39	3,64	3,59	3,99
60	7,72	6,85	7,53	8,55	8,44	8,24
90	12,21	10,97	12,09	13,45	13,40	12,69
120	15,04	14,72	15,76	18,38	18,61	17,29
P (cm/s)	$2,16 \cdot 10^{-05}$	$2,09 \cdot 10^{-05}$	$2,26 \cdot 10^{-05}$	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$2,53 \cdot 10^{-05}$	$2,24 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,17 \cdot 10^{-05} \pm 8,11 \cdot 10^{-07}$			$2,42 \cdot 10^{-05} \pm 1,54 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 1,11						

Tabla IV.55 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas Caco-2 p78 (MET 3).

Caco-2 p78	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
MET-1	$1,88 \cdot 10^{-05}$	$5,50 \cdot 10^{-07}$	$2,03 \cdot 10^{-05}$	$1,12 \cdot 10^{-06}$	1,08
MET-2	$2,06 \cdot 10^{-05}$	$2,03 \cdot 10^{-06}$	$2,03 \cdot 10^{-05}$	$2,64 \cdot 10^{-06}$	0,98
MET-3	$2,17 \cdot 10^{-05}$	$8,11 \cdot 10^{-07}$	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$1,54 \cdot 10^{-06}$	1,11

Tabla IV.56 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p78.

Caco-2 p88 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,36	4,36	4,16	3,78	3,94	3,79
60	12,47	8,77	9,12	8,48	7,88	8,14
90	17,39	12,44	12,44	12,45	11,76	12,13
120	24,10	15,88	16,05	16,53	15,99	16,11
P (cm/s)	$2,94 \cdot 10^{-05}$	$1,93 \cdot 10^{-05}$	$1,97 \cdot 10^{-05}$	$2,13 \cdot 10^{-05}$	$2,02 \cdot 10^{-05}$	$2,07 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,28 \cdot 10^{-05} \pm 5,70 \cdot 10^{-06}$			$2,07 \cdot 10^{-05} \pm 5,55 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,91$						

Tabla IV.57 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p88 (MET 1).

Caco-2 p88 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,46	3,76	4,06	4,25	4,04	4,17
60	7,46	7,55	7,59	9,57	9,38	9,52
90	11,03	10,83	11,36	14,29	13,68	14,00
120	14,39	14,12	14,10	19,30	18,59	18,94
P (cm/s)	$1,84 \cdot 10^{-05}$	$1,74 \cdot 10^{-05}$	$1,71 \cdot 10^{-05}$	$2,52 \cdot 10^{-05}$	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$2,46 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,76 \cdot 10^{-05} \pm 6,54 \cdot 10^{-07}$			$2,47 \cdot 10^{-05} \pm 4,94 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,40						

Tabla IV.58 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas Caco-2 p88 (MET 2).

Caco-2 p88 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,55	3,78	3,83	3,00	3,15	3,19
60	7,42	7,54	7,56	6,69	7,09	6,58
90	10,63	11,04	10,93	10,08	10,58	10,37
120	13,99	14,26	14,08	13,98	14,59	13,95
P (cm/s)	$1,74 \cdot 10^{-05}$	$1,76 \cdot 10^{-05}$	$1,72 \cdot 10^{-05}$	$1,84 \cdot 10^{-05}$	$1,91 \cdot 10^{-05}$	$1,91 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,74 \cdot 10^{-05} \pm 2,04 \cdot 10^{-07}$			$1,86 \cdot 10^{-05} \pm 4,70 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,06						

Tabla IV.59 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas Caco-2 p88 (MET 3).

Caco-2 p88	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$2,28 \cdot 10^{-05}$	$5,70 \cdot 10^{-06}$	$2,07 \cdot 10^{-05}$	$5,55 \cdot 10^{-07}$	0,91
MET-2	$1,76 \cdot 10^{-05}$	$6,54 \cdot 10^{-07}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$4,94 \cdot 10^{-07}$	1,40
MET-3	$1,74 \cdot 10^{-05}$	$2,04 \cdot 10^{-07}$	$1,86 \cdot 10^{-05}$	$4,70 \cdot 10^{-07}$	1,06

Tabla IV.60 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p88.

Caco-2 p98 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,17	0,35	1,99	0,62	0,59	1,02
60	3,00	1,44	4,81	1,50	1,48	2,28
90	4,68	2,42	7,48	2,23	2,32	3,38
120	6,66	3,61	10,43	3,39	3,28	4,79
P (cm/s)	$9,16 \cdot 10^{-06}$	$5,42 \cdot 10^{-06}$	$1,41 \cdot 10^{-05}$	$4,58 \cdot 10^{-06}$	$4,50 \cdot 10^{-06}$	$6,27 \cdot 10^{-06}$
P\pmDE (cm/s)	$9,57 \cdot 10^{-06} \pm 4,37 \cdot 10^{-06}$			$5,12 \cdot 10^{-06} \pm 1,00 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,53$						

Tabla IV.61 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p98 (MET 1).

Caco-2 p98 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,31	1,33	2,10	1,81	1,54	1,63
60	3,36	3,52	5,31	3,91	3,69	3,61
90	5,44	5,50	7,91	5,97	5,56	5,65
120	8,02	7,76	10,93	8,21	7,88	8,02
P (cm/s)	$1,12 \cdot 10^{-05}$	$1,07 \cdot 10^{-05}$	$1,47 \cdot 10^{-05}$	$1,07 \cdot 10^{-05}$	$1,05 \cdot 10^{-05}$	$1,07 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,22 \cdot 10^{-05} \pm 2,16 \cdot 10^{-06}$			$1,07 \cdot 10^{-05} \pm 1,09 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,87						

Tabla IV.62 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas Caco-2 p98 (MET 2).

Caco-2 p98 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,17	1,52	1,31	2,75	2,70	2,00
60	3,59	4,03	3,71	6,84	6,53	4,20
90	5,59	6,21	5,78	11,65	10,03	6,35
120	7,89	8,70	8,22	15,69	14,58	8,97
P (cm/s)	$1,12 \cdot 10^{-05}$	$1,20 \cdot 10^{-05}$	$1,15 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$1,98 \cdot 10^{-05}$	$1,17 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,16 \cdot 10^{-05} \pm 3,95 \cdot 10^{-07}$			$1,78 \cdot 10^{-05} \pm 5,45 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 1,54						

Tabla IV.63 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas Caco-2 p98 (MET 3).

Caco-2 p98	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$9,57 \cdot 10^{-06}$	$4,37 \cdot 10^{-06}$	$5,12 \cdot 10^{-06}$	$1,00 \cdot 10^{-06}$	0,53
MET-2	$1,22 \cdot 10^{-05}$	$2,16 \cdot 10^{-06}$	$1,07 \cdot 10^{-05}$	$1,09 \cdot 10^{-07}$	0,87
MET-3	$1,16 \cdot 10^{-05}$	$3,95 \cdot 10^{-07}$	$1,78 \cdot 10^{-05}$	$5,45 \cdot 10^{-06}$	1,54

Tabla IV.64 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p98.

Caco-2 p108 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,56	0,41	0,31	2,33	2,14	2,56
60	2,73	2,49	2,40	5,49	5,31	5,65
90	4,51	4,12	4,07	8,04	7,80	8,15
120	6,45	5,95	5,83	10,83	10,39	10,78
P (cm/s)	$9,82 \cdot 10^{-06}$	$9,23 \cdot 10^{-06}$	$9,20 \cdot 10^{-06}$	$1,42 \cdot 10^{-05}$	$1,38 \cdot 10^{-05}$	$1,37 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$9,41 \cdot 10^{-06} \pm 3,53 \cdot 10^{-07}$			$1,39 \cdot 10^{-05} \pm 2,44 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,47$						

Tabla IV.65 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 p108 (MET 1).

Caco-2 108 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,44	2,89	3,18	4,04	3,71	1,96
60	5,26	7,87	8,00	8,68	8,60	5,00
90	3,49	10,78	11,74	13,93	12,81	7,27
120	12,89	15,31	15,81	19,19	18,35	10,12
P (cm/s)	$1,80 \cdot 10^{-05}$	$2,03 \cdot 10^{-05}$	$2,10 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$1,35 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,98 \cdot 10^{-05} \pm 1,60 \cdot 10^{-06}$			$2,11 \cdot 10^{-05} \pm 6,64 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,07$						

Tabla IV.66 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas Caco-2 p108 (MET 2).

Caco-2 108 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,44	0,68	0,47	2,13	2,15	2,12
60	2,69	3,08	2,76	5,58	5,72	5,58
90	4,45	5,09	4,61	8,40	8,34	8,14
120	6,38	7,27	6,58	11,34	11,23	11,08
P (cm/s)	$9,89 \cdot 10^{-06}$	$1,10 \cdot 10^{-05}$	$1,02 \cdot 10^{-05}$	$1,54 \cdot 10^{-05}$	$1,51 \cdot 10^{-05}$	$1,49 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,04 \cdot 10^{-05} \pm 5,66 \cdot 10^{-07}$			$1,51 \cdot 10^{-05} \pm 2,59 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,46$						

Tabla IV.67 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas Caco-2 p108 (MET 3).

Caco-2 p108	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	$P_{AB}(\text{cm/s})$	DE	$P_{BA}(\text{cm/s})$	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$9,41 \cdot 10^{-06}$	$3,53 \cdot 10^{-07}$	$1,39 \cdot 10^{-05}$	$2,44 \cdot 10^{-07}$	1,47
MET-2	$1,98 \cdot 10^{-05}$	$1,60 \cdot 10^{-06}$	$2,11 \cdot 10^{-05}$	$6,64 \cdot 10^{-06}$	1,07
MET-3	$1,04 \cdot 10^{-05}$	$5,66 \cdot 10^{-07}$	$1,51 \cdot 10^{-05}$	$2,59 \cdot 10^{-07}$	1,46

Tabla IV.68 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{AB}) y Basolateral-Apical (P_{BA}) de metoprolol 100 μM en monocapas Caco-2 p108.

Caco-2	Permeabilidad (cm/s)		
MET	$P_{AB} \pm \text{DE}$ (cm/s)	$P_{BA} \pm \text{DE}$ (cm/s)	Ratio
p38	$4,42 \cdot 10^{-05} \pm 2,35 \cdot 10^{-06}$	$4,04 \cdot 10^{-05} \pm 1,61 \cdot 10^{-06}$	0,92
p48	$1,70 \cdot 10^{-05} \pm 7,91 \cdot 10^{-07}$	$1,86 \cdot 10^{-05} \pm 3,01 \cdot 10^{-06}$	1,10
p58	$2,13 \cdot 10^{-05} \pm 1,87 \cdot 10^{-06}$	$2,29 \cdot 10^{-05} \pm 1,75 \cdot 10^{-06}$	1,07
p68	$1,95 \cdot 10^{-05} \pm 5,05 \cdot 10^{-07}$	$2,11 \cdot 10^{-05} \pm 7,59 \cdot 10^{-07}$	1,08
p78	$2,04 \cdot 10^{-05} \pm 1,47 \cdot 10^{-06}$	$2,16 \cdot 10^{-05} \pm 2,24 \cdot 10^{-06}$	1,06
p88	$1,93 \cdot 10^{-05} \pm 3,04 \cdot 10^{-06}$	$2,13 \cdot 10^{-05} \pm 3,11 \cdot 10^{-06}$	1,11
p98	$1,11 \cdot 10^{-05} \pm 1,38 \cdot 10^{-06}$	$1,12 \cdot 10^{-05} \pm 6,37 \cdot 10^{-06}$	1,01
p108	$1,31 \cdot 10^{-05} \pm 5,72 \cdot 10^{-06}$	$1,67 \cdot 10^{-05} \pm 3,89 \cdot 10^{-06}$	1,27

Tabla IV.69 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{AB}) y Basolateral-Apical (P_{BA}) de metoprolol 100 μM en monocapas Caco-2 a los diferentes pases celulares.

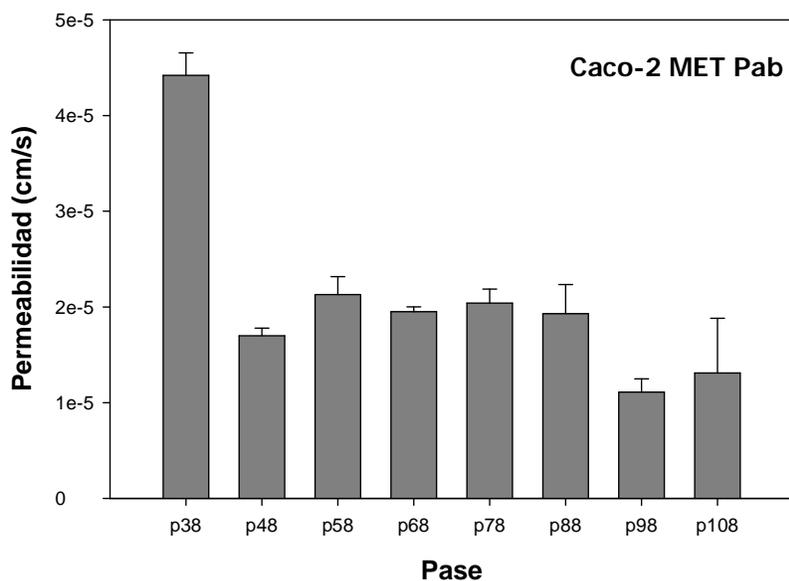


Figura IV.8 Representación gráfica de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) de metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 a los diferentes pases celulares.

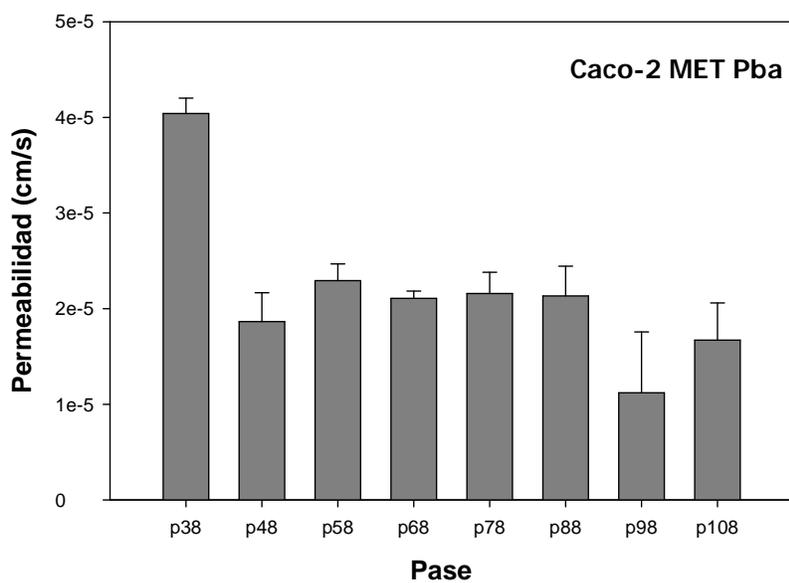


Figura IV.9 Representación gráfica de la Permeabilidad Basolateral-Apical (Pba) de metoprolol 100 μ M en monocapas Caco-2 a los diferentes pases celulares.

1.2 Estudios en TC7

TC7 p85 MET-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,76	2,71	2,86	3,93	3,78	3,76
60	6,75	6,69	6,71	8,38	8,17	8,85
90	9,99	9,94	10,10	12,64	12,29	12,99
120	13,34	13,44	13,56	17,39	16,90	17,74
P (cm/s)	$1,77 \cdot 10^{-05}$	$1,79 \cdot 10^{-05}$	$1,79 \cdot 10^{-05}$	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,78 \cdot 10^{-05} \pm 1,37 \cdot 10^{-07}$			$2,26 \cdot 10^{-05} \pm 6,58 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 1,27						

Tabla IV.70 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol $100\mu\text{M}$ en monocapas TC7 p85 (MET 1).

TC7 p85 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,70	2,88	2,68	3,70	3,53	3,34
60	6,77	6,96	6,71	8,48	7,89	8,28
90	10,06	10,48	10,38	12,96	12,35	12,88
120	12,98	13,77	13,58	17,56	16,99	17,91
P (cm/s)	$1,72 \cdot 10^{-05}$	$1,83 \cdot 10^{-05}$	$1,84 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$2,44 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,80 \cdot 10^{-05} \pm 6,31 \cdot 10^{-07}$			$2,34 \cdot 10^{-05} \pm 8,79 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}=1,31						

Tabla IV.71 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas TC7 p85 (MET 2).

TC7 p85 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,39	2,56	2,68	3,61	3,40	3,77
60	6,50	6,64	7,22	8,27	7,42	10,15
90	10,43	10,89	11,49	12,69	12,15	14,85
120	13,78	14,27	14,86	19,93	17,17	58,41
P (cm/s)	$1,92 \cdot 10^{-05}$	$1,99 \cdot 10^{-05}$	$2,06 \cdot 10^{-05}$	$2,70 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$2,91 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,99 \cdot 10^{-05} \pm 6,82 \cdot 10^{-07}$			$2,64 \cdot 10^{-05} \pm 2,64 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,33						

Tabla IV.72 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas TC7 p85 (MET 3).

TC7 p85	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$1,78 \cdot 10^{-05}$	$1,37 \cdot 10^{-07}$	$2,26 \cdot 10^{-05}$	$6,58 \cdot 10^{-07}$	1,27
MET-2	$1,80 \cdot 10^{-05}$	$6,31 \cdot 10^{-07}$	$2,34 \cdot 10^{-05}$	$8,79 \cdot 10^{-07}$	1,31
MET-3	$1,99 \cdot 10^{-05}$	$6,82 \cdot 10^{-07}$	$2,64 \cdot 10^{-05}$	$2,64 \cdot 10^{-06}$	1,33

Tabla IV.73 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p85.

TC7 p95 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,98	4,05	4,62	4,83	4,76	4,50
60	9,80	8,76	9,51	9,46	10,96	10,21
90	14,54	13,02	14,23	15,04	16,91	16,09
120	18,07	17,30	18,20	19,80	22,01	21,71
P (cm/s)	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$2,30 \cdot 10^{-05}$	$2,55 \cdot 10^{-05}$	$2,91 \cdot 10^{-05}$	$2,91 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,25 \cdot 10^{-05} \pm 4,22 \cdot 10^{-07}$			$2,79 \cdot 10^{-05} \pm 2,08 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,24$						

Tabla IV.74 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p95 (MET 1).

TC7 p95 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,97	4,06	4,62	4,85	4,75	4,50
60	9,83	8,80	9,53	9,48	10,98	10,23
90	14,56	13,03	14,33	15,05	16,95	16,12
120	18,10	17,33	18,31	19,82	22,06	21,77
P (cm/s)	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$2,32 \cdot 10^{-05}$	$2,55 \cdot 10^{-05}$	$2,92 \cdot 10^{-05}$	$2,91 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,26 \cdot 10^{-05} \pm 5,14 \cdot 10^{-07}$			$2,80 \cdot 10^{-05} \pm 2,13 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,24						

Tabla IV.75 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas TC7 p95 (MET 2).

TC7 p95 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,79	4,32	4,59	4,81	4,67	4,42
60	9,56	8,93	9,42	10,92	9,74	9,99
90	13,94	12,99	13,65	15,72	14,80	15,09
120	17,83	16,95	17,93	20,88	19,93	19,96
P (cm/s)	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$2,12 \cdot 10^{-05}$	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$2,68 \cdot 10^{-05}$	$2,57 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,18 \cdot 10^{-05} \pm 5,88 \cdot 10^{-07}$			$2,62 \cdot 10^{-05} \pm 5,49 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,20						

Tabla IV.76 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas TC7 p95 (MET 3).

TC7 p95	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$4,22 \cdot 10^{-07}$	$2,79 \cdot 10^{-05}$	$2,08 \cdot 10^{-06}$	1,24
MET-2	$2,26 \cdot 10^{-05}$	$5,14 \cdot 10^{-07}$	$2,80 \cdot 10^{-05}$	$2,13 \cdot 10^{-06}$	1,24
MET-3	$2,18 \cdot 10^{-05}$	$5,88 \cdot 10^{-07}$	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$5,49 \cdot 10^{-07}$	1,20

Tabla IV.77 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p95.

TC7 p105 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,41	2,89	3,66	3,39	3,71	3,57
60	8,13	7,42	8,41	7,40	8,18	7,84
90	12,74	11,36	12,99	11,12	12,67	12,29
120	16,85	15,09	16,83	15,58	18,29	17,04
P (cm/s)	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$2,05 \cdot 10^{-05}$	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$2,03 \cdot 10^{-05}$	$2,44 \cdot 10^{-05}$	$2,26 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,18 \cdot 10^{-05} \pm 1,17 \cdot 10^{-06}$			$2,24 \cdot 10^{-05} \pm 2,02 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,03$						

Tabla IV.78 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p105 (MET 1).

TC7 p105 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,89	3,29	2,97	3,62	4,46	4,35
60	8,56	7,94	7,51	8,32	11,53	8,86
90	12,31	12,97	12,14	13,34	13,77	12,48
120	15,77	16,44	15,70	17,59	18,07	16,45
P (cm/s)	$2,14 \cdot 10^{-05}$	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$2,16 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,18 \cdot 10^{-05}$	$2,02 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,18 \cdot 10^{-05} \pm 5,55 \cdot 10^{-06}$			$2,19 \cdot 10^{-05} \pm 1,77 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,00						

Tabla IV.79 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas TC7 p105 (MET 2).

TC7 p105 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,52	2,84	2,95	3,37	3,88	3,61
60	11,70	7,76	7,19	7,40	8,32	8,49
90	13,53	11,47	11,37	12,08	12,97	13,11
120	17,94	15,20	15,58	15,40	17,60	17,36
P (cm/s)	$2,28 \cdot 10^{-05}$	$2,06 \cdot 10^{-05}$	$2,12 \cdot 10^{-05}$	$2,06 \cdot 10^{-05}$	$2,31 \cdot 10^{-05}$	$2,32 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,15 \cdot 10^{-05} \pm 1,12 \cdot 10^{-06}$			$2,23 \cdot 10^{-05} \pm 1,48 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,04						

Tabla IV.80 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas TC7 p105 (MET 3).

TC7 p105	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$2,18 \cdot 10^{-05}$	$1,17 \cdot 10^{-06}$	$2,24 \cdot 10^{-05}$	$2,02 \cdot 10^{-06}$	1,03
MET-2	$2,18 \cdot 10^{-05}$	$5,55 \cdot 10^{-06}$	$2,19 \cdot 10^{-05}$	$1,77 \cdot 10^{-06}$	1,00
MET-3	$2,15 \cdot 10^{-05}$	$1,12 \cdot 10^{-06}$	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$1,48 \cdot 10^{-06}$	1,04

Tabla IV.81 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p105.

TC7 p115 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,45	0,41	1,44	2,79	3,60	3,96
60	4,95	4,45	6,47	7,90	7,55	9,63
90	8,10	8,30	10,63	11,75	11,82	15,58
120	10,85	9,93	13,86	15,95	16,44	19,69
P (cm/s)	$1,58 \cdot 10^{-05}$	$1,64 \cdot 10^{-05}$	$2,09 \cdot 10^{-05}$	$2,19 \cdot 10^{-05}$	$2,16 \cdot 10^{-05}$	$2,68 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,77 \cdot 10^{-05} \pm 2,80 \cdot 10^{-06}$			$2,34 \cdot 10^{-05} \pm 2,94 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,32$						

Tabla IV.82 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p115 (MET 1).

TC7 p115 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,52	1,26	1,44	3,36	3,60	3,22
60	5,74	5,64	6,43	9,12	9,19	9,14
90	9,08	9,97	10,90	14,86	14,56	15,38
120	12,98	13,83	14,58	21,40	20,26	19,95
P (cm/s)	$1,91 \cdot 10^{-05}$	$2,12 \cdot 10^{-05}$	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$3,02 \cdot 10^{-05}$	$2,80 \cdot 10^{-05}$	$2,85 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,08 \cdot 10^{-05} \pm 1,60 \cdot 10^{-06}$			$2,89 \cdot 10^{-05} \pm 1,18 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,39						

Tabla IV.83 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas TC7 p115 (MET 2).

TC7 p115 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,43	1,66	1,77	4,29	4,03	4,04
60	5,66	6,08	6,18	9,49	8,86	9,22
90	9,69	9,49	10,07	16,00	14,24	15,00
120	12,88	12,80	14,18	22,04	18,51	19,20
P (cm/s)	$1,94 \cdot 10^{-05}$	$1,86 \cdot 10^{-05}$	$2,08 \cdot 10^{-05}$	$3,02 \cdot 10^{-05}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$2,59 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,96 \cdot 10^{-05} \pm 1,10 \cdot 10^{-06}$			$2,69 \cdot 10^{-05} \pm 2,90 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,37						

Tabla IV.84 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas TC7 p115 (MET 3).

TC7 p115	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$1,77 \cdot 10^{-05}$	$2,80 \cdot 10^{-06}$	$2,34 \cdot 10^{-05}$	$2,94 \cdot 10^{-06}$	1,32
MET-2	$2,08 \cdot 10^{-05}$	$1,60 \cdot 10^{-06}$	$2,89 \cdot 10^{-05}$	$1,18 \cdot 10^{-06}$	1,39
MET-3	$1,96 \cdot 10^{-05}$	$1,10 \cdot 10^{-06}$	$2,69 \cdot 10^{-05}$	$2,90 \cdot 10^{-06}$	1,37

Tabla IV.85 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p115.

TC7 p125 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,54	2,42	1,61	4,71	4,13	4,84
60	5,69	7,57	6,42	10,43	9,40	10,66
90	17,48	12,72	11,44	17,28	15,31	17,05
120	22,76	17,23	15,69	22,46	20,84	22,59
P (cm/s)	$3,81 \cdot 10^{-05}$	$2,50 \cdot 10^{-05}$	$2,39 \cdot 10^{-05}$	$3,03 \cdot 10^{-05}$	$2,83 \cdot 10^{-05}$	$3,01 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,90 \cdot 10^{-05} \pm 7,91 \cdot 10^{-06}$			$2,96 \cdot 10^{-05} \pm 1,12 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,02$						

Tabla IV.86 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p125 (MET 1).

TC7 p125 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,18	2,35	1,77	4,40	4,04	4,04
60	7,51	7,82	6,61	10,38	9,74	9,72
90	12,84	12,51	11,29	17,06	16,12	15,81
120	16,66	17,37	15,23	22,62	22,14	21,87
P (cm/s)	$2,46 \cdot 10^{-05}$	$2,51 \cdot 10^{-05}$	$2,28 \cdot 10^{-05}$	$3,10 \cdot 10^{-05}$	$3,06 \cdot 10^{-05}$	$3,01 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,42 \cdot 10^{-05} \pm 1,25 \cdot 10^{-06}$			$3,06 \cdot 10^{-05} \pm 4,46 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,27						

Tabla IV. 87 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas TC7 p125 (MET 2).

TC7 p125 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,85	1,82	2,42	4,16	4,47	4,05
60	8,01	6,15	7,03	10,29	10,86	10,03
90	13,49	10,75	13,19	16,13	16,92	16,75
120	17,42	14,75	16,74	21,42	21,68	22,63
P (cm/s)	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$2,19 \cdot 10^{-05}$	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$2,91 \cdot 10^{-05}$	$2,91 \cdot 10^{-05}$	$3,15 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,39 \cdot 10^{-05} \pm 1,68 \cdot 10^{-06}$			$2,99 \cdot 10^{-05} \pm 1,40 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,26						

Tabla IV.88 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas TC7 p125 (MET 3).

TC7 p125	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$2,90 \cdot 10^{-05}$	$7,91 \cdot 10^{-06}$	$2,96 \cdot 10^{-05}$	$1,12 \cdot 10^{-06}$	1,02
MET-2	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$1,25 \cdot 10^{-06}$	$3,06 \cdot 10^{-05}$	$4,46 \cdot 10^{-07}$	1,27
MET-3	$2,39 \cdot 10^{-05}$	$1,68 \cdot 10^{-06}$	$2,99 \cdot 10^{-05}$	$1,40 \cdot 10^{-06}$	1,26

Tabla IV.89 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p125.

TC7 p135 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,43	2,32	2,25	3,71	3,65	3,77
60	6,27	5,96	6,19	8,64	8,09	8,52
90	9,81	9,49	10,17	13,39	12,71	13,38
120	13,40	12,61	14,09	18,09	17,72	18,71
P (cm/s)	$1,84 \cdot 10^{-05}$	$1,74 \cdot 10^{-05}$	$1,99 \cdot 10^{-05}$	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$2,51 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,86 \cdot 10^{-05} \pm 1,30 \cdot 10^{-06}$			$2,43 \cdot 10^{-05} \pm 7,33 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,31$						

Tabla IV.90 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p135 (MET 1).

TC7 p135 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,75	2,34	2,36	3,92	3,73	3,68
60	7,56	6,41	6,51	9,58	8,87	8,69
90	11,99	10,16	10,55	15,19	14,09	13,58
120	16,30	14,47	15,09	21,25	19,50	19,03
P (cm/s)	$2,28 \cdot 10^{-05}$	$2,03 \cdot 10^{-05}$	$2,13 \cdot 10^{-05}$	$2,91 \cdot 10^{-05}$	$2,65 \cdot 10^{-05}$	$2,57 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,14 \cdot 10^{-05} \pm 1,25 \cdot 10^{-06}$			$2,71 \cdot 10^{-05} \pm 1,76 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,26						

Tabla IV.91 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas TC7 p135 (MET 2).

TC7 p135 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,43	2,45	2,87	3,72	4,13	3,24
60	6,88	6,85	7,63	9,03	9,53	7,76
90	11,19	11,02	12,37	14,21	14,98	12,24
120	17,20	14,31	18,51	20,28	20,89	17,32
P (cm/s)	$2,46 \cdot 10^{-05}$	$2,01 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$2,77 \cdot 10^{-05}$	$2,81 \cdot 10^{-05}$	$2,36 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,36 \cdot 10^{-05} \pm 3,12 \cdot 10^{-06}$			$2,65 \cdot 10^{-05} \pm 2,50 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,12						

Tabla IV.92 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas TC7 p135 (MET 3).

TC7 p135	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$1,86 \cdot 10^{-05}$	$1,30 \cdot 10^{-06}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$7,33 \cdot 10^{-07}$	1,31
MET-2	$2,14 \cdot 10^{-05}$	$1,25 \cdot 10^{-06}$	$2,71 \cdot 10^{-05}$	$1,76 \cdot 10^{-06}$	1,26
MET-3	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$3,12 \cdot 10^{-06}$	$2,65 \cdot 10^{-05}$	$2,50 \cdot 10^{-06}$	1,12

Tabla IV.93 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p135.

TC7 p145 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,74	0,76	1,22	3,27	3,08	3,03
60	4,47	4,06	4,15	7,49	7,42	7,83
90	8,65	7,37	7,20	11,97	11,82	12,26
120	10,94	10,18	10,21	16,24	15,82	16,51
P (cm/s)	$1,76 \cdot 10^{-05}$	$1,59 \cdot 10^{-05}$	$1,52 \cdot 10^{-05}$	$2,19 \cdot 10^{-05}$	$2,15 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,62 \cdot 10^{-05} \pm 1,23 \cdot 10^{-06}$			$2,20 \cdot 10^{-05} \pm 5,75 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,36$						

Tabla IV.94 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p145 (MET 1).

TC7 p145 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,76	1,03	0,75	3,47	3,46	3,25
60	4,21	4,28	4,38	8,22	8,27	8,10
90	7,22	7,61	7,45	12,09	12,88	12,56
120	9,87	10,24	10,19	16,51	17,18	16,66
P (cm/s)	$1,53 \cdot 10^{-05}$	$1,56 \cdot 10^{-05}$	$1,59 \cdot 10^{-05}$	$2,17 \cdot 10^{-05}$	$2,31 \cdot 10^{-05}$	$2,26 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,56 \cdot 10^{-05} \pm 2,71 \cdot 10^{-07}$			$2,25 \cdot 10^{-05} \pm 6,98 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,44$						

Tabla IV.95 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas TC7 p145 (MET 2).

TC7 p145 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,74	0,37	0,51	2,99	2,50	3,00
60	4,36	3,62	3,71	7,63	6,41	7,40
90	7,51	6,68	7,02	12,28	10,41	11,78
120	10,35	9,33	9,63	16,31	14,21	15,85
P (cm/s)	$1,61 \cdot 10^{-05}$	$1,51 \cdot 10^{-05}$	$1,55 \cdot 10^{-05}$	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$1,98 \cdot 10^{-05}$	$2,17 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,56 \cdot 10^{-05} \pm 5,14 \cdot 10^{-07}$			$2,13 \cdot 10^{-05} \pm 1,43 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,37$						

Tabla IV.96 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas TC7 p145 (MET 3).

TC7 p145	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$1,62 \cdot 10^{-05}$	$1,23 \cdot 10^{-06}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$5,75 \cdot 10^{-07}$	1,36
MET-2	$1,56 \cdot 10^{-05}$	$2,71 \cdot 10^{-07}$	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$6,98 \cdot 10^{-07}$	1,44
MET-3	$1,56 \cdot 10^{-05}$	$5,14 \cdot 10^{-07}$	$2,13 \cdot 10^{-05}$	$1,43 \cdot 10^{-06}$	1,37

Tabla IV.97 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p145.

TC7 p155 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,21	2,38	2,25	3,98	3,38	2,92
60	9,39	6,05	5,92	8,90	8,45	7,46
90	13,79	9,50	9,38	13,38	13,48	11,85
120	17,44	12,04	11,88	18,19	17,35	16,17
P (cm/s)	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$1,64 \cdot 10^{-05}$	$1,63 \cdot 10^{-05}$	$2,38 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,23 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,83 \cdot 10^{-05} \pm 3,41 \cdot 10^{-06}$			$2,33 \cdot 10^{-05} \pm 8,44 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,27$						

Tabla IV.98 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p155 (MET 1).

TC7 p155 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,21	2,38	2,25	3,98	3,38	2,92
60	9,39	6,05	5,92	8,90	8,45	7,46
90	13,79	9,50	9,38	13,38	13,48	11,85
120	17,44	12,04	11,88	18,19	17,35	16,17
P (cm/s)	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$1,64 \cdot 10^{-05}$	$1,63 \cdot 10^{-05}$	$2,38 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,23 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,83 \cdot 10^{-05} \pm 3,41 \cdot 10^{-06}$			$2,33 \cdot 10^{-05} \pm 8,44 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,27$						

Tabla IV.99 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas TC7 p155 (MET 2).

TC7 p155 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,77	1,37	1,27	3,52	2,85	2,83
60	5,44	4,56	4,44	6,94	5,98	6,15
90	8,25	7,86	7,58	12,45	11,02	11,69
120	12,47	10,69	10,46	17,05	15,34	16,41
P (cm/s)	$1,61 \cdot 10^{-05}$	$1,58 \cdot 10^{-05}$	$1,55 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$2,15 \cdot 10^{-05}$	$2,34 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,58 \cdot 10^{-05} \pm 3,07 \cdot 10^{-07}$			$2,27 \cdot 10^{-05} \pm 1,08 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,44$						

Tabla IV.100 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas TC7 p155 (MET 3).

TC7 p155	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$1,83 \cdot 10^{-05}$	$3,41 \cdot 10^{-06}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$8,44 \cdot 10^{-07}$	1,27
MET-2	$1,83 \cdot 10^{-05}$	$3,41 \cdot 10^{-06}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$8,44 \cdot 10^{-07}$	1,27
MET-3	$1,58 \cdot 10^{-05}$	$3,07 \cdot 10^{-07}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$1,08 \cdot 10^{-06}$	1,44

Tabla IV.101 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 p155.

TC-7	Permeabilidad (cm/s)		
MET	$P_{AB} \pm DE$ (cm/s)	$P_{BA} \pm DE$ (cm/s)	Ratio
p85	$1,86 \cdot 10^{-05} \pm 1,16 \cdot 10^{-06}$	$2,42 \cdot 10^{-05} \pm 2,02 \cdot 10^{-06}$	1,30
p95	$2,23 \cdot 10^{-05} \pm 3,98 \cdot 10^{-07}$	$2,73 \cdot 10^{-05} \pm 1,01 \cdot 10^{-06}$	1,23
p105	$2,17 \cdot 10^{-05} \pm 1,64 \cdot 10^{-07}$	$2,22 \cdot 10^{-05} \pm 2,97 \cdot 10^{-07}$	1,02
p115	$1,94 \cdot 10^{-05} \pm 1,57 \cdot 10^{-06}$	$2,64 \cdot 10^{-05} \pm 2,76 \cdot 10^{-06}$	1,36
p125	$2,57 \cdot 10^{-05} \pm 2,89 \cdot 10^{-06}$	$3,00 \cdot 10^{-05} \pm 5,03 \cdot 10^{-07}$	1,17
p135	$2,12 \cdot 10^{-05} \pm 2,51 \cdot 10^{-06}$	$2,60 \cdot 10^{-05} \pm 1,47 \cdot 10^{-06}$	1,23
p145	$1,58 \cdot 10^{-05} \pm 3,63 \cdot 10^{-07}$	$2,19 \cdot 10^{-05} \pm 5,76 \cdot 10^{-07}$	1,39
p155	$1,83 \cdot 10^{-05} \pm 1,13 \cdot 10^{-06}$	$2,86 \cdot 10^{-05} \pm 1,33 \cdot 10^{-06}$	1,57

Tabla IV.102 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 a los diferentes pases celulares.

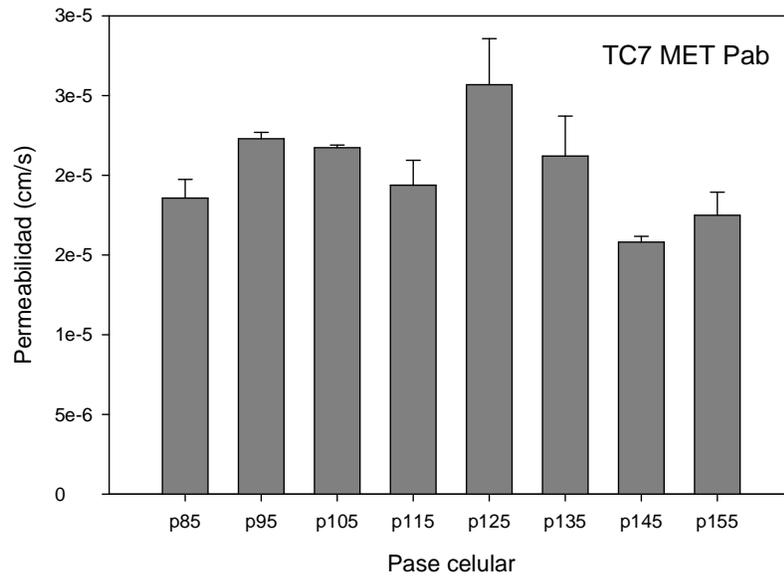


Figura IV.10 Representación gráfica de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) de metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 a los diferentes pases celulares.

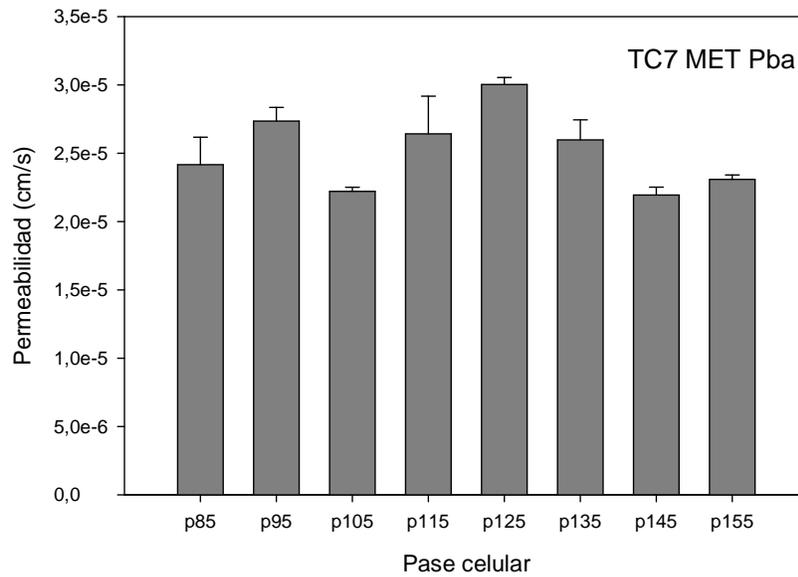


Figura IV.11 Representación gráfica de la Permeabilidad Basolateral-Apical (Pba) de metoprolol 100 μ M en monocapas TC7 a los diferentes pases celulares.

1.3 Estudios en MDCK

MDCK p25 MET-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,69	6,20	5,08	5,30	7,99	4,79
60	10,94	11,40	11,00	10,52	7,59	10,28
90	16,73	17,74	15,64	15,22	14,48	15,27
120	20,70	21,88	20,89	19,65	19,20	20,63
P (cm/s)	$2,57 \cdot 10^{-05}$	$2,69 \cdot 10^{-05}$	$2,63 \cdot 10^{-05}$	$2,41 \cdot 10^{-05}$	$2,05 \cdot 10^{-05}$	$2,65 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,63 \cdot 10^{-05} \pm 6,40 \cdot 10^{-07}$			$2,37 \cdot 10^{-05} \pm 3,05 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,90						

Tabla IV.103 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p25 (MET 1).

MDCK p25 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,40	5,68	4,63	4,13	1,59	4,51
60	10,98	12,39	10,98	8,73	7,71	9,70
90	16,50	16,85	15,35	14,70	13,68	15,16
120	21,20	20,97	20,62	19,12	18,11	19,77
P (cm/s)	$2,67 \cdot 10^{-05}$	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$2,64 \cdot 10^{-05}$	$2,57 \cdot 10^{-05}$	$2,80 \cdot 10^{-05}$	$2,59 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,62 \cdot 10^{-05} \pm 6,90 \cdot 10^{-07}$			$2,66 \cdot 10^{-05} \pm 1,29 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 1,01						

Tabla IV.104 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p25 (MET 2).

MDCK p25 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,26	4,65	4,54	3,94	3,50	4,73
60	9,53	9,90	9,87	8,42	9,15	9,89
90	13,62	14,17	14,69	13,53	13,12	15,16
120	19,33	18,52	18,67	18,08	17,56	20,16
P (cm/s)	$2,49 \cdot 10^{-05}$	$2,32 \cdot 10^{-05}$	$2,39 \cdot 10^{-05}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$2,60 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,40 \cdot 10^{-05} \pm 8,71 \cdot 10^{-07}$			$2,45 \cdot 10^{-05} \pm 1,43 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 1,02						

Tabla IV.105 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p25 (MET 3).

MDCK p25	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$2,63 \cdot 10^{-05}$	$6,40 \cdot 10^{-07}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$3,05 \cdot 10^{-06}$	0,90
MET-2	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$6,90 \cdot 10^{-07}$	$2,66 \cdot 10^{-05}$	$1,29 \cdot 10^{-06}$	1,01
MET-3	$2,40 \cdot 10^{-05}$	$8,71 \cdot 10^{-07}$	$2,45 \cdot 10^{-05}$	$1,43 \cdot 10^{-06}$	1,02

Tabla IV.106 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p25.

MDCK p35 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,59	5,86	6,62	6,69	5,36	6,12
60	12,15	13,27	12,84	12,10	10,49	11,27
90	19,80	17,64	18,32	16,95	15,78	16,73
120	24,67	22,22	22,92	21,96	20,51	21,73
P (cm/s)	$3,13 \cdot 10^{-05}$	$2,70 \cdot 10^{-05}$	$2,75 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$2,64 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,86 \cdot 10^{-05} \pm 2,34 \cdot 10^{-06}$			$2,59 \cdot 10^{-05} \pm 4,62 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,91$						

Tabla IV.107 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p35 (MET 1).

MDCK p35 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,82	4,02	3,67	4,15	3,68	3,90
60	8,71	9,39	8,56	8,68	8,37	8,80
90	13,44	13,96	13,70	13,22	13,36	13,85
120	17,97	19,20	17,97	17,65	18,07	18,98
P (cm/s)	$2,38 \cdot 10^{-05}$	$2,53 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$2,28 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$2,54 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,45 \cdot 10^{-05} \pm 7,63 \cdot 10^{-07}$			$2,42 \cdot 10^{-05} \pm 1,33 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,99						

Tabla IV.108 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p35 (MET 2).

MDCK p35 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,17	7,14	5,88	5,90	5,82	5,94
60	12,34	13,37	11,74	10,46	11,03	11,21
90	18,02	18,93	16,59	15,33	15,93	16,78
120	22,74	24,21	21,19	20,16	20,72	21,95
P (cm/s)	$2,80 \cdot 10^{-05}$	$2,87 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$2,41 \cdot 10^{-05}$	$2,50 \cdot 10^{-05}$	$2,71 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,74 \cdot 10^{-05} \pm 1,59 \cdot 10^{-06}$			$2,54 \cdot 10^{-05} \pm 1,53 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,93						

Tabla IV.109 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p35 (MET 3).

MDCK p35	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$2,86 \cdot 10^{-05}$	$2,34 \cdot 10^{-06}$	$2,59 \cdot 10^{-05}$	$4,62 \cdot 10^{-07}$	0,91
MET-2	$2,45 \cdot 10^{-05}$	$7,63 \cdot 10^{-07}$	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$1,33 \cdot 10^{-06}$	0,99
MET-3	$2,74 \cdot 10^{-05}$	$1,59 \cdot 10^{-06}$	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$1,53 \cdot 10^{-06}$	0,93

Tabla IV.110 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p35.

MDCK p45 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,38	3,24	3,61	3,68	3,55	3,47
60	8,93	8,91	8,43	8,05	8,68	7,76
90	14,02	13,12	13,60	13,03	13,36	12,10
120	18,21	17,44	17,99	17,63	17,83	16,43
P (cm/s)	$2,50 \cdot 10^{-05}$	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$2,44 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$	$2,18 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,44 \cdot 10^{-05} \pm 7,01 \cdot 10^{-07}$			$2,32 \cdot 10^{-05} \pm 1,17 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,95$						

Tabla IV.111 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p45 (MET 1).

MDCK p45 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,60	3,21	3,53	4,35	3,49	3,65
60	8,91	8,79	8,78	9,48	8,54	8,76
90	13,44	13,66	12,92	14,72	13,39	13,70
120	18,87	17,20	17,27	18,72	17,88	18,16
P (cm/s)	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,29 \cdot 10^{-05}$	$2,44 \cdot 10^{-05}$	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$2,45 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,40 \cdot 10^{-05} \pm 1,29 \cdot 10^{-06}$			$2,44 \cdot 10^{-05} \pm 1,23 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 1,02						

Tabla IV.112 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p45 (MET 2).

MDCK p45 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,75	3,61	3,58	3,72	4,11	3,51
60	9,67	9,47	9,33	8,42	8,93	8,39
90	16,30	14,96	15,18	13,87	13,92	13,35
120	20,74	19,57	19,78	17,90	18,81	18,18
P (cm/s)	$2,91 \cdot 10^{-05}$	$2,70 \cdot 10^{-05}$	$2,75 \cdot 10^{-05}$	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,78 \cdot 10^{-05} \pm 1,11 \cdot 10^{-06}$			$2,46 \cdot 10^{-05} \pm 2,98 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,88						

Tabla IV.113 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p45 (MET 3).

MDCK p45	Transporte AP		Transporte BL		Cociente	
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}	DE
MET-1	$2,44 \cdot 10^{-05}$	$7,01 \cdot 10^{-07}$	$2,32 \cdot 10^{-05}$	$1,17 \cdot 10^{-06}$	0,95	
MET-2	$2,40 \cdot 10^{-05}$	$1,29 \cdot 10^{-06}$	$2,44 \cdot 10^{-05}$	$1,23 \cdot 10^{-07}$	1,02	
MET-3	$2,78 \cdot 10^{-05}$	$1,11 \cdot 10^{-06}$	$2,46 \cdot 10^{-05}$	$2,98 \cdot 10^{-07}$	0,88	

Tabla IV.114 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p45.

MDCK p55 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,09	3,25	1,57	4,05	3,78	3,72
60	10,42	8,77	7,03	10,10	9,51	9,77
90	18,83	15,83	13,79	15,70	14,50	15,05
120	21,69	19,26	17,33	20,66	18,94	20,08
P (cm/s)	$3,55 \cdot 10^{-05}$	$2,78 \cdot 10^{-05}$	$2,73 \cdot 10^{-05}$	$2,80 \cdot 10^{-05}$	$2,55 \cdot 10^{-05}$	$2,75 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$3,02 \cdot 10^{-05} \pm 4,56 \cdot 10^{-06}$			$2,70 \cdot 10^{-05} \pm 1,32 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,89$						

Tabla IV.115 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p55 (MET 1).

MDCK p55 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,78	2,67	2,37	3,77	4,05	4,05
60	8,89	9,40	8,05	9,42	9,96	9,96
90	13,47	14,31	13,10	14,82	15,58	15,58
120	18,01	18,82	17,13	19,83	20,21	20,21
P (cm/s)	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$2,70 \cdot 10^{-05}$	$2,49 \cdot 10^{-05}$	$2,71 \cdot 10^{-05}$	$2,73 \cdot 10^{-05}$	$2,73 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,57 \cdot 10^{-05} \pm 1,07 \cdot 10^{-06}$			$2,72 \cdot 10^{-05} \pm 1,46 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,06						

Tabla IV.116 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p55 (MET 2).

MDCK p55 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,55	2,93	2,53	3,43	3,33	3,39
60	14,53	8,91	8,08	8,82	8,44	8,24
90	14,56	13,80	13,02	13,82	13,28	13,18
120	18,67	18,63	17,18	19,11	18,08	17,71
P (cm/s)	$2,44 \cdot 10^{-05}$	$2,63 \cdot 10^{-05}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$2,63 \cdot 10^{-05}$	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$2,42 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,51 \cdot 10^{-05} \pm 9,83 \cdot 10^{-07}$			$2,51 \cdot 10^{-05} \pm 1,07 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,00						

Tabla IV.117 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p55 (MET 3).

MDCK p55	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$3,02 \cdot 10^{-05}$	$4,56 \cdot 10^{-06}$	$2,70 \cdot 10^{-05}$	$1,32 \cdot 10^{-06}$	0,89
MET-2	$2,57 \cdot 10^{-05}$	$1,07 \cdot 10^{-06}$	$2,72 \cdot 10^{-05}$	$1,46 \cdot 10^{-07}$	1,06
MET-3	$2,51 \cdot 10^{-05}$	$9,83 \cdot 10^{-07}$	$2,51 \cdot 10^{-05}$	$1,07 \cdot 10^{-06}$	1,00

Tabla IV.118 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p55.

MDCK p65 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,58	3,29	3,75	3,88	3,55	3,18
60	9,49	8,96	9,04	8,49	8,60	7,70
90	13,72	13,08	13,49	13,54	13,15	12,32
120	17,96	17,22	17,18	18,02	17,80	16,65
P (cm/s)	$2,39 \cdot 10^{-05}$	$2,32 \cdot 10^{-05}$	$2,26 \cdot 10^{-05}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$	$2,39 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,32 \cdot 10^{-05} \pm 6,71 \cdot 10^{-07}$			$2,35 \cdot 10^{-05} \pm 6,86 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,01$						

Tabla IV.119 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p65 (MET 1).

MDCK p65 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,04	3,04	4,21	3,13	3,36	2,90
60	8,10	8,27	10,04	7,77	8,02	7,51
90	12,80	14,70	15,05	12,58	12,80	12,28
120	17,26	18,87	19,51	17,20	17,24	16,94
P (cm/s)	$2,39 \cdot 10^{-05}$	$2,72 \cdot 10^{-05}$	$2,57 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,34 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,56 \cdot 10^{-05} \pm 1,66 \cdot 10^{-06}$			$2,36 \cdot 10^{-05} \pm 1,64 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,92						

Tabla IV. 120 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p65 (MET 2).

MDCK p65 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,17	3,25	3,34	4,03	3,73	3,94
60	8,64	7,78	7,91	9,22	8,27	8,98
90	13,16	11,42	13,02	14,31	12,34	13,71
120	17,79	15,79	16,91	18,42	16,44	18,23
P (cm/s)	$2,44 \cdot 10^{-05}$	$2,08 \cdot 10^{-05}$	$2,31 \cdot 10^{-05}$	$2,44 \cdot 10^{-05}$	$2,13 \cdot 10^{-05}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,28 \cdot 10^{-05} \pm 1,82 \cdot 10^{-06}$			$2,32 \cdot 10^{-05} \pm 1,69 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 1,02						

Tabla IV.121 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p65 (MET 3).

MDCK p65	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$2,32 \cdot 10^{-05}$	$6,71 \cdot 10^{-07}$	$2,35 \cdot 10^{-05}$	$6,86 \cdot 10^{-07}$	1,01
MET-2	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$1,66 \cdot 10^{-06}$	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$1,64 \cdot 10^{-07}$	0,92
MET-3	$2,28 \cdot 10^{-05}$	$1,82 \cdot 10^{-06}$	$2,32 \cdot 10^{-05}$	$1,69 \cdot 10^{-06}$	1,02

Tabla IV.122 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p65.

MDCK p75 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,97	3,67	3,84	4,06	4,23	3,83
60	8,69	9,23	8,71	9,22	9,45	9,92
90	13,15	13,58	13,58	14,83	15,17	15,53
120	17,67	17,81	18,39	20,33	19,57	19,67
P (cm/s)	$2,45 \cdot 10^{-05}$	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$2,45 \cdot 10^{-05}$	$2,75 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$2,68 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,42 \cdot 10^{-05} \pm 5,15 \cdot 10^{-07}$			$2,68 \cdot 10^{-05} \pm 6,79 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,11$						

Tabla IV.123 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p75 (MET 1).

MDCK p75 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,05	3,73	3,29	3,72	3,76	3,72
60	8,24	8,87	8,42	8,96	8,30	8,96
90	13,16	13,78	13,10	14,39	13,54	14,39
120	16,96	17,94	17,40	20,15	17,38	20,15
P (cm/s)	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,76 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$2,76 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,38 \cdot 10^{-05} \pm 2,29 \cdot 10^{-07}$			$2,62 \cdot 10^{-05} \pm 2,51 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,10						

Tabla IV.124 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p75 (MET 2).

MDCK p75 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,31	3,28	3,54	3,12	3,78	4,05
60	8,52	8,27	8,67	7,85	8,36	8,90
90	12,95	12,68	13,22	12,56	13,62	14,31
120	17,52	16,78	18,09	17,21	18,45	19,48
P (cm/s)	$2,38 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,49 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,36 \cdot 10^{-05} \pm 8,46 \cdot 10^{-07}$			$2,49 \cdot 10^{-05} \pm 1,19 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,06						

Tabla IV.125 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p75 (MET 3).

MDCK p75	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
MET-1	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$5,15 \cdot 10^{-07}$	$2,68 \cdot 10^{-05}$	$6,79 \cdot 10^{-07}$	1,11
MET-2	$2,38 \cdot 10^{-05}$	$2,29 \cdot 10^{-07}$	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$2,51 \cdot 10^{-06}$	1,10
MET-3	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$8,46 \cdot 10^{-07}$	$2,49 \cdot 10^{-05}$	$1,19 \cdot 10^{-06}$	1,06

Tabla IV.126 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p75.

MDCK p85 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,36	5,38	5,43	3,99	4,92	4,43
60	11,32	11,70	11,19	9,22	10,36	10,12
90	16,52	16,71	15,97	14,20	15,35	15,27
120	21,43	21,32	20,35	19,53	20,68	20,55
P (cm/s)	$2,70 \cdot 10^{-05}$	$2,67 \cdot 10^{-05}$	$2,50 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$2,64 \cdot 10^{-05}$	$2,70 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,62 \cdot 10^{-05} \pm 1,05 \cdot 10^{-06}$			$2,65 \cdot 10^{-05} \pm 4,96 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,01$						

Tabla IV.127 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p85 (MET 1).

MDCK p85 MET-2 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,13	4,88	5,32	4,84	4,42	4,64
60	11,33	10,06	11,18	10,31	9,97	10,28
90	16,44	15,39	16,63	16,15	15,56	15,85
120	20,82	20,00	21,22	21,45	21,02	21,58
P (cm/s)	$2,64 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$2,69 \cdot 10^{-05}$	$2,81 \cdot 10^{-05}$	$2,80 \cdot 10^{-05}$	$2,85 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,63 \cdot 10^{-05} \pm 6,37 \cdot 10^{-07}$			$2,82 \cdot 10^{-05} \pm 2,53 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,07						

Tabla IV.128 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p85 (MET 2).

MDCK p85 MET-3 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,32	5,54	5,40	5,19	5,35	4,27
60	11,06	11,20	10,96	10,95	11,27	9,41
90	16,07	15,69	15,83	16,74	17,05	14,61
120	20,12	20,31	20,34	22,41	22,76	19,69
P (cm/s)	$2,49 \cdot 10^{-05}$	$2,46 \cdot 10^{-05}$	$2,51 \cdot 10^{-05}$	$2,90 \cdot 10^{-05}$	$2,93 \cdot 10^{-05}$	$2,60 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,49 \cdot 10^{-05} \pm 2,27 \cdot 10^{-07}$			$2,81 \cdot 10^{-05} \pm 1,84 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,13						

Tabla IV.129 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p85 (MET 3).

MDCK p85	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$1,05 \cdot 10^{-06}$	$2,65 \cdot 10^{-05}$	$4,96 \cdot 10^{-07}$	1,01
MET-2	$2,63 \cdot 10^{-05}$	$6,37 \cdot 10^{-07}$	$2,82 \cdot 10^{-05}$	$2,53 \cdot 10^{-07}$	1,07
MET-3	$2,49 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-07}$	$2,81 \cdot 10^{-05}$	$1,84 \cdot 10^{-06}$	1,13

Tabla IV.130 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p85.

MDCK p95 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,96	3,39	3,43	4,63	4,29	3,95
60	9,91	9,84	9,47	11,83	10,13	9,53
90	14,85	16,46	15,79	16,97	16,23	15,50
120	19,03	21,24	19,54	22,03	21,59	20,74
P (cm/s)	$2,69 \cdot 10^{-05}$	$3,04 \cdot 10^{-05}$	$2,76 \cdot 10^{-05}$	$2,90 \cdot 10^{-05}$	$2,93 \cdot 10^{-05}$	$2,85 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,83 \cdot 10^{-05} \pm 1,86 \cdot 10^{-06}$			$2,89 \cdot 10^{-05} \pm 4,16 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,02$						

Tabla IV.131 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p95 (MET 1).

MDCK p95 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,45	3,48	2,73	3,50	4,06	3,50
60	11,11	11,11	9,03	8,59	10,66	8,59
90	17,36	17,75	15,45	13,32	15,86	13,32
120	22,26	21,03	18,93	18,11	21,02	18,11
P (cm/s)	$3,17 \cdot 10^{-05}$	$2,99 \cdot 10^{-05}$	$2,78 \cdot 10^{-05}$	$2,45 \cdot 10^{-05}$	$2,83 \cdot 10^{-05}$	$2,45 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,98 \cdot 10^{-05} \pm 1,93 \cdot 10^{-06}$			$2,58 \cdot 10^{-05} \pm 2,20 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,87						

Tabla IV.132 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p95 (MET 2).

MDCK p95 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,92	2,50	2,46	4,06	3,95	3,42
60	8,57	8,23	7,93	9,33	8,63	8,70
90	13,90	13,16	12,75	15,10	13,52	13,53
120	18,30	18,00	17,30	20,19	18,01	18,33
P (cm/s)	$2,60 \cdot 10^{-05}$	$2,60 \cdot 10^{-05}$	$2,49 \cdot 10^{-05}$	$2,74 \cdot 10^{-05}$	$2,38 \cdot 10^{-05}$	$2,50 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,56 \cdot 10^{-05} \pm 6,17 \cdot 10^{-07}$			$2,54 \cdot 10^{-05} \pm 1,82 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,99						

Tabla IV.133 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK p95 (MET 3).

MDCK p95	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$2,83 \cdot 10^{-05}$	$1,86 \cdot 10^{-06}$	$2,89 \cdot 10^{-05}$	$4,16 \cdot 10^{-07}$	1,02
MET-2	$2,98 \cdot 10^{-05}$	$1,93 \cdot 10^{-06}$	$2,58 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-06}$	0,87
MET-3	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$6,17 \cdot 10^{-07}$	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$1,82 \cdot 10^{-06}$	0,99

Tabla IV.134 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK p95.

MDCK	Permeabilidad (cm/s)		
MET	$P_{AB} \pm DE$ (cm/s)	$P_{BA} \pm DE$ (cm/s)	Ratio
p25	$2,55 \cdot 10^{-05} \pm 1,32 \cdot 10^{-06}$	$2,49 \cdot 10^{-05} \pm 1,48 \cdot 10^{-06}$	0,98
p35	$2,68 \cdot 10^{-05} \pm 2,12 \cdot 10^{-06}$	$2,51 \cdot 10^{-05} \pm 8,83 \cdot 10^{-07}$	0,94
p45	$2,54 \cdot 10^{-05} \pm 2,13 \cdot 10^{-06}$	$2,40 \cdot 10^{-05} \pm 7,76 \cdot 10^{-07}$	0,95
p55	$2,70 \cdot 10^{-05} \pm 2,76 \cdot 10^{-06}$	$2,64 \cdot 10^{-05} \pm 1,17 \cdot 10^{-06}$	0,98
p65	$2,39 \cdot 10^{-05} \pm 1,51 \cdot 10^{-06}$	$2,35 \cdot 10^{-05} \pm 2,00 \cdot 10^{-07}$	0,98
p75	$2,39 \cdot 10^{-05} \pm 3,15 \cdot 10^{-07}$	$2,60 \cdot 10^{-05} \pm 9,77 \cdot 10^{-07}$	1,09
p85	$2,58 \cdot 10^{-05} \pm 7,80 \cdot 10^{-07}$	$2,76 \cdot 10^{-05} \pm 9,58 \cdot 10^{-07}$	1,07
p95	$2,79 \cdot 10^{-05} \pm 2,11 \cdot 10^{-06}$	$2,67 \cdot 10^{-05} \pm 1,92 \cdot 10^{-06}$	0,96

Tabla IV.135 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK a los diferentes pases celulares.

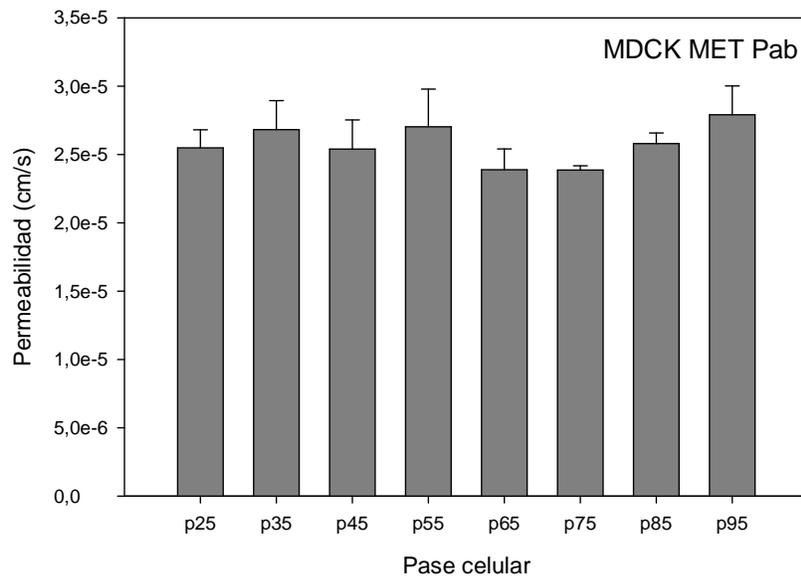


Figura IV.12 Representación gráfica de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) de metoprolol 100 µM en monocapas MDCK a los diferentes pases celulares.

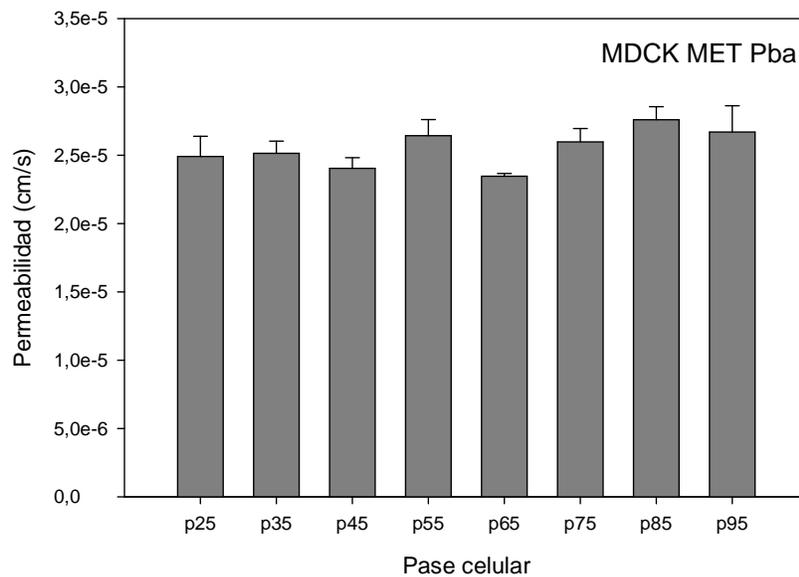


Figura IV.13 Representación gráfica de la Permeabilidad Basolateral-Apical (Pba) de metoprolol 100 µM en monocapas MDCK a los diferentes pases celulares.

1.4 Estudios en MDCK-MDR1

MDCK-MDR1 p25 MET-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,52	4,17	4,48	3,97	4,12	3,13
60	9,86	9,59	10,21	8,89	8,74	7,05
90	13,38	14,39	14,61	12,85	12,87	10,81
120	17,74	19,08	20,22	17,61	17,36	14,39
P (cm/s)	$2,18 \cdot 10^{-05}$	$2,50 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$2,21 \cdot 10^{-05}$	$1,90 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,43 \cdot 10^{-05} \pm 2,22 \cdot 10^{-06}$			$2,13 \cdot 10^{-05} \pm 2,01 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,88						

Tabla IV.136 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol $100\mu\text{M}$ en monocapas MDCK-MDR1 p25 (MET 1).

MDCK-MDR1 p25 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,56	4,33	4,35	3,93	3,94	4,16
60	10,08	9,57	9,99	8,98	8,89	9,27
90	14,97	13,92	15,09	13,29	13,14	13,74
120	18,89	19,18	19,79	17,70	17,87	18,49
P (cm/s)	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$2,60 \cdot 10^{-05}$	$2,30 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,49 \cdot 10^{-05} \pm 9,23 \cdot 10^{-07}$			$2,34 \cdot 10^{-05} \pm 4,88 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,94						

Tabla IV.137 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p25 (MET 2).

MDCK-MDR1 p25 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,27	3,98	4,60	3,84	3,86	4,19
60	10,11	9,90	10,18	8,75	8,14	9,17
90	15,07	14,67	15,55	12,99	12,16	13,50
120	19,78	19,39	20,67	17,92	16,74	18,01
P (cm/s)	$2,60 \cdot 10^{-05}$	$2,58 \cdot 10^{-05}$	$2,71 \cdot 10^{-05}$	$2,35 \cdot 10^{-05}$	$2,15 \cdot 10^{-05}$	$2,31 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,63 \cdot 10^{-05} \pm 6,90 \cdot 10^{-07}$			$2,27 \cdot 10^{-05} \pm 1,03 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,86						

Tabla IV.138 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p25 (MET 3).

MDCK-MDR1 p25	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
MET-1	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$2,22 \cdot 10^{-06}$	$2,13 \cdot 10^{-05}$	$2,01 \cdot 10^{-06}$	0,88
MET-2	$2,49 \cdot 10^{-05}$	$9,23 \cdot 10^{-07}$	$2,34 \cdot 10^{-05}$	$4,88 \cdot 10^{-07}$	0,94
MET-3	$2,63 \cdot 10^{-05}$	$6,90 \cdot 10^{-07}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$1,03 \cdot 10^{-06}$	0,86

Tabla IV.139 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 p25.

MDCK-MDR1 p35 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,78	1,35	1,16	2,36	2,28	2,25
60	7,54	6,49	6,00	5,81	6,33	6,35
90	12,47	10,98	10,56	9,48	9,68	9,76
120	17,46	14,86	14,59	12,26	12,42	12,70
P (cm/s)	$2,63 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$1,69 \cdot 10^{-05}$	$1,70 \cdot 10^{-05}$	$1,76 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,39 \cdot 10^{-05} \pm 2,05 \cdot 10^{-06}$			$1,72 \cdot 10^{-05} \pm 3,56 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,72$						

Tabla IV.140 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 p35 (MET 1).

MDCK-MDR1 p35 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,76	0,49	1,03	1,79	1,99	1,84
60	5,80	6,13	6,16	5,17	5,54	5,40
90	10,25	9,90	10,94	8,39	8,78	8,73
120	14,39	14,84	14,85	11,24	11,75	11,49
P (cm/s)	$2,29 \cdot 10^{-05}$	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$1,59 \cdot 10^{-05}$	$1,64 \cdot 10^{-05}$	$1,63 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,33 \cdot 10^{-05} \pm 3,76 \cdot 10^{-07}$			$1,62 \cdot 10^{-05} \pm 2,56 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,70$						

Tabla IV.141 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas MDCK-MDR1 p35 (MET 2).

MDCK-MDR1 p35	Transporte AP		Transporte BL		Cociente	
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}	DE
MET-1	$2,39 \cdot 10^{-05}$	$2,05 \cdot 10^{-06}$	$1,72 \cdot 10^{-05}$	$3,56 \cdot 10^{-07}$	0,72	
MET-2	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$3,76 \cdot 10^{-07}$	$1,62 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-07}$	0,70	

Tabla IV.142 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p35.

MDCK-MDR1 p45 MET-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,59	1,95	2,60	3,45	3,35	2,48
60	7,70	6,92	7,89	7,18	7,15	5,86
90	12,57	10,78	12,24	11,16	10,97	9,57
120	16,93	14,52	16,13	14,38	14,48	13,15
P (cm/s)	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$2,10 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$1,86 \cdot 10^{-05}$	$1,88 \cdot 10^{-05}$	$1,80 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,26 \cdot 10^{-05} \pm 1,60 \cdot 10^{-06}$			$1,85 \cdot 10^{-05} \pm 3,92 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,82						

Tabla IV.143 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 p45 (MET 1).

MDCK-MDR1 p45 MET-2 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,60	1,62	1,17	2,21	2,10	2,44
60	7,08	7,34	6,67	6,17	5,36	6,11
90	12,73	12,20	11,63	9,62	8,69	9,48
120	16,89	16,63	16,01	12,97	11,60	12,59
P (cm/s)	$2,60 \cdot 10^{-05}$	$2,52 \cdot 10^{-05}$	$2,50 \cdot 10^{-05}$	$1,80 \cdot 10^{-05}$	$1,61 \cdot 10^{-05}$	$1,71 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,54 \cdot 10^{-05} \pm 5,53 \cdot 10^{-07}$			$1,71 \cdot 10^{-05} \pm 9,83 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,67						

Tabla IV.144 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 p45 (MET 2).

MDCK-MDR1 p45 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,51	1,78	1,50	2,19	2,23	2,00
60	6,35	7,05	6,54	5,97	6,01	6,11
90	11,28	11,84	11,37	9,30	9,59	9,75
120	14,69	15,99	15,94	12,38	12,60	12,36
P (cm/s)	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$1,71 \cdot 10^{-05}$	$1,75 \cdot 10^{-05}$	$1,75 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,36 \cdot 10^{-05} \pm 9,92 \cdot 10^{-07}$			$1,74 \cdot 10^{-05} \pm 2,32 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,74$						

Tabla IV.145 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{AB}) y Basolateral-Apical (P_{BA}) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas MDCK-MDR1 p45 (MET 3).

MDCK-MDR1 p45	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
MET-1	$2,26 \cdot 10^{-05}$	$1,60 \cdot 10^{-06}$	$1,85 \cdot 10^{-05}$	$3,92 \cdot 10^{-07}$	0,82
MET-2	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$5,53 \cdot 10^{-07}$	$1,71 \cdot 10^{-05}$	$9,83 \cdot 10^{-07}$	0,67
MET-3	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$9,92 \cdot 10^{-07}$	$1,74 \cdot 10^{-05}$	$2,32 \cdot 10^{-07}$	0,74

Tabla IV.146 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{AB}) y Basolateral-Apical (P_{BA}) de metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p45.

MDCK-MDR1 p55 MET-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,42	0,42	0,38	2,32	2,58	2,49
60	5,51	5,10	6,58	6,53	7,43	7,25
90	10,96	9,59	13,11	11,03	12,28	11,87
120	15,91	14,19	18,74	14,77	16,90	16,78
P (cm/s)	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$2,31 \cdot 10^{-05}$	$3,11 \cdot 10^{-05}$	$2,11 \cdot 10^{-05}$	$2,41 \cdot 10^{-05}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,68 \cdot 10^{-05} \pm 4,03 \cdot 10^{-06}$			$2,31 \cdot 10^{-05} \pm 1,68 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,86						

Tabla IV.147 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p55 (MET 1).

MDCK-MDR1 p55 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,92	0,29	4,06	2,62	2,58	2,49
60	6,14	4,89	7,59	7,42	7,43	7,25
90	12,46	9,85	11,36	12,07	12,28	11,87
120	18,68	15,01	14,10	16,71	16,90	16,78
P (cm/s)	$3,01 \cdot 10^{-05}$	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$1,71 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,41 \cdot 10^{-05}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,40 \cdot 10^{-05} \pm 6,53 \cdot 10^{-06}$			$2,39 \cdot 10^{-05} \pm 2,29 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 1,00						

Tabla IV.148 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p55 (MET 2).

MDCK-MDR1 p55 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,21	0,83	0,61	2,93	2,49	2,09
60	6,08	5,82	4,99	7,42	6,18	5,59
90	11,45	10,85	9,96	12,32	10,17	9,72
120	17,95	15,96	15,20	15,82	14,94	14,15
P (cm/s)	$2,81 \cdot 10^{-05}$	$2,55 \cdot 10^{-05}$	$2,46 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$2,09 \cdot 10^{-05}$	$2,04 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,61 \cdot 10^{-05} \pm 1,79 \cdot 10^{-06}$			$2,11 \cdot 10^{-05} \pm 8,41 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,81$						

Tabla IV.149 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas MDCK-MDR1 p55 (MET 3).

MDCK-MDR1 p55	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
MET-1	$2,68 \cdot 10^{-05}$	$4,03 \cdot 10^{-06}$	$2,31 \cdot 10^{-05}$	$1,68 \cdot 10^{-06}$	0,86
MET-2	$2,40 \cdot 10^{-05}$	$6,53 \cdot 10^{-06}$	$2,39 \cdot 10^{-05}$	$2,29 \cdot 10^{-07}$	1,00
MET-3	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$1,79 \cdot 10^{-06}$	$2,11 \cdot 10^{-05}$	$8,41 \cdot 10^{-07}$	0,81

Tabla IV.150 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p55.

MDCK-MDR1 p65 MET-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,21	2,62	2,20	2,99	2,73	2,78
60	7,23	7,22	6,47	6,67	6,54	6,08
90	11,45	11,64	10,81	10,06	9,75	9,32
120	15,07	15,35	14,26	13,45	13,11	12,47
P (cm/s)	$2,01 \cdot 10^{-05}$	$2,15 \cdot 10^{-05}$	$2,05 \cdot 10^{-05}$	$1,76 \cdot 10^{-05}$	$1,73 \cdot 10^{-05}$	$1,63 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,07 \cdot 10^{-05} \pm 7,41 \cdot 10^{-07}$			$1,71 \cdot 10^{-05} \pm 6,64 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 0,82						

Tabla IV.151 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p65 (MET 1).

MDCK-MDR1 p65 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,12	3,26	12,61	3,68	3,54	3,31
60	9,28	10,15	23,83	8,91	8,86	8,61
90	15,05	15,96	32,77	14,42	13,31	12,67
120	19,79	21,40	40,93	19,06	17,97	16,90
P (cm/s)	$2,82 \cdot 10^{-05}$	$3,04 \cdot 10^{-05}$	$4,74 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$2,41 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$3,53 \cdot 10^{-05} \pm 1,05 \cdot 10^{-05}$			$2,43 \cdot 10^{-05} \pm 1,73 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 0,69						

Tabla IV. 152 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p65 (MET 2).

MDCK-MDR1 p65 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,23	3,44	3,47	3,87	3,22	3,43
60	9,93	11,38	11,36	8,48	8,12	8,64
90	16,32	18,44	18,51	13,65	12,94	13,84
120	21,93	24,39	24,85	17,90	17,41	18,70
P (cm/s)	$3,16 \cdot 10^{-05}$	$3,53 \cdot 10^{-05}$	$3,60 \cdot 10^{-05}$	$2,39 \cdot 10^{-05}$	$2,39 \cdot 10^{-05}$	$2,58 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$3,43 \cdot 10^{-05} \pm 2,39 \cdot 10^{-06}$			$2,45 \cdot 10^{-05} \pm 1,07 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,72$						

Tabla IV.153 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol 100μM en monocapas MDCK-MDR1 p65 (MET 3).

MDCK-MDR1 p65	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
MET-1	$2,07 \cdot 10^{-05}$	$7,41 \cdot 10^{-07}$	$1,71 \cdot 10^{-05}$	$6,64 \cdot 10^{-07}$	0,82
MET-2	$3,53 \cdot 10^{-05}$	$1,05 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$1,73 \cdot 10^{-06}$	0,69
MET-3	$3,43 \cdot 10^{-05}$	$2,39 \cdot 10^{-06}$	$2,45 \cdot 10^{-05}$	$1,07 \cdot 10^{-06}$	0,72

Tabla IV.154 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p65.

MDCK-MDR1 p75 MET-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,16	0,15	0,27	1,57	1,12	1,22
60	3,87	3,71	3,45	4,43	3,61	3,78
90	7,43	7,43	7,25	7,36	6,41	6,39
120	10,51	10,38	10,30	10,00	8,95	8,73
P (cm/s)	$1,75 \cdot 10^{-05}$	$1,74 \cdot 10^{-05}$	$1,71 \cdot 10^{-05}$	$1,43 \cdot 10^{-05}$	$1,33 \cdot 10^{-05}$	$1,27 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,73 \cdot 10^{-05} \pm 1,84 \cdot 10^{-07}$			$1,34 \cdot 10^{-05} \pm 7,93 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,77						

Tabla IV.155 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p75 (MET 1).

MDCK-MDR1 p75 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,35	-0,30	-0,32	1,46	1,05	1,22
60	3,84	2,48	2,46	4,22	3,77	4,09
90	7,50	5,84	6,42	7,24	6,69	7,19
120	10,44	8,27	9,10	9,63	9,16	9,66
P (cm/s)	$1,71 \cdot 10^{-05}$	$1,47 \cdot 10^{-05}$	$1,63 \cdot 10^{-05}$	$1,39 \cdot 10^{-05}$	$1,38 \cdot 10^{-05}$	$1,44 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,60 \cdot 10^{-05} \pm 1,24 \cdot 10^{-06}$			$1,40 \cdot 10^{-05} \pm 3,09 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,87						

Tabla IV.156 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p75 (MET 2).

MDCK-MDR1 p75 MET-3 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	0,46	0,40	0,32	1,29	1,15	1,05
60	3,09	3,46	3,67	4,05	3,78	3,53
90	6,63	6,68	6,64	6,96	6,49	6,37
120	7,64	9,31	9,60	9,39	7,76	8,97
P (cm/s)	$1,41 \cdot 10^{-05}$	$1,63 \cdot 10^{-05}$	$1,65 \cdot 10^{-05}$	$1,38 \cdot 10^{-05}$	$1,14 \cdot 10^{-05}$	$1,34 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,56 \cdot 10^{-05} \pm 1,38 \cdot 10^{-06}$			$1,29 \cdot 10^{-05} \pm 1,29 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,82						

Tabla IV.157 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 p75 (MET 3).

MDCK-MDR1 p75	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P _{BA} /P _{AB}
	P _{AB} (cm/s)	DE	P _{BA} (cm/s)	DE	
MET-1	$1,73 \cdot 10^{-05}$	$1,84 \cdot 10^{-07}$	$1,34 \cdot 10^{-05}$	$7,93 \cdot 10^{-07}$	0,77
MET-2	$1,60 \cdot 10^{-05}$	$1,24 \cdot 10^{-06}$	$1,40 \cdot 10^{-05}$	$3,09 \cdot 10^{-07}$	0,87
MET-3	$1,56 \cdot 10^{-05}$	$1,38 \cdot 10^{-06}$	$1,29 \cdot 10^{-05}$	$1,29 \cdot 10^{-06}$	0,82

Tabla IV.158 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 p75.

MDCK-MDR1 p85 MET-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,39	2,97	3,06	2,70	2,41	2,45
60	9,21	8,40	8,90	6,18	5,69	5,70
90	14,04	13,03	13,96	9,28	8,76	8,74
120	18,72	17,09	18,21	12,26	11,63	11,63
P (cm/s)	$2,57 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,55 \cdot 10^{-05}$	$1,60 \cdot 10^{-05}$	$1,55 \cdot 10^{-05}$	$1,54 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,50 \cdot 10^{-05} \pm 1,07 \cdot 10^{-06}$			$1,57 \cdot 10^{-05} \pm 3,28 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 0,63						

Tabla IV.159 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p85 (MET 1).

MDCK-MDR1 p85 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,06	3,35	3,40	2,79	2,59	2,71
60	8,32	9,18	8,94	5,88	5,85	6,58
90	13,50	14,45	13,79	8,87	8,89	9,88
120	17,85	18,99	18,27	11,85	11,83	13,08
P (cm/s)	$2,50 \cdot 10^{-05}$	$2,64 \cdot 10^{-05}$	$2,50 \cdot 10^{-05}$	$1,52 \cdot 10^{-05}$	$1,55 \cdot 10^{-05}$	$1,74 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,55 \cdot 10^{-05} \pm 7,79 \cdot 10^{-07}$			$1,60 \cdot 10^{-05} \pm 1,15 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 0,63						

Tabla IV.160 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p85 (MET 2).

MDCK-MDR1 p85 MET-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,53	1,08	1,29	1,56	1,57	1,95
60	7,24	6,69	7,29	5,10	5,04	5,63
90	12,30	11,59	12,84	8,44	8,24	8,70
120	17,15	16,26	17,95	11,72	10,99	11,82
P (cm/s)	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$2,55 \cdot 10^{-05}$	$2,80 \cdot 10^{-05}$	$1,71 \cdot 10^{-05}$	$1,59 \cdot 10^{-05}$	$1,65 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,66 \cdot 10^{-05} \pm 1,32 \cdot 10^{-06}$			$1,65 \cdot 10^{-05} \pm 5,94 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,62						

Tabla IV.161 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar metoprolol $100\mu\text{M}$ en monocapas MDCK-MDR1 p85 (MET 3).

MDCK-MDR1 p85	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P _{BA} /P _{AB}
	P _{AB} (cm/s)	DE	P _{BA} (cm/s)	DE	
MET-1	$2,50 \cdot 10^{-05}$	$1,07 \cdot 10^{-06}$	$1,57 \cdot 10^{-05}$	$3,28 \cdot 10^{-07}$	0,63
MET-2	$2,55 \cdot 10^{-05}$	$7,79 \cdot 10^{-07}$	$1,60 \cdot 10^{-05}$	$1,15 \cdot 10^{-06}$	0,63
MET-3	$2,66 \cdot 10^{-05}$	$1,32 \cdot 10^{-06}$	$1,65 \cdot 10^{-05}$	$5,94 \cdot 10^{-07}$	0,62

Tabla IV.162 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de metoprolol $100\mu\text{M}$ en monocapas MDCK-MDR1 p85.

MDCK-MDR1 p95 MET-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,49	3,05	3,35	2,16	2,13	2,13
60	8,19	8,10	9,39	5,19	4,96	4,92
90	12,16	12,38	13,24	8,44	7,84	8,03
120	14,96	15,75	16,92	11,13	10,54	10,63
P (cm/s)	$1,94 \cdot 10^{-05}$	$2,14 \cdot 10^{-05}$	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$1,52 \cdot 10^{-05}$	$1,42 \cdot 10^{-05}$	$1,44 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,11 \cdot 10^{-05} \pm 1,59 \cdot 10^{-06}$			$1,46 \cdot 10^{-05} \pm 5,36 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,69						

Tabla IV.163 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p95 (MET 1).

MDCK-MDR1 p95 MET-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,79	3,28	3,54	2,18	1,99	2,28
60	8,68	8,15	8,50	5,50	4,55	5,79
90	11,89	11,93	13,17	8,33	7,24	8,97
120	15,34	15,27	16,36	10,68	9,71	11,96
P (cm/s)	$1,91 \cdot 10^{-05}$	$2,01 \cdot 10^{-05}$	$2,18 \cdot 10^{-05}$	$1,43 \cdot 10^{-05}$	$1,31 \cdot 10^{-05}$	$1,63 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,03 \cdot 10^{-05} \pm 1,34 \cdot 10^{-06}$			$1,45 \cdot 10^{-05} \pm 1,62 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,72						

Tabla IV.164 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p95 (MET 2).

MDCK-MDR1 p95 MET-3 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,39	3,51	3,59	2,08	2,07	2,46
60	9,58	8,65	8,72	5,11	5,11	5,86
90	15,03	12,95	13,63	7,89	8,02	9,62
120	22,08	16,29	17,30	10,72	10,65	12,49
P (cm/s)	$2,96 \cdot 10^{-05}$	$2,15 \cdot 10^{-05}$	$2,32 \cdot 10^{-05}$	$1,45 \cdot 10^{-05}$	$1,45 \cdot 10^{-05}$	$1,71 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,48 \cdot 10^{-05} \pm 4,22 \cdot 10^{-06}$			$1,54 \cdot 10^{-05} \pm 1,51 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,62						

Tabla IV.165 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 p95 (MET 3).

MDCK-MDR1 p95	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P _{BA} /P _{AB}
	P _{AB} (cm/s)	DE	P _{BA} (cm/s)	DE	
MET-1	$2,11 \cdot 10^{-05}$	$1,59 \cdot 10^{-06}$	$1,46 \cdot 10^{-05}$	$5,36 \cdot 10^{-07}$	0,69
MET-2	$2,03 \cdot 10^{-05}$	$1,34 \cdot 10^{-06}$	$1,45 \cdot 10^{-05}$	$1,62 \cdot 10^{-06}$	0,72
MET-3	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$4,22 \cdot 10^{-06}$	$1,54 \cdot 10^{-05}$	$1,51 \cdot 10^{-06}$	0,62

Tabla IV.166 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 p95.

MDCK-MDR1	Permeabilidad (cm/s)		Ratio
	P _{AB} ±DE (cm/s)	P _{BA} ±DE (cm/s)	
MET			
p25	$2,52 \cdot 10^{-05} \pm 1,01 \cdot 10^{-06}$	$2,25 \cdot 10^{-05} \pm 1,10 \cdot 10^{-06}$	0,89
p35	$2,36 \cdot 10^{-05} \pm 4,11 \cdot 10^{-07}$	$1,67 \cdot 10^{-05} \pm 6,58 \cdot 10^{-07}$	0,71
p45	$2,39 \cdot 10^{-05} \pm 1,41 \cdot 10^{-06}$	$1,76 \cdot 10^{-05} \pm 7,33 \cdot 10^{-07}$	0,74
p55	$2,56 \cdot 10^{-05} \pm 1,45 \cdot 10^{-06}$	$2,27 \cdot 10^{-05} \pm 1,47 \cdot 10^{-06}$	0,89
p65	$3,01 \cdot 10^{-05} \pm 8,17 \cdot 10^{-06}$	$2,20 \cdot 10^{-05} \pm 4,24 \cdot 10^{-06}$	0,73
p76	$1,63 \cdot 10^{-05} \pm 8,78 \cdot 10^{-07}$	$1,34 \cdot 10^{-05} \pm 5,75 \cdot 10^{-07}$	0,82
p85	$2,57 \cdot 10^{-05} \pm 8,24 \cdot 10^{-07}$	$1,61 \cdot 10^{-05} \pm 4,13 \cdot 10^{-07}$	0,63
p95	$2,21 \cdot 10^{-05} \pm 2,38 \cdot 10^{-06}$	$1,48 \cdot 10^{-05} \pm 4,47 \cdot 10^{-07}$	0,67

Tabla IV.167 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) de metoprolol 100 µM en monocapas MDCK-MDR1 a los diferentes pases celulares.

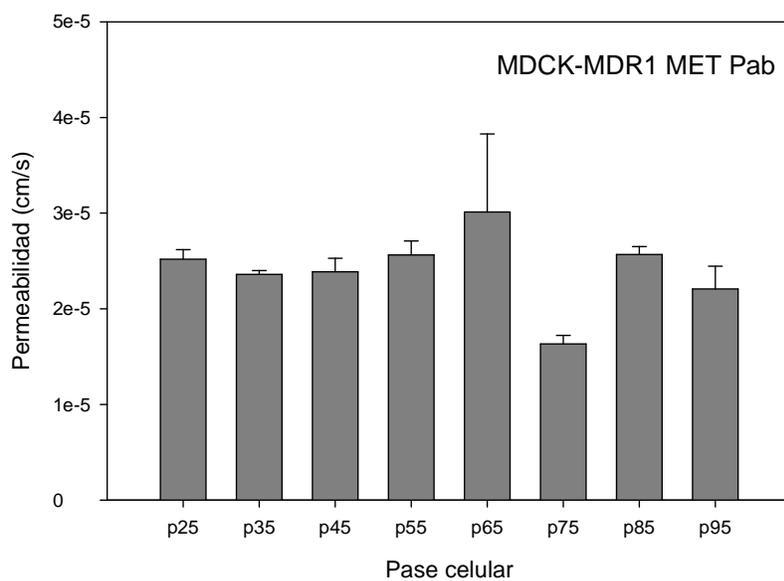


Figura IV.14 Representación gráfica de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 a los diferentes pases celulares.

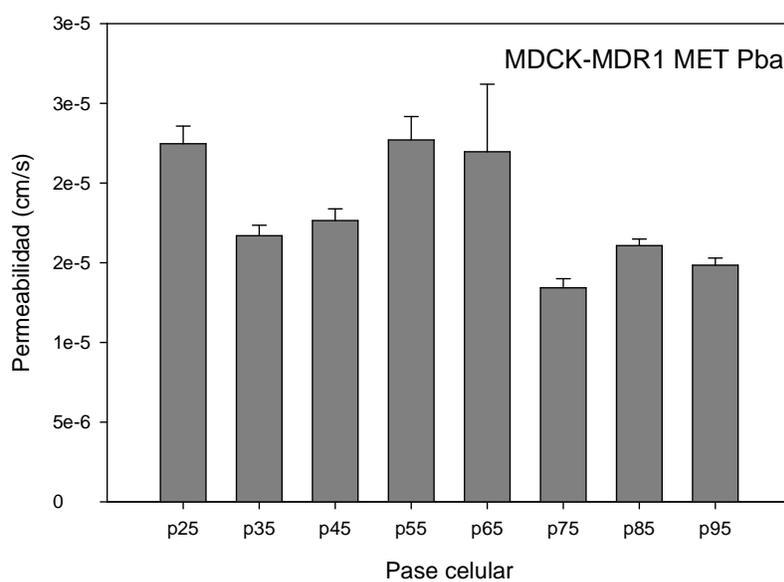


Figura IV.15 Representación gráfica de la Permeabilidad Basolateral-Apical (Pba) de metoprolol 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 a los diferentes pases celulares.

A continuación se detallan los análisis estadísticos de comparación de las permeabilidades obtenidas en las distintas líneas celulares y a los distintos pases.

Fuente de variación		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Pase	Hipótesis	39,423	7	5,632	24,154	0,000
	Error	14,728	63,168	0,233 ^a		
Línea	Hipótesis	18,758	3	6,253	29,295	0,000
	Error	14,243	66,730	0,213 ^b		
Plato (Línea*Pase)	Hipótesis	14,756	63	0,234	4,430	0,000
	Error	24,853	470	0,053 ^c		
Línea *Pase	Hipótesis	94,070	21	4,480	19,225	0,000
	Error	14,724	63,194	0,233 ^d		
Dirección	Hipótesis	0,005	1	0,005	0,095	0,758
	Error	24,853	470	0,053 ^c		
Dirección *Línea	Hipótesis	20,142	3	6,714	126,970	0,000
	Error	24,853	470	0,053 ^c		
TEERratio	Hipótesis	0,031	1	0,031	0,579	0,447
	Error	24,853	470	0,053 ^c		

a. $0,994MS$ (Plato(Línea*Pase)) + $0,006MS$ (Error)

b. $0,885MS$ (Plato(Línea*Pase)) + $0,115MS$ (Error)

c. MS (Error)

d. $0,993MS$ (Plato(Línea*Pase)) + $0,007MS$ (Error)

Tabla IV.168 Resultado del análisis de varianza factorial univariante de los valores de permeabilidad del metoprolol en las diferentes líneas celulares y a los distintos pases.

Pase * Línea * Dirección

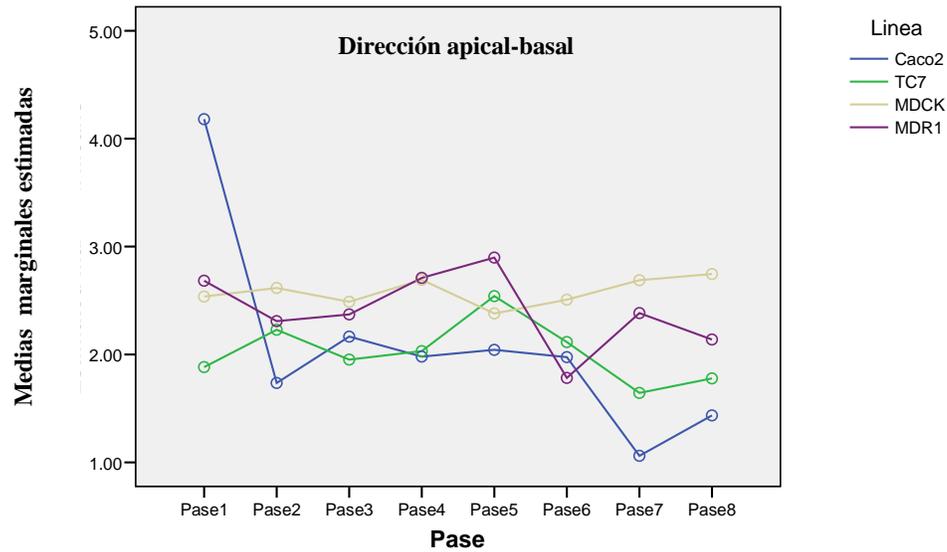


Figura IV.16 Representación gráfica de las medias marginales estimadas de la permeabilidad Apical-Basolateral del metoprolol a los diferentes pases celulares en las distintas líneas celulares.

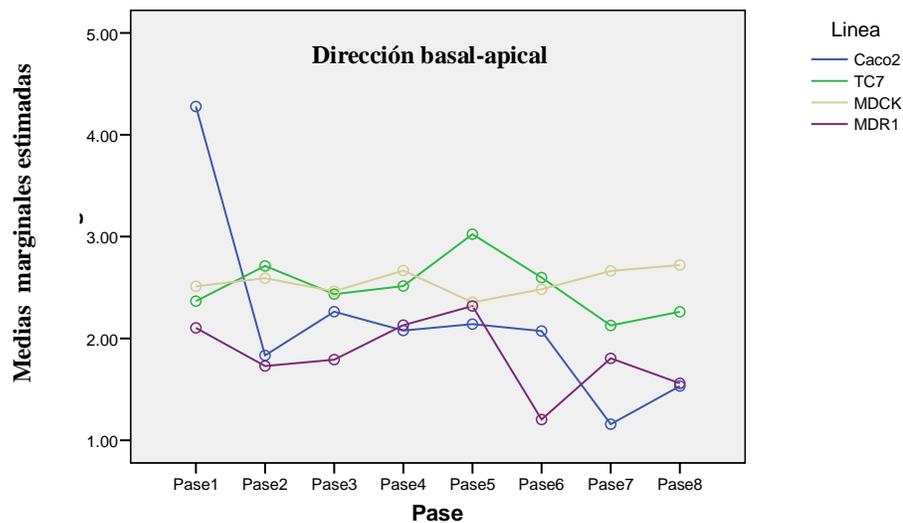


Figura IV.17 Representación gráfica de las medias marginales estimadas de la permeabilidad Basolateral-Apical del metoprolol a los diferentes pases celulares en las distintas líneas celulares.

Pase * Direccion * Linea

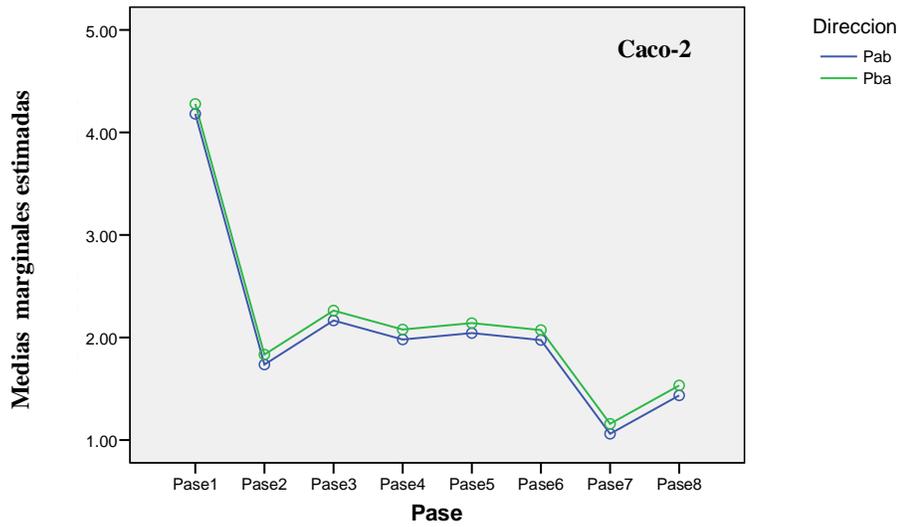


Figura IV.18 Representación gráfica de las medias marginales estimadas de la permeabilidad Apical-Basolateral y la Basolateral-Apical del metoprolol en los diferentes pases celulares en Caco-2.

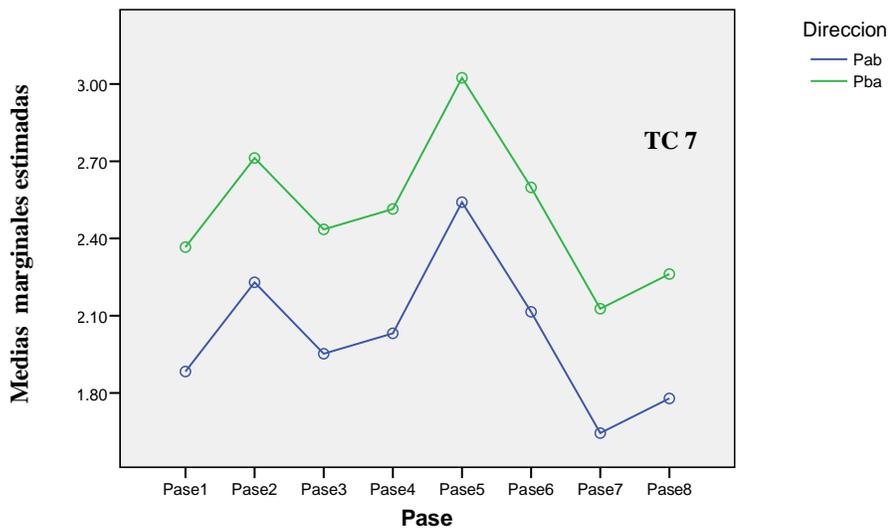


Figura IV.19 Representación gráfica de las medias marginales estimadas de la permeabilidad Apical-Basolateral y la Basolateral-Apical del metoprolol en los diferentes pases celulares en TC7.

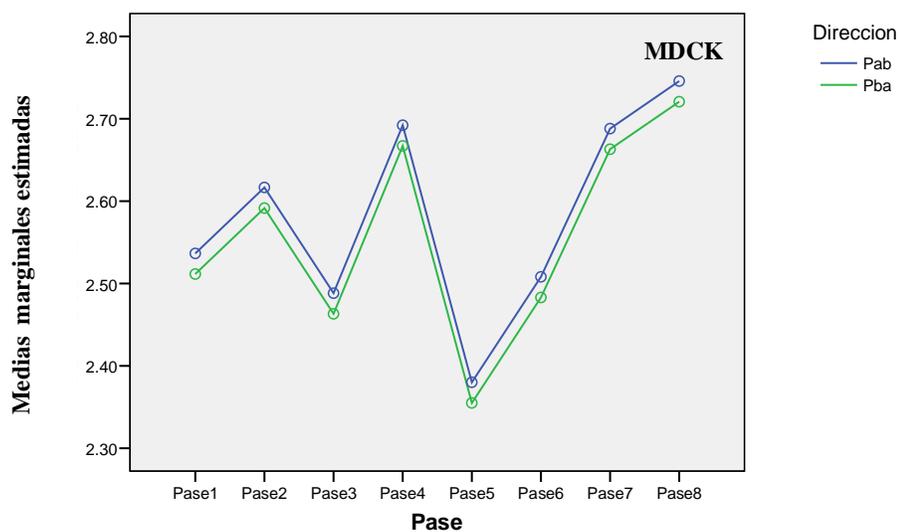


Figura IV.20 Representación gráfica de las medias marginales estimadas de la permeabilidad Apical-Basolateral y la Basolateral-Apical del metoprolol en los diferentes pases celulares en MDCK.

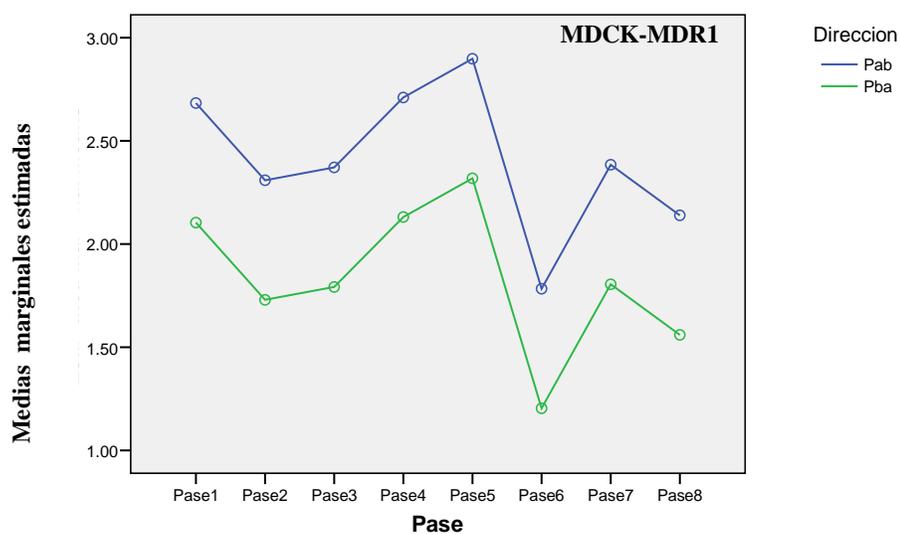


Figura IV.21 Representación gráfica de las medias marginales estimadas de la permeabilidad Apical-Basolateral y la Basolateral-Apical del metoprolol en los diferentes pases celulares en MDCK-MDR1.

Finalmente se calcularon los coeficientes de variación (CV) para cada pase, línea, dirección y plato. Los resultados obtenidos se detallan en las Tablas IV. 169-172.

Pase	Media (cm/s) x 10⁻⁵	DE(cm/s) x 10⁻⁵	CV (%)
1	2,82	0,23	8,16
2	2,24	0,23	10,28
3	2,24	0,23	10,26
4	2,35	0,23	9,78
5	2,46	0,23	9,34
6	2,09	0,23	10,99
7	1,94	0,23	11,85
8	2,02	0,23	11,37

Tabla IV.169 Resultado de los Coeficientes de variación calculados a partir de las permeabilidades del metoprolol 100 μ M obtenidas a los distintos pases ensayados en las 4 líneas celulares.

Línea	Media (cm/s) x 10 ⁻⁵	DE(cm/s) x 10 ⁻⁵	CV (%)
Caco2	2,12	0,24	11,32
TC7	2,26	0,24	10,61
MDCK	2,57	0,24	9,34
MDR1	2,13	0,24	11,29

Tabla IV.170 Resultado de los Coeficientes de variación calculados a partir de las permeabilidades del metoprolol 100 μ M obtenidas en las 4 líneas celulares ensayadas.

Dirección	Media (cm/s) x 10 ⁻⁵	DE(cm/s) x 10 ⁻⁵	CV (%)
Pab	2,27	0,17	7,49
Pba	2,27	0,17	7,49

Tabla IV.171 Resultado de los Coeficientes de variación calculados a partir de las permeabilidades del metoprolol 100 μ M obtenidas en la dirección Apical-Basolateral y la Basolateral-Apical en las 4 líneas celulares ensayadas.

Plato	Media (cm/s) x 10 ⁻⁵	DE(cm/s) x 10 ⁻⁵	CV (%)
Valor Mínimo (plato 2)	4,44	0,23	5,19
Valor Máximo (plato 19)	0,73	0,23	31,51

Tabla IV.172 Resultado de los Coeficientes de variación máximo y mínimo obtenidos a partir de las permeabilidades del metoprolol 100 μ M de cada plato en las 4 líneas celulares ensayadas.

2. Verapamilo

2.1 Estudios en ATCC Caco-2

Caco-2 p38 VER-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	7,18	7,19	7,26	4,81	4,08	4,24
60	12,22	12,28	12,47	10,14	8,78	9,09
90	16,98	17,33	17,26	16,04	13,90	14,56
120	21,02	20,74	20,64	21,20	19,05	19,89
P (cm/s)	$2,34 \cdot 10^{-05}$	$2,31 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$2,78 \cdot 10^{-05}$	$2,53 \cdot 10^{-05}$	$2,65 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,30 \cdot 10^{-05} \pm 3,48 \cdot 10^{-07}$			$2,65 \cdot 10^{-05} \pm 1,28 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 1,15						

Tabla IV.173 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas Caco-2 p38 (VER 1).

Caco-2 p38 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,77	7,10	7,44	4,54	4,36	4,84
60	11,31	11,70	12,76	9,43	9,12	10,46
90	15,70	17,20	18,08	14,23	14,52	15,93
120	19,94	21,69	22,78	19,72	19,74	21,68
P (cm/s)	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$2,49 \cdot 10^{-05}$	$2,59 \cdot 10^{-05}$	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$2,60 \cdot 10^{-05}$	$2,83 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,43 \cdot 10^{-05} \pm 1,94 \cdot 10^{-06}$			$2,66 \cdot 10^{-05} \pm 1,50 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,09$						

Tabla IV.174 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas Caco-2 p38 (VER 2).

Caco-2 p38 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	7,40	7,26	7,12	4,32	4,02	4,33
60	12,58	12,44	12,89	9,39	8,53	9,49
90	18,27	18,15	17,96	14,90	13,93	14,38
120	21,87	22,67	22,74	20,45	19,18	20,26
P (cm/s)	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$2,72 \cdot 10^{-05}$	$2,57 \cdot 10^{-05}$	$2,66 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,58 \cdot 10^{-05} \pm 8,22 \cdot 10^{-07}$			$2,65 \cdot 10^{-05} \pm 7,75 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,03$						

Tabla IV.175 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas Caco-2 p38 (VER 3).

Caco-2 p38	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
VER-1	$2,30 \cdot 10^{-05}$	$3,48 \cdot 10^{-07}$	$2,65 \cdot 10^{-05}$	$1,28 \cdot 10^{-06}$	1,15
VER-2	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$1,94 \cdot 10^{-06}$	$2,66 \cdot 10^{-05}$	$1,50 \cdot 10^{-06}$	1,09
VER-3	$2,58 \cdot 10^{-05}$	$8,22 \cdot 10^{-07}$	$2,65 \cdot 10^{-05}$	$7,75 \cdot 10^{-07}$	1,03

Tabla IV.176 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 p38.

Caco-2 p48 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,81	4,77	5,07	3,84	3,74	3,83
60	8,70	9,38	9,88	9,22	8,51	9,10
90	13,12	12,45	13,99	33,59	34,27	35,53
120	16,91	15,75	17,54	31,97	35,15	27,26
P (cm/s)	$2,51 \cdot 10^{-05}$	$1,82 \cdot 10^{-05}$	$2,10 \cdot 10^{-05}$	$5,49 \cdot 10^{-05}$	$6,06 \cdot 10^{-05}$	$4,88 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,14 \cdot 10^{-05} \pm 3,49 \cdot 10^{-06}$			$5,48 \cdot 10^{-05} \pm 5,88 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 2,56$						

Tabla IV.177 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 p48 (VER 1).

Caco-2 p48 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,34	5,19	5,14	3,05	3,88	3,23
60	10,34	9,86	9,50	7,13	8,44	8,06
90	14,40	13,46	13,83	11,16	13,07	12,29
120	18,17	17,14	17,33	15,37	17,78	17,20
P (cm/s)	$2,15 \cdot 10^{-05}$	$1,99 \cdot 10^{-05}$	$2,06 \cdot 10^{-05}$	$2,07 \cdot 10^{-05}$	$2,34 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,07 \cdot 10^{-05} \pm 7,89 \cdot 10^{-07}$			$2,25 \cdot 10^{-05} \pm 1,53 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,09$						

Tabla IV.178 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas Caco-2 p48 (VER 2).

Caco-2 p48 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,84	5,22	4,72	3,40	3,59	2,80
60	9,05	9,86	9,85	8,32	8,81	7,01
90	13,37	14,26	13,55	12,96	13,81	11,58
120	16,63	17,96	17,60	17,21	18,36	15,70
P (cm/s)	$2,00 \cdot 10^{-05}$	$2,15 \cdot 10^{-05}$	$2,14 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$2,49 \cdot 10^{-05}$	$2,18 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,10 \cdot 10^{-05} \pm 8,15 \cdot 10^{-07}$			$2,33 \cdot 10^{-05} \pm 1,53 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,11$						

Tabla IV.179 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas Caco-2 p48 (VER 3).

Caco-2 p48	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
VER-1	$2,14 \cdot 10^{-05}$	$3,49 \cdot 10^{-06}$	$5,48 \cdot 10^{-05}$	$5,88 \cdot 10^{-06}$	2,56
VER-2	$2,07 \cdot 10^{-05}$	$7,89 \cdot 10^{-07}$	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$1,53 \cdot 10^{-06}$	1,09
VER-3	$2,10 \cdot 10^{-05}$	$8,15 \cdot 10^{-07}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$1,53 \cdot 10^{-06}$	1,11

Tabla IV.180 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 p48.

Caco-2 p58 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,17	4,24	3,49	2,66	3,17	2,95
60	7,50	8,28	6,60	6,91	7,79	7,69
90	11,41	12,58	10,32	10,43	13,15	12,81
120	14,86	16,06	13,45	15,90	18,19	17,90
P (cm/s)	$1,82 \cdot 10^{-05}$	$2,01 \cdot 10^{-05}$	$1,70 \cdot 10^{-05}$	$2,18 \cdot 10^{-05}$	$2,55 \cdot 10^{-05}$	$2,52 \cdot 10^{-05}$
$P \pm DE$ (cm/s)	$1,84 \cdot 10^{-05} \pm 1,56 \cdot 10^{-06}$			$2,42 \cdot 10^{-05} \pm 2,04 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,31$						

Tabla IV.181 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 p58 (VER 1).

Caco-2 p58 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,86	3,53	3,67	2,49	2,92	2,46
60	7,93	7,65	7,79	6,24	6,81	6,34
90	12,75	11,19	11,85	11,42	11,56	9,90
120	16,38	14,32	15,43	15,69	16,39	14,67
P (cm/s)	$2,14 \cdot 10^{-05}$	$1,81 \cdot 10^{-05}$	$1,99 \cdot 10^{-05}$	$2,26 \cdot 10^{-05}$	$2,28 \cdot 10^{-05}$	$2,03 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,98 \cdot 10^{-05} \pm 1,63 \cdot 10^{-06}$			$2,19 \cdot 10^{-05} \pm 1,39 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,11$						

Tabla IV.182 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas Caco-2 p58 (VER 2).

Caco-2 p58 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	7,04	4,34	4,23	3,10	3,08	3,47
60	12,53	8,56	9,10	8,25	8,23	8,39
90	17,99	12,73	13,24	13,34	12,48	13,08
120	23,06	17,02	17,32	18,63	17,34	17,92
P (cm/s)	$2,70 \cdot 10^{-05}$	$2,13 \cdot 10^{-05}$	$2,19 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,34 \cdot 10^{-05} \pm 3,14 \cdot 10^{-06}$			$2,47 \cdot 10^{-05} \pm 1,24 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,06$						

Tabla IV.183 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas Caco-2 p58 (VER 3).

Caco-2 p58	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$1,84 \cdot 10^{-05}$	$1,56 \cdot 10^{-06}$	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$2,04 \cdot 10^{-06}$	1,31
VER-2	$1,98 \cdot 10^{-05}$	$1,63 \cdot 10^{-06}$	$2,19 \cdot 10^{-05}$	$1,39 \cdot 10^{-06}$	1,11
VER-3	$2,34 \cdot 10^{-05}$	$3,14 \cdot 10^{-06}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$1,24 \cdot 10^{-06}$	1,06

Tabla IV.184 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 p58.

Caco-2 p68 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,61	3,94	4,11	2,54	2,70	2,74
60	7,47	7,93	7,93	6,06	6,33	6,32
90	11,50	12,01	12,10	10,01	10,41	10,92
120	14,25	14,98	15,61	14,29	14,60	14,94
P (cm/s)	$1,82 \cdot 10^{-05}$	$1,88 \cdot 10^{-05}$	$1,95 \cdot 10^{-05}$	$1,98 \cdot 10^{-05}$	$2,01 \cdot 10^{-05}$	$2,08 \cdot 10^{-05}$
$P \pm DE$ (cm/s)	$1,88 \cdot 10^{-05} \pm 6,86 \cdot 10^{-07}$			$2,02 \cdot 10^{-05} \pm 5,18 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,08$						

Tabla IV.185 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 p68 (VER 1).

Caco-2 p68 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,70	3,99	3,75	2,68	2,56	2,61
60	7,63	8,14	7,74	6,63	6,56	6,69
90	11,44	12,13	11,16	10,56	10,66	11,00
120	14,48	15,84	14,54	14,82	14,71	15,35
P (cm/s)	$1,83 \cdot 10^{-05}$	$2,00 \cdot 10^{-05}$	$1,81 \cdot 10^{-05}$	$2,04 \cdot 10^{-05}$	$2,05 \cdot 10^{-05}$	$2,15 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,88 \cdot 10^{-05} \pm 1,05 \cdot 10^{-06}$			$2,08 \cdot 10^{-05} \pm 6,11 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,11						

Tabla IV.186 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas Caco-2 p68 (VER 2).

Caco-2 p68 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,64	3,78	4,08	2,80	2,81	2,75
60	7,34	7,80	8,91	6,85	6,95	6,86
90	11,20	11,41	12,86	11,35	11,68	11,47
120	14,11	14,67	15,59	15,71	15,63	15,77
P (cm/s)	$1,78 \cdot 10^{-05}$	$1,83 \cdot 10^{-05}$	$1,94 \cdot 10^{-05}$	$2,18 \cdot 10^{-05}$	$2,18 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,85 \cdot 10^{-05} \pm 8,33 \cdot 10^{-07}$			$2,19 \cdot 10^{-05} \pm 1,28 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,18						

Tabla IV.187 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas Caco-2 p68 (VER 3).

Caco-2 p68	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$1,88 \cdot 10^{-05}$	$6,86 \cdot 10^{-07}$	$2,02 \cdot 10^{-05}$	$5,18 \cdot 10^{-07}$	1,08
VER-2	$1,88 \cdot 10^{-05}$	$1,05 \cdot 10^{-06}$	$2,08 \cdot 10^{-05}$	$6,11 \cdot 10^{-07}$	1,11
VER-3	$1,85 \cdot 10^{-05}$	$8,33 \cdot 10^{-07}$	$2,19 \cdot 10^{-05}$	$1,28 \cdot 10^{-07}$	1,18

Tabla IV.188 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 p68.

Caco-2 p78 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,68	4,37	4,30	2,74	3,58	3,12
60	9,11	8,40	8,13	6,86	7,35	7,15
90	12,42	12,17	12,48	11,08	12,39	12,05
120	16,31	15,65	15,54	15,68	16,77	16,40
P (cm/s)	$1,93 \cdot 10^{-05}$	$1,90 \cdot 10^{-05}$	$1,92 \cdot 10^{-05}$	$2,17 \cdot 10^{-05}$	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$2,26 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,92 \cdot 10^{-05} \pm 1,62 \cdot 10^{-07}$			$2,23 \cdot 10^{-05} \pm 4,82 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,16$						

Tabla IV.189 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 p78 (VER 1).

Caco-2 p78 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,24	4,11	3,86	2,51	2,90	2,47
60	7,80	7,91	7,74	6,41	7,26	6,35
90	11,51	11,29	11,02	10,62	12,09	10,46
120	14,35	14,57	16,64	15,40	17,05	14,77
P (cm/s)	$1,72 \cdot 10^{-05}$	$1,76 \cdot 10^{-05}$	$2,10 \cdot 10^{-05}$	$2,16 \cdot 10^{-05}$	$2,39 \cdot 10^{-05}$	$2,07 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,86 \cdot 10^{-05} \pm 2,11 \cdot 10^{-06}$			$2,21 \cdot 10^{-05} \pm 1,62 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,19						

Tabla IV.190 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas Caco-2 p78 (VER 2).

Caco-2 p78 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,32	4,47	4,61	2,93	2,73	3,25
60	8,02	8,36	8,73	6,74	6,74	7,56
90	11,93	12,23	12,20	11,49	11,32	11,93
120	15,11	15,06	16,47	15,75	15,74	16,31
P (cm/s)	$1,83 \cdot 10^{-05}$	$1,80 \cdot 10^{-05}$	$1,97 \cdot 10^{-05}$	$2,18 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,87 \cdot 10^{-05} \pm 9,16 \cdot 10^{-07}$			$2,20 \cdot 10^{-05} \pm 1,16 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,18						

Tabla IV.191 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas Caco-2 p78 (VER 3).

Caco-2 p78	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$1,92 \cdot 10^{-05}$	$1,62 \cdot 10^{-07}$	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$4,82 \cdot 10^{-07}$	1,16
VER-2	$1,86 \cdot 10^{-05}$	$2,11 \cdot 10^{-06}$	$2,21 \cdot 10^{-05}$	$1,62 \cdot 10^{-06}$	1,19
VER-3	$1,87 \cdot 10^{-05}$	$9,16 \cdot 10^{-07}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$1,16 \cdot 10^{-07}$	1,18

Tabla IV.192 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo $100 \mu\text{M}$ en monocapas Caco-2 p78.

Caco-2 p88 VER-1 $100 \mu\text{M}$						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,08	4,71	4,92	4,33	3,72	3,89
60	9,72	9,29	10,08	10,35	8,80	9,67
90	13,72	13,09	13,89	15,66	13,55	14,51
120	17,92	16,68	17,73	20,82	18,37	19,43
P (cm/s)	$2,15 \cdot 10^{-05}$	$2,01 \cdot 10^{-05}$	$2,13 \cdot 10^{-05}$	$2,77 \cdot 10^{-05}$	$2,46 \cdot 10^{-05}$	$2,60 \cdot 10^{-05}$
$P \pm \text{DE}$ (cm/s)	$2,10 \cdot 10^{-05} \pm 7,79 \cdot 10^{-07}$			$2,61 \cdot 10^{-05} \pm 1,54 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,25$						

Tabla IV.193 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo $100 \mu\text{M}$ en monocapas Caco-2 p88 (VER 1).

Caco-2 p88 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,29	4,23	4,23	3,98	4,15	4,25
60	8,62	8,27	8,71	10,47	9,20	9,25
90	12,41	11,64	12,17	15,61	14,23	14,32
120	15,68	14,95	15,77	20,51	18,95	18,81
P (cm/s)	$1,92 \cdot 10^{-05}$	$1,79 \cdot 10^{-05}$	$1,92 \cdot 10^{-05}$	$2,76 \cdot 10^{-05}$	$2,50 \cdot 10^{-05}$	$2,46 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,88 \cdot 10^{-05} \pm 7,27 \cdot 10^{-07}$			$2,57 \cdot 10^{-05} \pm 1,64 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,37$						

Tabla IV.194 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas Caco-2 p88 (VER 2).

Caco-2 p88 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,81	4,44	5,00	3,53	4,03	3,90
60	10,73	8,69	9,90	7,67	8,39	8,75
90	13,70	12,57	14,31	11,97	13,68	13,64
120	17,45	15,99	17,48	16,27	18,59	17,91
P (cm/s)	$2,07 \cdot 10^{-05}$	$1,95 \cdot 10^{-05}$	$2,11 \cdot 10^{-05}$	$2,15 \cdot 10^{-05}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,04 \cdot 10^{-05} \pm 8,64 \cdot 10^{-07}$			$2,33 \cdot 10^{-05} \pm 1,67 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,14$						

Tabla IV.195 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas Caco-2 p88 (VER 3).

Caco-2 p88	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$2,10 \cdot 10^{-05}$	$7,79 \cdot 10^{-07}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$1,54 \cdot 10^{-06}$	1,25
VER-2	$1,88 \cdot 10^{-05}$	$7,27 \cdot 10^{-07}$	$2,57 \cdot 10^{-05}$	$1,64 \cdot 10^{-06}$	1,37
VER-3	$2,04 \cdot 10^{-05}$	$8,64 \cdot 10^{-07}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$1,67 \cdot 10^{-06}$	1,14

Tabla IV.196 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 p88.

Caco-2 p98 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,11	5,52	4,21	3,42	3,63	4,98
60	9,66	10,34	7,54	6,68	7,38	8,29
90	13,71	14,27	10,56	10,29	11,36	17,13
120	17,89	18,75	14,28	14,44	15,87	22,89
P (cm/s)	$2,14 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$1,68 \cdot 10^{-05}$	$1,85 \cdot 10^{-05}$	$2,05 \cdot 10^{-05}$	$3,16 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,01 \cdot 10^{-05} \pm 2,86 \cdot 10^{-06}$			$2,36 \cdot 10^{-05} \pm 7,04 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,17$						

Tabla IV.197 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 p98 (VER 1).

Caco-2 p98 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,62	3,58	3,61	2,71	3,04	3,02
60	6,45	6,14	6,29	5,98	6,68	6,77
90	8,76	8,44	8,95	9,25	9,62	10,42
120	11,50	11,32	12,47	12,68	12,95	14,60
P (cm/s)	$1,31 \cdot 10^{-05}$	$1,29 \cdot 10^{-05}$	$1,48 \cdot 10^{-05}$	$1,68 \cdot 10^{-05}$	$1,65 \cdot 10^{-05}$	$1,94 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,36 \cdot 10^{-05} \pm 1,03 \cdot 10^{-06}$			$1,75 \cdot 10^{-05} \pm 1,60 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,29$						

Tabla IV.198 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas Caco-2 p98 (VER 2).

Caco-2 p98 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,86	3,91	6,87	3,17	3,10	3,94
60	7,51	6,87	13,52	6,78	6,86	8,51
90	10,86	9,57	20,23	10,19	10,44	12,31
120	14,75	12,76	26,51	13,89	14,37	18,07
P (cm/s)	$1,82 \cdot 10^{-05}$	$1,48 \cdot 10^{-05}$	$3,31 \cdot 10^{-05}$	$1,80 \cdot 10^{-05}$	$1,89 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,20 \cdot 10^{-05} \pm 9,77 \cdot 10^{-06}$			$2,01 \cdot 10^{-05} \pm 2,86 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,91$						

Tabla IV.199 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas Caco-2 p98 (VER 3).

Caco-2 p98	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$2,01 \cdot 10^{-05}$	$2,86 \cdot 10^{-06}$	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$7,04 \cdot 10^{-06}$	1,17
VER-2	$1,36 \cdot 10^{-05}$	$1,03 \cdot 10^{-06}$	$1,75 \cdot 10^{-05}$	$1,60 \cdot 10^{-06}$	1,29
VER-3	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$9,77 \cdot 10^{-06}$	$2,01 \cdot 10^{-05}$	$2,86 \cdot 10^{-06}$	0,91

Tabla IV.200 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 p98.

Caco-2 p108 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,88	1,73	1,81	2,16	2,15	2,15
60	3,03	2,85	2,84	4,21	3,96	3,99
90	3,99	3,13	3,79	5,88	5,50	5,48
120	5,20	5,04	5,14	7,52	7,28	7,10
P (cm/s)	$5,51 \cdot 10^{-06}$	$5,15 \cdot 10^{-06}$	$5,52 \cdot 10^{-06}$	$8,95 \cdot 10^{-06}$	$8,56 \cdot 10^{-06}$	$8,26 \cdot 10^{-06}$
$P \pm DE$ (cm/s)	$5,40 \cdot 10^{-06} \pm 2,11 \cdot 10^{-07}$			$8,59 \cdot 10^{-06} \pm 3,47 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,59$						

Tabla IV.201 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 p108 (VER 1).

Caco-2 p108 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,71	1,71	1,60	1,87	1,90	1,68
60	2,72	2,78	2,89	4,04	4,12	3,65
90	3,62	3,91	3,64	5,91	5,74	5,20
120	4,82	5,03	4,80	7,75	7,68	7,05
P (cm/s)	$5,17 \cdot 10^{-06}$	$5,60 \cdot 10^{-06}$	$5,23 \cdot 10^{-06}$	$9,87 \cdot 10^{-06}$	$9,58 \cdot 10^{-06}$	$8,92 \cdot 10^{-06}$
P\pmDE (cm/s)	$5,34 \cdot 10^{-06} \pm 2,35 \cdot 10^{-07}$			$9,45 \cdot 10^{-06} \pm 4,86 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,77						

Tabla IV.202 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas Caco-2 p108 (VER 2).

Caco-2 p108 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	1,76	1,72	1,65	2,11	2,11	2,51
60	2,97	2,99	2,69	4,38	4,43	4,85
90	4,18	3,85	3,70	6,13	6,13	6,58
120	5,33	5,33	4,68	7,83	8,03	8,71
P (cm/s)	$6,02 \cdot 10^{-06}$	$5,90 \cdot 10^{-06}$	$5,10 \cdot 10^{-06}$	$9,56 \cdot 10^{-06}$	$9,82 \cdot 10^{-06}$	$1,03 \cdot 10^{-06}$
P\pmDE (cm/s)	$5,67 \cdot 10^{-06} \pm 4,99 \cdot 10^{-07}$			$9,88 \cdot 10^{-06} \pm 3,56 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,74						

Tabla IV.203 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas Caco-2 p108 (VER 3).

Caco-2 p108	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
VER-1	$5,40 \cdot 10^{-06}$	$2,11 \cdot 10^{-07}$	$8,59 \cdot 10^{-06}$	$3,47 \cdot 10^{-07}$	1,59
VER-2	$5,34 \cdot 10^{-06}$	$2,35 \cdot 10^{-07}$	$9,45 \cdot 10^{-06}$	$4,86 \cdot 10^{-07}$	1,77
VER-3	$5,67 \cdot 10^{-06}$	$4,99 \cdot 10^{-07}$	$9,88 \cdot 10^{-06}$	$3,56 \cdot 10^{-07}$	1,74

Tabla IV.204 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{AB}) y Basolateral-Apical (P_{BA}) de verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 p108.

Caco-2	Permeabilidad (cm/s)		
VER	$P_{AB} \pm DE$ (cm/s)	$P_{BA} \pm DE$ (cm/s)	Ratio
p38	$2,44 \cdot 10^{-05} \pm 1,36 \cdot 10^{-06}$	$2,65 \cdot 10^{-05} \pm 3,94 \cdot 10^{-08}$	1,09
p48	$2,10 \cdot 10^{-05} \pm 3,71 \cdot 10^{-07}$	$3,35 \cdot 10^{-05} \pm 1,84 \cdot 10^{-05}$	1,59
p58	$2,05 \cdot 10^{-05} \pm 2,59 \cdot 10^{-06}$	$2,36 \cdot 10^{-05} \pm 1,49 \cdot 10^{-06}$	1,15
p68	$1,87 \cdot 10^{-05} \pm 1,57 \cdot 10^{-07}$	$2,10 \cdot 10^{-05} \pm 8,49 \cdot 10^{-07}$	1,12
p78	$1,88 \cdot 10^{-05} \pm 3,12 \cdot 10^{-07}$	$2,21 \cdot 10^{-05} \pm 1,72 \cdot 10^{-07}$	1,18
p88	$2,01 \cdot 10^{-05} \pm 1,13 \cdot 10^{-06}$	$2,50 \cdot 10^{-05} \pm 1,52 \cdot 10^{-06}$	1,25
p98	$1,86 \cdot 10^{-05} \pm 4,42 \cdot 10^{-06}$	$2,04 \cdot 10^{-05} \pm 3,02 \cdot 10^{-06}$	1,10
p108	$5,47 \cdot 10^{-06} \pm 1,81 \cdot 10^{-07}$	$9,31 \cdot 10^{-06} \pm 6,58 \cdot 10^{-07}$	1,70

Tabla IV.205 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{AB}) y Basolateral-Apical (P_{BA}) de verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 a los diferentes pases celulares.

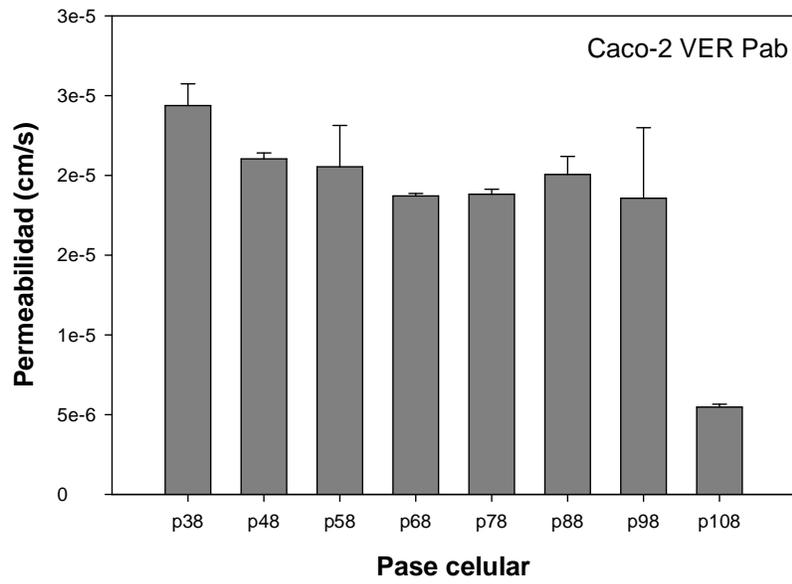


Figura IV.22 Representación gráfica de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) de verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 a los diferentes pases celulares.

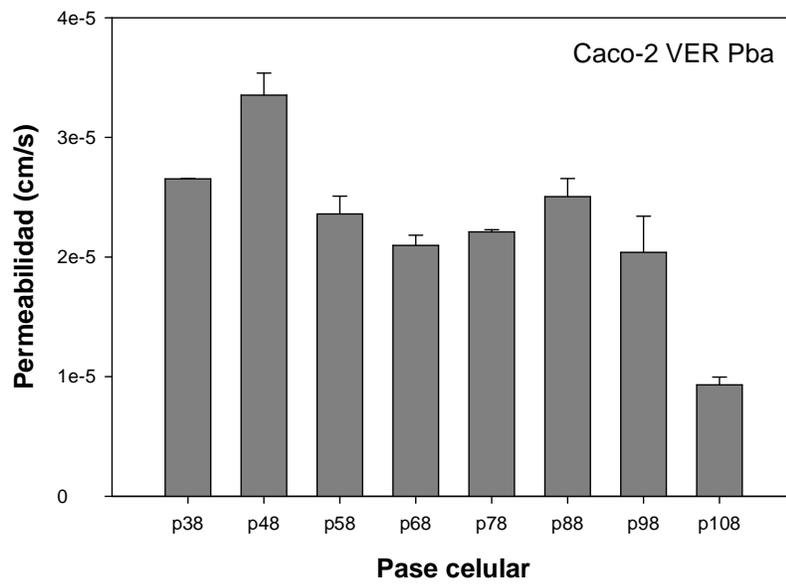


Figura IV.23 Representación gráfica de la Permeabilidad Basolateral-Apical (Pba) de verapamilo 100 μ M en monocapas Caco-2 a los diferentes pases celulares.

2.2 Estudios en TC7

TC7 p85 VER-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,89	3,81	3,95	3,43	2,57	3,46
60	8,03	7,95	8,39	8,47	7,25	8,47
90	11,54	11,40	12,07	13,67	11,17	13,14
120	15,17	14,93	15,93	19,47	16,03	18,76
P (cm/s)	$1,89 \cdot 10^{-05}$	$1,86 \cdot 10^{-05}$	$2,00 \cdot 10^{-05}$	$2,69 \cdot 10^{-05}$	$2,24 \cdot 10^{-05}$	$2,55 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,91 \cdot 10^{-05} \pm 7,54 \cdot 10^{-07}$			$2,49 \cdot 10^{-05} \pm 2,33 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 1,30						

Tabla IV.206 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo $100\mu\text{M}$ en monocapas TC7 p85 (VER 1).

TC7 p85 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,17	4,15	4,71	3,04	3,13	3,54
60	7,70	8,54	9,08	7,70	7,88	8,50
90	11,17	12,64	12,88	11,50	13,47	14,12
120	14,50	16,03	16,80	16,53	18,39	18,61
P (cm/s)	$1,74 \cdot 10^{-05}$	$2,01 \cdot 10^{-05}$	$2,02 \cdot 10^{-05}$	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$2,59 \cdot 10^{-05}$	$2,57 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,92 \cdot 10^{-05} \pm 1,59 \cdot 10^{-06}$			$2,47 \cdot 10^{-05} \pm 2,00 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,28						

Tabla IV.207 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas TC7 p85 (VER 2).

TC7 p85 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,28	4,38	4,22	3,66	3,38	3,57
60	8,58	9,02	9,01	10,40	8,68	8,31
90	12,59	13,70	13,87	15,19	13,82	13,65
120	16,06	17,34	17,56	20,47	19,73	18,78
P (cm/s)	$1,99 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$2,79 \cdot 10^{-05}$	$2,74 \cdot 10^{-05}$	$2,57 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,15 \cdot 10^{-05} \pm 1,46 \cdot 10^{-06}$			$2,70 \cdot 10^{-05} \pm 1,12 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,26						

Tabla IV.208 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas TC7 p85 (VER 3).

TC7 p85	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$1,91 \cdot 10^{-05}$	$7,54 \cdot 10^{-07}$	$2,49 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-06}$	1,30
VER-2	$1,92 \cdot 10^{-05}$	$1,59 \cdot 10^{-06}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$2,00 \cdot 10^{-06}$	1,28
VER-3	$2,15 \cdot 10^{-05}$	$1,46 \cdot 10^{-06}$	$2,70 \cdot 10^{-05}$	$1,12 \cdot 10^{-06}$	1,26

Tabla IV.209 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p85.

TC7 p95 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,88	2,76	2,99	2,78	3,10	2,87
60	6,37	6,45	7,14	7,38	7,58	7,59
90	10,01	10,33	12,18	12,49	13,18	13,05
120	12,69	13,50	15,15	17,14	17,53	17,75
P (cm/s)	$1,67 \cdot 10^{-05}$	$1,82 \cdot 10^{-05}$	$2,10 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$2,53 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,86 \cdot 10^{-05} \pm 2,16 \cdot 10^{-06}$			$2,48 \cdot 10^{-05} \pm 4,87 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,33$						

Tabla IV.210 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p95 (VER 1).

TC7 p95 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,68	2,84	3,10	2,70	2,87	2,84
60	6,28	6,91	6,69	6,79	7,48	7,63
90	10,26	11,07	10,91	11,93	12,42	13,22
120	13,17	14,07	13,99	16,62	16,67	17,87
P (cm/s)	$1,79 \cdot 10^{-05}$	$1,91 \cdot 10^{-05}$	$1,86 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,34 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,86 \cdot 10^{-05} \pm 6,11 \cdot 10^{-07}$			$2,42 \cdot 10^{-05} \pm 1,19 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,31						

Tabla IV.211 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas TC7 p95 (VER 2).

TC7 p95 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,35	3,20	2,94	2,81	2,59	3,26
60	7,24	7,55	6,92	8,08	7,27	7,36
90	11,07	11,76	10,49	12,86	12,54	12,22
120	14,22	14,58	13,52	18,19	18,01	18,53
P (cm/s)	$1,84 \cdot 10^{-05}$	$1,94 \cdot 10^{-05}$	$1,78 \cdot 10^{-05}$	$2,57 \cdot 10^{-05}$	$2,60 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,85 \cdot 10^{-05} \pm 7,76 \cdot 10^{-07}$			$2,58 \cdot 10^{-05} \pm 2,29 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,39						

Tabla IV.212 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas TC7 p95 (VER 3).

TC7 p95	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$1,86 \cdot 10^{-05}$	$2,16 \cdot 10^{-06}$	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$4,87 \cdot 10^{-07}$	1,33
VER-2	$1,86 \cdot 10^{-05}$	$6,11 \cdot 10^{-07}$	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$1,19 \cdot 10^{-06}$	1,31
VER-3	$1,85 \cdot 10^{-05}$	$7,76 \cdot 10^{-07}$	$2,58 \cdot 10^{-05}$	$2,29 \cdot 10^{-07}$	1,39

Tabla IV.213 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p95.

TC7 p105 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,88	7,61	7,20	5,24	5,29	5,29
60	13,79	15,53	15,24	12,56	12,51	12,80
90	19,80	21,83	21,94	20,99	20,71	20,86
120	26,09	27,67	29,19	29,55	29,03	30,04
P (cm/s)	$3,21 \cdot 10^{-05}$	$3,36 \cdot 10^{-05}$	$3,67 \cdot 10^{-05}$	$4,11 \cdot 10^{-05}$	$4,01 \cdot 10^{-05}$	$4,16 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$3,41 \cdot 10^{-05} \pm 2,34 \cdot 10^{-06}$			$4,09 \cdot 10^{-05} \pm 7,49 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,20$						

Tabla IV.214 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p105 (VER 1).

TC7 p105 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	7,08	6,86	6,87	4,45	4,78	5,43
60	16,14	15,61	14,65	12,98	12,40	13,43
90	22,80	22,76	22,66	20,26	20,13	21,94
120	29,83	27,90	27,94	27,93	28,51	30,11
P (cm/s)	$3,78 \cdot 10^{-05}$	$3,55 \cdot 10^{-05}$	$3,60 \cdot 10^{-05}$	$3,93 \cdot 10^{-05}$	$3,99 \cdot 10^{-05}$	$4,17 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$3,64 \cdot 10^{-05} \pm 1,24 \cdot 10^{-06}$			$4,03 \cdot 10^{-05} \pm 1,27 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,11						

Tabla IV.215 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas TC7 p105 (VER 2).

TC7 p105 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,25	7,09	6,63	5,23	4,11	4,79
60	18,35	15,47	14,00	12,51	11,97	13,22
90	25,19	24,05	21,69	20,61	19,40	21,37
120	30,06	30,32	27,91	28,88	26,65	28,77
P (cm/s)	$3,95 \cdot 10^{-05}$	$3,95 \cdot 10^{-05}$	$3,61 \cdot 10^{-05}$	$3,99 \cdot 10^{-05}$	$3,79 \cdot 10^{-05}$	$4,05 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$3,84 \cdot 10^{-05} \pm 1,97 \cdot 10^{-06}$			$3,94 \cdot 10^{-05} \pm 1,35 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,03						

Tabla IV.116 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas TC7 p105 (VER 3).

TC7 p105	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$3,41 \cdot 10^{-05}$	$2,34 \cdot 10^{-06}$	$4,09 \cdot 10^{-05}$	$7,49 \cdot 10^{-07}$	1,20
VER-2	$3,64 \cdot 10^{-05}$	$1,24 \cdot 10^{-06}$	$4,03 \cdot 10^{-05}$	$1,27 \cdot 10^{-06}$	1,11
VER-3	$3,84 \cdot 10^{-05}$	$1,97 \cdot 10^{-06}$	$3,94 \cdot 10^{-05}$	$1,35 \cdot 10^{-06}$	1,03

Tabla IV.217 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p105.

TC7 p115 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,75	3,66	3,73	3,07	2,89	3,58
60	7,69	7,28	7,52	7,83	6,96	7,77
90	11,38	10,42	11,55	12,19	11,59	13,33
120	14,50	13,95	14,80	16,49	16,03	17,30
P (cm/s)	$1,82 \cdot 10^{-05}$	$1,72 \cdot 10^{-05}$	$1,88 \cdot 10^{-05}$	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$2,36 \cdot 10^{-05}$
$P \pm DE$ (cm/s)	$1,80 \cdot 10^{-05} \pm 8,26 \cdot 10^{-07}$			$2,28 \cdot 10^{-05} \pm 7,17 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,26$						

Tabla IV.218 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p115 (VER 1).

TC7 p115 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,05	2,89	3,79	2,77	3,57	3,63
60	8,38	7,87	7,91	7,15	8,79	7,96
90	11,89	10,78	11,79	12,02	14,23	13,08
120	15,72	15,31	15,05	16,80	18,48	18,69
P (cm/s)	$1,95 \cdot 10^{-05}$	$2,03 \cdot 10^{-05}$	$1,90 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,53 \cdot 10^{-05}$	$2,54 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,96 \cdot 10^{-05} \pm 6,50 \cdot 10^{-07}$			$2,48 \cdot 10^{-05} \pm 9,59 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,27						

Tabla IV.219 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas TC7 p115 (VER 2).

TC7 p115 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,10	5,23	4,15	3,71	3,73	4,02
60	8,90	9,14	7,10	8,79	8,49	8,85
90	12,01	13,09	10,03	13,47	13,70	13,74
120	15,47	16,57	12,96	18,76	19,31	19,19
P (cm/s)	$1,73 \cdot 10^{-05}$	$1,92 \cdot 10^{-05}$	$1,48 \cdot 10^{-05}$	$2,52 \cdot 10^{-05}$	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$2,55 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,71 \cdot 10^{-05} \pm 2,19 \cdot 10^{-06}$			$2,56 \cdot 10^{-05} \pm 5,57 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,50						

Tabla IV.220 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas TC7 p115 (VER 3).

TC7 p115	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$1,80 \cdot 10^{-05}$	$8,26 \cdot 10^{-07}$	$2,28 \cdot 10^{-05}$	$7,17 \cdot 10^{-07}$	1,26
VER-2	$1,96 \cdot 10^{-05}$	$6,50 \cdot 10^{-07}$	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$9,59 \cdot 10^{-07}$	1,27
VER-3	$1,71 \cdot 10^{-05}$	$2,19 \cdot 10^{-06}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$5,57 \cdot 10^{-07}$	1,50

Tabla IV.221 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p115.

TC7 p125 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	8,15	4,43	5,53	3,76	4,19	4,00
60	14,68	8,12	11,17	7,67	9,06	10,12
90	19,88	13,07	16,41	13,45	14,21	16,15
120	24,70	15,89	21,02	17,82	19,37	21,45
P (cm/s)	$2,77 \cdot 10^{-05}$	$1,99 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$2,95 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,46 \cdot 10^{-05} \pm 4,15 \cdot 10^{-06}$			$2,64 \cdot 10^{-05} \pm 2,73 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,08$						

Tabla IV.222 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p125 (VER 1).

TC7 p125 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,19	4,73	4,48	3,80	3,71	4,02
60	9,84	8,85	8,95	9,65	9,10	9,79
90	14,90	13,31	14,09	15,11	15,26	15,89
120	18,82	17,66	16,84	19,58	18,79	21,54
P (cm/s)	$2,32 \cdot 10^{-05}$	$2,18 \cdot 10^{-05}$	$2,13 \cdot 10^{-05}$	$2,67 \cdot 10^{-05}$	$2,60 \cdot 10^{-05}$	$2,96 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,21 \cdot 10^{-05} \pm 9,68 \cdot 10^{-07}$			$2,74 \cdot 10^{-05} \pm 1,95 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,24						

Tabla IV.223 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas TC7 p125 (VER 2).

TC7 p125 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,93	4,88	4,61	3,61	4,12	4,34
60	8,35	9,26	9,23	8,73	9,28	9,93
90	12,68	13,51	13,87	14,77	14,96	16,22
120	15,42	17,96	17,29	19,49	19,85	21,33
P (cm/s)	$1,96 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$2,16 \cdot 10^{-05}$	$2,71 \cdot 10^{-05}$	$2,67 \cdot 10^{-05}$	$2,89 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,10 \cdot 10^{-05} \pm 1,27 \cdot 10^{-06}$			$2,76 \cdot 10^{-05} \pm 1,18 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,31						

Tabla IV.224 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas TC7 p125 (VER 3).

TC7 p125	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$2,46 \cdot 10^{-05}$	$4,15 \cdot 10^{-06}$	$2,64 \cdot 10^{-05}$	$2,73 \cdot 10^{-06}$	1,08
VER-2	$2,21 \cdot 10^{-05}$	$9,68 \cdot 10^{-07}$	$2,74 \cdot 10^{-05}$	$1,95 \cdot 10^{-06}$	1,24
VER-3	$2,10 \cdot 10^{-05}$	$1,27 \cdot 10^{-06}$	$2,76 \cdot 10^{-05}$	$1,18 \cdot 10^{-06}$	1,31

Tabla IV.225 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p125.

TC7 p135 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,62	4,28	3,76	3,05	3,48	3,41
60	6,94	8,07	7,11	7,25	7,15	7,46
90	9,34	11,26	11,10	11,97	14,53	10,94
120	13,08	14,45	13,71	17,94	18,53	16,33
P (cm/s)	$1,55 \cdot 10^{-05}$	$1,70 \cdot 10^{-05}$	$1,71 \cdot 10^{-05}$	$2,49 \cdot 10^{-05}$	$2,65 \cdot 10^{-05}$	$2,13 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,66 \cdot 10^{-05} \pm 8,71 \cdot 10^{-07}$			$2,43 \cdot 10^{-05} \pm 2,66 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,47$						

Tabla IV.226 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p135 (VER 1).

TC7 p135 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,30	3,42	3,81	2,74	3,67	3,42
60	7,16	7,40	8,18	7,03	8,72	8,12
90	10,56	10,92	11,98	14,25	14,20	13,03
120	13,83	13,80	16,08	17,98	19,97	18,83
P (cm/s)	$1,77 \cdot 10^{-05}$	$1,75 \cdot 10^{-05}$	$2,05 \cdot 10^{-05}$	$2,67 \cdot 10^{-05}$	$2,75 \cdot 10^{-05}$	$2,58 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,86 \cdot 10^{-05} \pm 1,69 \cdot 10^{-06}$			$2,67 \cdot 10^{-05} \pm 8,18 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,44						

Tabla IV.227 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas TC7 p135 (VER 2).

TC7 p135 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,61	4,07	3,74	3,48	3,85	3,46
60	7,70	8,43	7,56	7,79	8,94	9,06
90	11,11	12,36	11,16	12,84	14,45	14,67
120	15,09	16,22	13,98	18,56	20,30	21,19
P (cm/s)	$1,91 \cdot 10^{-05}$	$2,04 \cdot 10^{-05}$	$1,73 \cdot 10^{-05}$	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$2,77 \cdot 10^{-05}$	$2,97 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$1,89 \cdot 10^{-05} \pm 1,54 \cdot 10^{-06}$			$2,76 \cdot 10^{-05} \pm 2,15 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,46						

Tabla IV.228 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas TC7 p135 (VER 3).

TC7 p135	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
VER-1	$1,66 \cdot 10^{-05}$	$8,71 \cdot 10^{-07}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$2,66 \cdot 10^{-06}$	1,47
VER-2	$1,86 \cdot 10^{-05}$	$1,69 \cdot 10^{-06}$	$2,67 \cdot 10^{-05}$	$8,18 \cdot 10^{-07}$	1,44
VER-3	$1,89 \cdot 10^{-05}$	$1,54 \cdot 10^{-06}$	$2,76 \cdot 10^{-05}$	$2,15 \cdot 10^{-06}$	1,46

Tabla IV.229 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p135.

TC7 p145 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,04	3,94	3,74	4,02	4,20	3,73
60	7,53	7,27	7,27	7,23	8,20	8,36
90	10,88	10,59	10,17	11,24	12,84	13,20
120	12,36	11,97	11,75	15,45	17,15	17,81
P (cm/s)	$1,43 \cdot 10^{-05}$	$1,38 \cdot 10^{-05}$	$1,36 \cdot 10^{-05}$	$1,93 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$2,38 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,39 \cdot 10^{-05} \pm 3,46 \cdot 10^{-07}$			$2,17 \cdot 10^{-05} \pm 2,24 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,56$						

Tabla IV.230 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p145 (VER 1).

TC7 p145 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,30	6,30	4,71	3,23	3,24	2,77
60	11,23	11,23	9,01	8,16	8,27	7,87
90	15,58	15,58	13,40	13,22	13,66	13,25
120	19,51	19,51	16,63	18,46	19,32	18,24
P (cm/s)	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$2,03 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$2,71 \cdot 10^{-05}$	$2,62 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,16 \cdot 10^{-05} \pm 1,13 \cdot 10^{-06}$			$2,63 \cdot 10^{-05} \pm 7,32 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,22						

Tabla IV.231 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas TC7 p145 (VER 2).

TC7 p145 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,25	4,23	4,34	3,03	3,37	3,58
60	8,38	8,43	8,57	7,66	8,33	8,64
90	12,62	12,62	13,69	12,50	13,87	13,67
120	16,31	15,91	15,70	17,49	19,06	19,45
P (cm/s)	$2,04 \cdot 10^{-05}$	$1,98 \cdot 10^{-05}$	$1,98 \cdot 10^{-05}$	$2,44 \cdot 10^{-05}$	$2,66 \cdot 10^{-05}$	$2,66 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,00 \cdot 10^{-05} \pm 3,54 \cdot 10^{-07}$			$2,58 \cdot 10^{-05} \pm 1,28 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,29						

Tabla IV.232 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas TC7 p145 (VER 3).

TC7 p145	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
VER-1	$1,39 \cdot 10^{-05}$	$3,46 \cdot 10^{-07}$	$2,17 \cdot 10^{-05}$	$2,24 \cdot 10^{-06}$	1,56
VER-2	$2,16 \cdot 10^{-05}$	$1,13 \cdot 10^{-06}$	$2,63 \cdot 10^{-05}$	$7,32 \cdot 10^{-07}$	1,22
VER-3	$2,00 \cdot 10^{-05}$	$3,54 \cdot 10^{-07}$	$2,58 \cdot 10^{-05}$	$1,28 \cdot 10^{-06}$	1,29

Tabla IV.233 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p145.

TC7 p155 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,93	3,88	3,82	3,78	3,64	3,69
60	7,90	8,21	7,71	9,07	9,56	9,43
90	11,35	11,43	11,03	13,99	14,67	14,68
120	14,31	14,42	13,84	19,38	20,31	20,12
P (cm/s)	$1,75 \cdot 10^{-05}$	$1,76 \cdot 10^{-05}$	$1,69 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$2,78 \cdot 10^{-05}$	$2,75 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,73 \cdot 10^{-05} \pm 3,89 \cdot 10^{-07}$			$2,72 \cdot 10^{-05} \pm 9,21 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,57$						

Tabla IV.234 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas TC7 p155 (VER 1).

TC7 p155 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,28	2,83	2,95	3,94	4,25	3,51
60	6,28	6,99	7,41	9,61	9,55	9,51
90	9,88	10,86	11,13	15,07	15,00	14,97
120	12,83	15,16	14,94	21,81	21,01	22,44
P (cm/s)	$1,78 \cdot 10^{-05}$	$2,06 \cdot 10^{-05}$	$2,00 \cdot 10^{-05}$	$2,98 \cdot 10^{-05}$	$2,81 \cdot 10^{-05}$	$3,14 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,95 \cdot 10^{-05} \pm 1,49 \cdot 10^{-06}$			$2,98 \cdot 10^{-05} \pm 1,65 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 1,53						

Tabla IV.235 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas TC7 p155 (VER 2).

TC7 p155 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,86	2,39	2,66	3,10	2,90	3,44
60	7,05	6,02	6,73	8,61	8,04	9,73
90	10,20	9,97	10,45	14,82	13,62	16,71
120	13,38	13,06	13,41	19,50	18,37	22,17
P (cm/s)	$1,75 \cdot 10^{-05}$	$1,82 \cdot 10^{-05}$	$1,82 \cdot 10^{-05}$	$2,80 \cdot 10^{-05}$	$2,63 \cdot 10^{-05}$	$3,19 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,79 \cdot 10^{-05} \pm 3,63 \cdot 10^{-07}$			$2,87 \cdot 10^{-05} \pm 2,89 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 1,60						

Tabla IV.236 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas TC7 p155 (VER 3).

TC7 p155	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P _{AB} (cm/s)	DE	P _{BA} (cm/s)	DE	P _{BA} /P _{AB}
VER-1	1,73·10 ⁻⁰⁵	3,89·10 ⁻⁰⁷	2,72·10 ⁻⁰⁵	9,21·10 ⁻⁰⁷	1,57
VER-2	1,95·10 ⁻⁰⁵	1,49·10 ⁻⁰⁶	2,98·10 ⁻⁰⁵	1,65·10 ⁻⁰⁶	1,53
VER-3	1,79·10 ⁻⁰⁵	3,63·10 ⁻⁰⁷	2,87·10 ⁻⁰⁵	2,89·10 ⁻⁰⁶	1,60

Tabla IV.237 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) de verapamilo 100 µM en monocapas TC7 p155.

TC-7	Permeabilidad (cm/s)		
VER	P _{AB} ± DE (cm/s)	P _{BA} ± DE (cm/s)	Ratio
p85	2,00·10 ⁻⁰⁵ ± 1,34·10 ⁻⁰⁶	2,55·10 ⁻⁰⁵ ± 1,28·10 ⁻⁶	1,28
p95	1,86·10 ⁻⁰⁵ ± 5,70·10 ⁻⁸	2,49·10 ⁻⁰⁵ ± 7,85·10 ⁻⁷	1,34
p105	3,63·10 ⁻⁰⁵ ± 2,13·10 ⁻⁶	4,02·10 ⁻⁰⁵ ± 7,50·10 ⁻⁷	1,11
p115	1,82·10 ⁻⁰⁵ ± 1,26·10 ⁻⁶	2,44·10 ⁻⁰⁵ ± 1,46·10 ⁻⁶	1,34
p125	2,26·10 ⁻⁰⁵ ± 1,80·10 ⁻⁶	2,71·10 ⁻⁰⁵ ± 6,14·10 ⁻⁷	1,20
p135	1,80·10 ⁻⁰⁵ ± 1,28·10 ⁻⁶	2,62·10 ⁻⁰⁵ ± 1,72·10 ⁻⁶	1,45
p145	1,85·10 ⁻⁰⁵ ± 4,05·10 ⁻⁶	2,46·10 ⁻⁰⁵ ± 2,53·10 ⁻⁶	1,33
p155	1,83·10 ⁻⁰⁵ ± 1,13·10 ⁻⁶	2,86·10 ⁻⁰⁵ ± 1,33·10 ⁻⁶	1,57

Tabla IV.238 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) de verapamilo 100 µM en monocapas TC7 a los diferentes pases celulares.

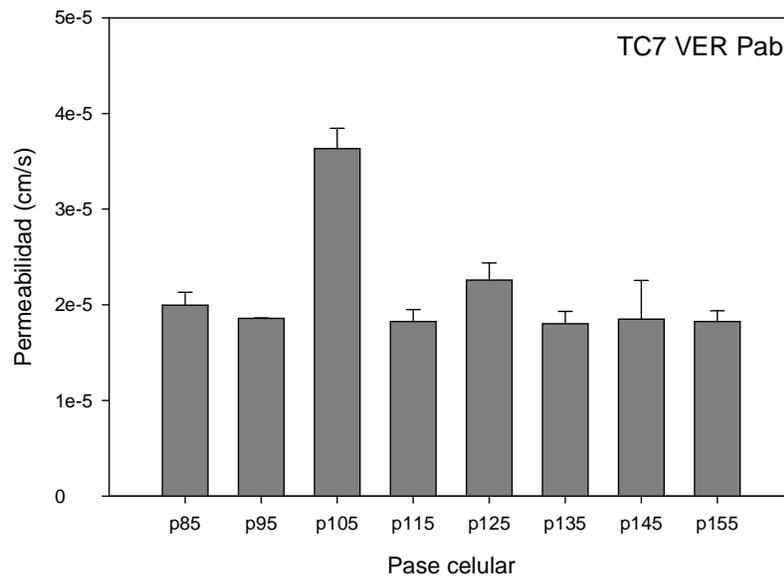


Figura IV.24 Representación gráfica de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) de verapamilo 100 μM en monocapas TC7 a los diferentes pases celulares.

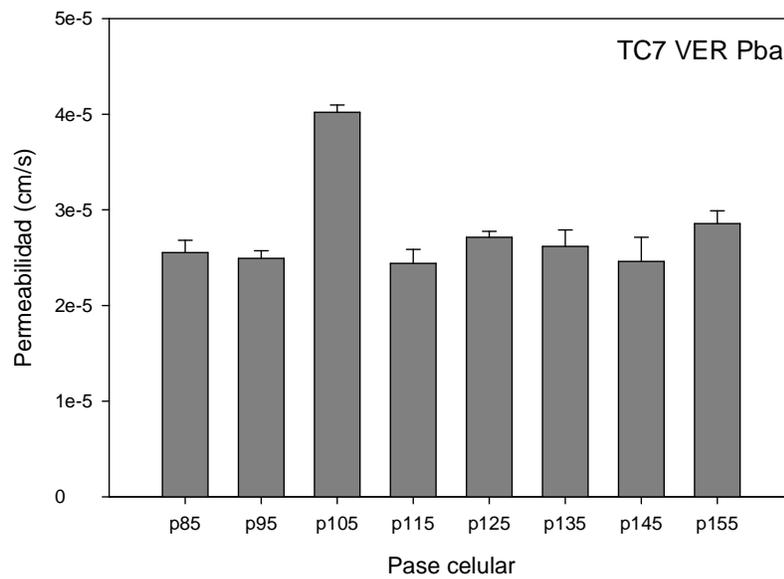


Figura IV.25 Representación gráfica de la Permeabilidad Basolateral-Apica (Pba) de verapamilo 100 μM en monocapas TC7 a los diferentes pases celulares.

2.3 Estudios en MDCK

MDCK p25 VER-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,49	3,72	3,16	4,25	3,87	3,19
60	8,83	8,78	8,00	8,75	9,08	8,69
90	13,56	13,47	13,35	13,72	14,63	13,46
120	17,43	17,78	17,41	18,51	18,91	17,88
P (cm/s)	$2,35 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$2,41 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,38 \cdot 10^{-05} \pm 4,07 \cdot 10^{-07}$			$2,48 \cdot 10^{-05} \pm 7,55 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 1,04						

Tabla IV.239 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo $100\mu\text{M}$ en monocapas MDCK p25 (VER 1).

MDCK p25 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,32	3,68	3,85	3,43	3,50	3,16
60	8,37	8,72	9,38	8,13	8,20	8,15
90	13,55	13,67	13,51	13,23	13,25	12,32
120	17,15	17,32	17,45	17,16	17,65	16,72
P (cm/s)	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$2,32 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$2,34 \cdot 10^{-05}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$	$2,26 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,31 \cdot 10^{-05} \pm 4,41 \cdot 10^{-07}$			$2,33 \cdot 10^{-05} \pm 6,70 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,01						

Tabla IV.240 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas MDCK p25 (VER 2).

MDCK p25 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,47	2,86	3,81	3,14	2,36	2,62
60	8,41	7,87	9,31	7,73	6,98	7,75
90	12,67	12,25	14,12	12,38	11,38	12,39
120	16,01	15,48	17,86	16,65	15,84	17,25
P (cm/s)	$2,12 \cdot 10^{-05}$	$2,13 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$	$2,28 \cdot 10^{-05}$	$2,26 \cdot 10^{-05}$	$2,45 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,21 \cdot 10^{-05} \pm 1,43 \cdot 10^{-06}$			$2,33 \cdot 10^{-05} \pm 1,03 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,06						

Tabla IV.241 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas MDCK p25 (VER 3).

MDCK p25	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$2,38 \cdot 10^{-05}$	$4,07 \cdot 10^{-07}$	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$7,55 \cdot 10^{-07}$	1,04
VER-2	$2,31 \cdot 10^{-05}$	$4,41 \cdot 10^{-07}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$6,70 \cdot 10^{-07}$	1,01
VER-3	$2,21 \cdot 10^{-05}$	$1,43 \cdot 10^{-06}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$1,03 \cdot 10^{-06}$	1,06

Tabla IV.242 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK p25.

MDCK p35 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	9,00	8,98	9,77	7,43	7,40	6,19
60	15,76	14,85	15,95	13,84	13,98	11,88
90	21,66	21,90	21,67	19,23	19,47	17,74
120	26,37	26,44	26,71	24,66	24,78	22,67
P (cm/s)	$2,93 \cdot 10^{-05}$	$3,00 \cdot 10^{-05}$	$2,85 \cdot 10^{-05}$	$2,88 \cdot 10^{-05}$	$2,91 \cdot 10^{-05}$	$2,79 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,93 \cdot 10^{-05} \pm 7,28 \cdot 10^{-07}$			$2,86 \cdot 10^{-05} \pm 6,10 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,98$						

Tabla IV.243 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK p35 (VER 1).

MDCK p35 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	8,77	8,97	8,96	6,51	6,62	7,03
60	14,71	15,37	15,16	12,36	12,48	12,89
90	20,97	21,91	21,55	18,51	18,53	18,66
120	25,98	27,06	26,21	23,60	23,41	24,06
P (cm/s)	$2,92 \cdot 10^{-05}$	$3,07 \cdot 10^{-05}$	$2,94 \cdot 10^{-05}$	$2,90 \cdot 10^{-05}$	$2,85 \cdot 10^{-05}$	$2,87 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,98 \cdot 10^{-05} \pm 8,07 \cdot 10^{-07}$			$2,87 \cdot 10^{-05} \pm 2,51 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 0,97						

Tabla IV.244 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas MDCK p35 (VER 2).

MDCK p35 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,20	5,92	5,75	4,73	4,23	4,33
60	11,43	12,07	11,33	9,49	8,81	9,58
90	16,63	17,08	16,49	14,37	14,06	14,87
120	21,19	21,72	21,50	19,33	19,46	19,72
P (cm/s)	$2,53 \cdot 10^{-05}$	$2,65 \cdot 10^{-05}$	$2,65 \cdot 10^{-05}$	$2,46 \cdot 10^{-05}$	$2,57 \cdot 10^{-05}$	$2,60 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,61 \cdot 10^{-05} \pm 6,64 \cdot 10^{-07}$			$2,54 \cdot 10^{-05} \pm 7,46 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 0,98						

Tabla IV.245 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas MDCK p35 (VER 3).

MDCK p35	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$2,93 \cdot 10^{-05}$	$7,28 \cdot 10^{-07}$	$2,86 \cdot 10^{-05}$	$6,10 \cdot 10^{-07}$	0,98
VER-2	$2,98 \cdot 10^{-05}$	$8,07 \cdot 10^{-07}$	$2,87 \cdot 10^{-05}$	$2,51 \cdot 10^{-07}$	0,97
VER-3	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$6,64 \cdot 10^{-07}$	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$7,46 \cdot 10^{-07}$	0,98

Tabla IV.246 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK p35.

MDCK p45 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,26	5,14	4,07	2,56	3,03	2,52
60	8,04	9,75	8,38	6,39	7,38	6,36
90	7,48	13,39	12,11	10,01	11,62	10,77
120	14,44	17,28	15,96	13,70	15,54	14,43
P (cm/s)	$1,51 \cdot 10^{-05}$	$2,02 \cdot 10^{-05}$	$1,99 \cdot 10^{-05}$	$1,87 \cdot 10^{-05}$	$2,11 \cdot 10^{-05}$	$2,03 \cdot 10^{-05}$
$P \pm DE$ (cm/s)	$1,84 \cdot 10^{-05} \pm 2,85 \cdot 10^{-06}$			$2,00 \cdot 10^{-05} \pm 1,22 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,09$						

Tabla IV.247 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK p45 (VER 1).

MDCK p45 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,63	3,64	4,03	2,27	2,25	2,19
60	7,86	7,74	8,51	5,70	5,90	5,75
90	11,67	11,47	12,59	9,38	10,10	9,83
120	15,09	15,08	16,27	13,14	14,19	13,82
P (cm/s)	$1,93 \cdot 10^{-05}$	$1,92 \cdot 10^{-05}$	$2,06 \cdot 10^{-05}$	$1,83 \cdot 10^{-05}$	$2,02 \cdot 10^{-05}$	$1,97 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,97 \cdot 10^{-05} \pm 7,90 \cdot 10^{-07}$			$1,94 \cdot 10^{-05} \pm 9,78 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 0,99						

Tabla IV.248 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK p45 (VER 2).

MDCK p45 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,70	4,27	4,22	2,97	3,01	2,71
60	9,08	8,84	8,78	7,19	7,49	6,82
90	13,60	13,04	12,88	11,61	12,34	11,72
120	16,90	16,30	16,38	16,21	16,70	16,04
P (cm/s)	$2,08 \cdot 10^{-05}$	$2,03 \cdot 10^{-05}$	$2,05 \cdot 10^{-05}$	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$2,32 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,05 \cdot 10^{-05} \pm 2,14 \cdot 10^{-07}$			$2,27 \cdot 10^{-05} \pm 4,55 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,11						

Tabla IV.249 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK p45 (VER 3).

MDCK p45	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$1,84 \cdot 10^{-05}$	$2,85 \cdot 10^{-06}$	$2,00 \cdot 10^{-05}$	$1,22 \cdot 10^{-06}$	1,09
VER-2	$1,97 \cdot 10^{-05}$	$7,90 \cdot 10^{-07}$	$1,94 \cdot 10^{-05}$	$9,78 \cdot 10^{-07}$	0,99
VER-3	$2,05 \cdot 10^{-05}$	$2,14 \cdot 10^{-07}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$4,55 \cdot 10^{-07}$	1,11

Tabla IV.250 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK p45.

MDCK p55 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,31	6,49	6,57	3,07	3,70	3,10
60	11,79	11,86	11,93	7,89	8,80	7,90
90	16,31	16,35	16,03	12,85	14,26	12,88
120	19,78	20,00	20,16	17,47	19,16	17,45
P (cm/s)	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$2,28 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,27 \cdot 10^{-05} \pm 4,48 \cdot 10^{-08}$			$2,49 \cdot 10^{-05} \pm 1,10 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,10$						

Tabla IV.251 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK p55 (VER 1).

MDCK p55 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,82	5,95	4,78	3,56	3,09	3,07
60	10,55	10,74	9,78	8,55	7,72	7,94
90	14,90	14,96	13,62	13,68	12,38	12,66
120	19,18	19,17	18,01	18,38	17,06	17,65
P (cm/s)	$2,24 \cdot 10^{-05}$	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-05}$	$2,50 \cdot 10^{-05}$	$2,35 \cdot 10^{-05}$	$2,45 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,22 \cdot 10^{-05} \pm 2,30 \cdot 10^{-07}$			$2,43 \cdot 10^{-05} \pm 7,70 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,10						

Tabla IV.252 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas MDCK p55 (VER 2).

MDCK p55 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,39	5,18	5,62	3,09	3,08	3,11
60	9,93	9,69	11,37	7,54	7,70	7,95
90	14,65	13,92	16,00	11,72	11,99	12,91
120	18,68	17,71	20,29	16,32	16,42	17,78
P (cm/s)	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$2,11 \cdot 10^{-05}$	$2,46 \cdot 10^{-05}$	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,27 \cdot 10^{-05} \pm 1,74 \cdot 10^{-06}$			$2,31 \cdot 10^{-05} \pm 1,43 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,02						

Tabla IV.253 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas MDCK p55 (VER 3).

MDCK p55	Transporte AP		Transporte BL		Cociente	
	$P_{AB}(\text{cm/s})$	DE	$P_{BA}(\text{cm/s})$	DE	P_{BA}/P_{AB}	DE
VER-1	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$4,48 \cdot 10^{-08}$	$2,49 \cdot 10^{-05}$	$1,10 \cdot 10^{-06}$	1,10	
VER-2	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$2,30 \cdot 10^{-07}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$7,70 \cdot 10^{-07}$	1,10	
VER-3	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$1,74 \cdot 10^{-06}$	$2,31 \cdot 10^{-05}$	$1,43 \cdot 10^{-06}$	1,02	

Tabla IV.254 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo $100 \mu\text{M}$ en monocapas MDCK p55.

MDCK p65 VER-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,40	6,61	6,48	4,40	4,35	4,33
60	12,05	12,87	11,43	9,00	10,18	10,45
90	17,58	18,58	17,32	14,95	15,88	16,86
120	21,32	23,25	22,29	20,43	21,65	22,30
P (cm/s)	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$2,81 \cdot 10^{-05}$	$2,69 \cdot 10^{-05}$	$2,73 \cdot 10^{-05}$	$2,91 \cdot 10^{-05}$	$3,05 \cdot 10^{-05}$
$P \pm \text{DE}$ (cm/s)	$2,68 \cdot 10^{-05} \pm 1,36 \cdot 10^{-06}$			$2,90 \cdot 10^{-05} \pm 1,59 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,08$						

Tabla IV.255 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo $100 \mu\text{M}$ en monocapas MDCK p65 (VER 1).

MDCK p65 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,51	6,42	7,32	4,84	5,02	4,92
60	12,41	13,38	13,44	10,78	11,00	10,43
90	19,07	18,75	19,55	16,45	16,83	16,55
120	23,18	23,78	24,42	22,40	22,94	22,19
P (cm/s)	$2,86 \cdot 10^{-05}$	$2,90 \cdot 10^{-05}$	$2,90 \cdot 10^{-05}$	$2,95 \cdot 10^{-05}$	$3,01 \cdot 10^{-05}$	$2,93 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,89 \cdot 10^{-05} \pm 2,29 \cdot 10^{-07}$			$2,96 \cdot 10^{-05} \pm 4,36 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,03						

Tabla IV. 256 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK p65 (VER 2).

MDCK p65 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,02	6,01	6,13	3,88	4,15	4,12
60	11,09	12,17	11,68	8,88	9,47	9,59
90	16,26	17,61	17,01	14,19	15,40	15,22
120	20,33	22,59	21,24	19,00	20,47	20,95
P (cm/s)	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$2,79 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$2,77 \cdot 10^{-05}$	$2,83 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,59 \cdot 10^{-05} \pm 1,81 \cdot 10^{-06}$			$2,72 \cdot 10^{-05} \pm 1,44 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,05						

Tabla IV.257 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK p65 (VER 3).

MDCK p65	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$2,68 \cdot 10^{-05}$	$1,36 \cdot 10^{-06}$	$2,90 \cdot 10^{-05}$	$1,59 \cdot 10^{-06}$	1,08
VER-2	$2,89 \cdot 10^{-05}$	$2,29 \cdot 10^{-07}$	$2,96 \cdot 10^{-05}$	$4,36 \cdot 10^{-07}$	1,03
VER-3	$2,59 \cdot 10^{-05}$	$1,81 \cdot 10^{-06}$	$2,72 \cdot 10^{-05}$	$1,44 \cdot 10^{-06}$	1,05

Tabla IV.258 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK p65.

MDCK p75 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,02	7,70	5,60	3,97	4,13	4,18
60	10,88	9,15	10,29	9,05	9,10	10,13
90	15,12	15,75	14,54	13,69	13,76	15,82
120	19,46	19,82	20,01	19,05	18,87	21,23
P (cm/s)	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$2,17 \cdot 10^{-05}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$	$2,52 \cdot 10^{-05}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$2,87 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,27 \cdot 10^{-05} \pm 1,15 \cdot 10^{-06}$			$2,62 \cdot 10^{-05} \pm 2,20 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,15$						

Tabla IV.259 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK p75 (VER 1).

MDCK p75 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,36	5,38	5,40	3,78	4,24	3,95
60	10,24	11,11	10,40	8,84	9,60	8,93
90	14,83	15,69	15,36	14,30	15,72	14,63
120	18,52	20,08	19,42	20,06	21,36	19,78
P (cm/s)	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$2,46 \cdot 10^{-05}$	$2,38 \cdot 10^{-05}$	$2,74 \cdot 10^{-05}$	$2,90 \cdot 10^{-05}$	$2,69 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,35 \cdot 10^{-05} \pm 1,17 \cdot 10^{-06}$			$2,78 \cdot 10^{-05} \pm 1,13 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,18						

Tabla IV.260 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas MDCK p75 (VER 2).

MDCK p75 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,75	5,56	5,99	4,48	4,61	4,45
60	10,62	10,98	11,64	10,34	10,29	10,44
90	15,49	15,75	17,12	16,48	16,99	16,76
120	18,84	20,31	21,99	22,62	22,97	22,86
P (cm/s)	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$2,70 \cdot 10^{-05}$	$3,06 \cdot 10^{-05}$	$3,12 \cdot 10^{-05}$	$3,11 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,47 \cdot 10^{-05} \pm 2,37 \cdot 10^{-06}$			$3,10 \cdot 10^{-05} \pm 3,31 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,25						

Tabla IV.261 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas MDCK p75 (VER 3).

MDCK p75	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$1,15 \cdot 10^{-06}$	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-06}$	1,15
VER-2	$2,35 \cdot 10^{-05}$	$1,17 \cdot 10^{-06}$	$2,78 \cdot 10^{-05}$	$1,13 \cdot 10^{-06}$	1,18
VER-3	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-06}$	$3,10 \cdot 10^{-05}$	$3,31 \cdot 10^{-07}$	1,25

Tabla IV.262 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK p75.

MDCK p85 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,02	7,70	5,60	3,97	4,13	4,18
60	10,88	9,15	10,29	9,05	9,10	10,13
90	15,12	15,75	14,54	13,69	13,76	15,82
120	19,46	19,82	19,52	19,05	18,87	21,23
P (cm/s)	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$2,17 \cdot 10^{-05}$	$2,32 \cdot 10^{-05}$	$2,52 \cdot 10^{-05}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$2,87 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,25 \cdot 10^{-05} \pm 7,62 \cdot 10^{-07}$			$2,62 \cdot 10^{-05} \pm 2,20 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,17$						

Tabla IV.263 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK p85 (VER 1).

MDCK p85 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,36	5,38	5,40	3,78	4,24	3,95
60	10,24	11,11	10,40	8,84	9,60	8,93
90	14,83	15,69	15,36	14,30	15,72	14,63
120	18,52	20,08	19,42	20,06	21,36	19,78
P (cm/s)	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$2,46 \cdot 10^{-05}$	$2,38 \cdot 10^{-05}$	$2,74 \cdot 10^{-05}$	$2,90 \cdot 10^{-05}$	$2,69 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,35 \cdot 10^{-05} \pm 1,17 \cdot 10^{-06}$			$2,78 \cdot 10^{-05} \pm 1,13 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,18						

Tabla IV.264 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas MDCK p85 (VER 2).

MDCK p85 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,75	5,56	5,99	4,48	4,61	4,45
60	10,62	10,98	11,64	10,34	10,29	10,44
90	15,49	15,75	17,12	16,48	16,99	16,76
120	18,84	20,31	21,99	22,62	22,97	22,86
P (cm/s)	$2,23 \cdot 10^{-05}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$2,70 \cdot 10^{-05}$	$3,06 \cdot 10^{-05}$	$3,12 \cdot 10^{-05}$	$3,11 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,47 \cdot 10^{-05} \pm 2,37 \cdot 10^{-06}$			$3,10 \cdot 10^{-05} \pm 3,31 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,25						

Tabla IV.265 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100μM en monocapas MDCK p85 (VER 3).

MDCK p85	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$2,25 \cdot 10^{-05}$	$7,62 \cdot 10^{-07}$	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$2,20 \cdot 10^{-06}$	1,17
VER-2	$2,35 \cdot 10^{-05}$	$1,17 \cdot 10^{-06}$	$2,78 \cdot 10^{-05}$	$1,13 \cdot 10^{-06}$	1,18
VER-3	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-06}$	$3,10 \cdot 10^{-05}$	$3,31 \cdot 10^{-07}$	1,25

Tabla IV.266 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK p85.

MDCK p95 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	17,45	4,01	2,62	3,53	3,49	3,69
60	23,97	8,21	5,42	7,98	7,87	8,23
90	27,25	11,37	9,64	11,91	11,67	12,36
120	30,75	13,45	13,72	14,80	15,36	18,03
P (cm/s)	$2,18 \cdot 10^{-05}$	$1,59 \cdot 10^{-05}$	$1,90 \cdot 10^{-05}$	$1,91 \cdot 10^{-05}$	$1,99 \cdot 10^{-05}$	$2,38 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,89 \cdot 10^{-05} \pm 2,96 \cdot 10^{-06}$			$2,09 \cdot 10^{-05} \pm 2,53 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,11$						

Tabla IV.267 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK p95 (VER 1).

MDCK p95 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,75	4,50	4,11	3,61	3,58	3,53
60	8,92	8,79	7,59	7,74	7,56	8,12
90	12,11	12,65	10,79	11,29	11,16	11,69
120	14,97	15,38	14,71	14,84	14,96	15,86
P (cm/s)	$1,71 \cdot 10^{-05}$	$1,84 \cdot 10^{-05}$	$1,77 \cdot 10^{-05}$	$1,88 \cdot 10^{-05}$	$1,91 \cdot 10^{-05}$	$2,05 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,77 \cdot 10^{-05} \pm 6,69 \cdot 10^{-07}$			$1,95 \cdot 10^{-05} \pm 8,96 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,10						

Tabla IV.268 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK p95 (VER 2).

MDCK p95 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	4,49	4,29	4,52	3,57	3,94	3,17
60	8,70	8,68	8,80	7,45	8,07	7,28
90	11,88	12,59	13,05	11,62	12,49	12,10
120	14,89	15,31	15,88	14,97	16,47	15,58
P (cm/s)	$1,74 \cdot 10^{-05}$	$1,87 \cdot 10^{-05}$	$1,94 \cdot 10^{-05}$	$1,94 \cdot 10^{-05}$	$2,12 \cdot 10^{-05}$	$2,12 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$1,85 \cdot 10^{-05} \pm 1,01 \cdot 10^{-06}$			$2,06 \cdot 10^{-05} \pm 1,06 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,12						

Tabla IV.269 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK p95 (VER 3).

MDCK p95	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	P_{BA}/P_{AB}
VER-1	$1,89 \cdot 10^{-05}$	$2,96 \cdot 10^{-06}$	$2,09 \cdot 10^{-05}$	$2,53 \cdot 10^{-06}$	1,11
VER-2	$1,77 \cdot 10^{-05}$	$6,69 \cdot 10^{-07}$	$1,95 \cdot 10^{-05}$	$8,96 \cdot 10^{-07}$	1,10
VER-3	$1,85 \cdot 10^{-05}$	$1,01 \cdot 10^{-06}$	$2,06 \cdot 10^{-05}$	$1,06 \cdot 10^{-06}$	1,12

Tabla IV.270 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK p95.

MDCK	Permeabilidad (cm/s)		
VER	$P_{AB} \pm DE$ (cm/s)	$P_{BA} \pm DE$ (cm/s)	Ratio
p26	$2,30 \cdot 10^{-05} \pm 8,88 \cdot 10^{-07}$	$2,38 \cdot 10^{-05} \pm 8,40 \cdot 10^{-07}$	1,04
p35	$2,84 \cdot 10^{-05} \pm 2,00 \cdot 10^{-06}$	$2,76 \cdot 10^{-05} \pm 1,87 \cdot 10^{-06}$	0,97
p45	$1,96 \cdot 10^{-05} \pm 1,06 \cdot 10^{-06}$	$2,07 \cdot 10^{-05} \pm 1,76 \cdot 10^{-06}$	1,06
p55	$2,25 \cdot 10^{-05} \pm 3,03 \cdot 10^{-07}$	$2,41 \cdot 10^{-05} \pm 9,37 \cdot 10^{-07}$	1,07
p65	$2,72 \cdot 10^{-05} \pm 1,52 \cdot 10^{-06}$	$2,86 \cdot 10^{-05} \pm 1,24 \cdot 10^{-06}$	1,05
p75	$2,36 \cdot 10^{-05} \pm 9,81 \cdot 10^{-07}$	$2,83 \cdot 10^{-05} \pm 2,43 \cdot 10^{-06}$	1,20
p85	$2,36 \cdot 10^{-05} \pm 1,10 \cdot 10^{-06}$	$2,83 \cdot 10^{-05} \pm 2,43 \cdot 10^{-06}$	1,20
p95	$1,84 \cdot 10^{-05} \pm 5,82 \cdot 10^{-07}$	$2,03 \cdot 10^{-05} \pm 7,76 \cdot 10^{-07}$	1,11

Tabla IV.271 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK a los diferentes pases celulares.

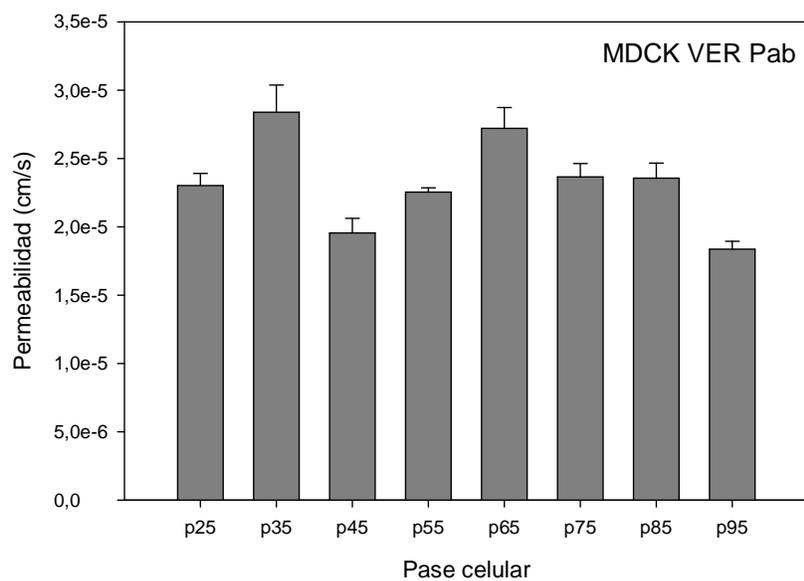


Figura IV.26 Representación gráfica de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) de verapamilo 100 μM en monocapas MDCK a los diferentes pases celulares.

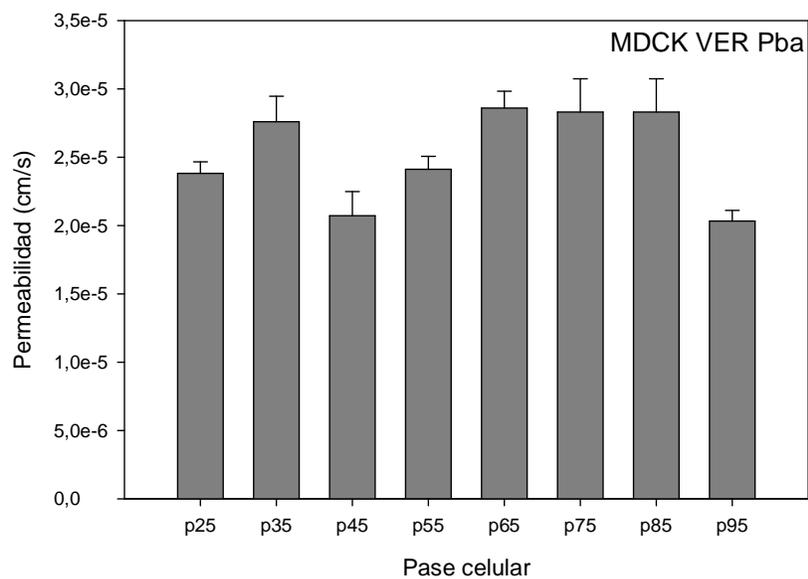


Figura IV.27 Representación gráfica de la Permeabilidad Basolateral-Apical (Pba) de verapamilo 100 μM en monocapas MDCK a los diferentes pases celulares.

2.4 Estudios en MDCK-MDR1

MDCK-MDR1 p25 VER-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,05	6,19	5,92	4,67	4,14	4,54
60	12,14	12,58	12,54	10,01	9,37	9,59
90	17,16	17,58	17,03	14,83	13,73	14,44
120	21,57	22,16	22,13	19,41	17,73	18,17
P (cm/s)	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$2,67 \cdot 10^{-05}$	$2,68 \cdot 10^{-05}$	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$2,28 \cdot 10^{-05}$	$2,31 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,65 \cdot 10^{-05} \pm 4,20 \cdot 10^{-07}$			$2,36 \cdot 10^{-05} \pm 1,06 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,89						

Tabla IV.272 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo $100\mu\text{M}$ en monocapas MDCK-MDR1 p25 (VER 1).

MDCK-MDR1 p25 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,22	5,75	5,53	4,78	4,65	4,84
60	12,48	12,08	12,37	10,22	9,87	9,80
90	17,37	16,36	16,74	15,11	14,34	14,08
120	21,38	20,92	21,07	20,02	18,94	18,68
P (cm/s)	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$2,51 \cdot 10^{-05}$	$2,58 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$2,39 \cdot 10^{-05}$	$2,31 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,54 \cdot 10^{-05} \pm 3,09 \cdot 10^{-07}$			$2,42 \cdot 10^{-05} \pm 1,24 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,95						

Tabla IV.273 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p25 (VER 2).

MDCK-MDR1 p25 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,34	5,90	5,90	4,59	4,53	4,56
60	10,85	11,95	11,95	9,80	10,18	10,00
90	14,45	17,69	17,69	14,15	14,30	14,39
120	19,42	24,43	24,43	18,85	19,44	18,95
P (cm/s)	$2,31 \cdot 10^{-05}$	$3,10 \cdot 10^{-05}$	$3,10 \cdot 10^{-05}$	$2,38 \cdot 10^{-05}$	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,84 \cdot 10^{-05} \pm 4,52 \cdot 10^{-06}$			$2,42 \cdot 10^{-05} \pm 4,54 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,85						

Tabla IV.274 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p25 (VER 3).

MDCK-MDR1 p25	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$2,65 \cdot 10^{-05}$	$4,20 \cdot 10^{-07}$	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$1,06 \cdot 10^{-06}$	0,89
VER-2	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$3,09 \cdot 10^{-07}$	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$1,24 \cdot 10^{-06}$	0,95
VER-3	$2,84 \cdot 10^{-05}$	$4,52 \cdot 10^{-06}$	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$4,54 \cdot 10^{-07}$	0,85

Tabla IV.275 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 p25.

MDCK-MDR1 p35 VER-1 100 (μ M)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,54	3,32	3,63	3,93	3,91	4,28
60	9,94	10,13	10,85	10,03	10,72	11,34
90	16,21	15,89	16,55	15,72	17,03	17,74
120	20,05	20,75	20,37	20,91	22,46	22,85
P (cm/s)	$2,82 \cdot 10^{-05}$	$2,93 \cdot 10^{-05}$	$2,83 \cdot 10^{-05}$	$2,86 \cdot 10^{-05}$	$3,13 \cdot 10^{-05}$	$3,14 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,86 \cdot 10^{-05} \pm 6,34 \cdot 10^{-07}$			$3,04 \cdot 10^{-05} \pm 1,58 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 1,06$						

Tabla IV.276 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 p35 (VER 1).

MDCK-MDR1 p35 VER-2 100 (µM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	2,11	3,52	3,88	4,27	4,19	4,73
60	9,98	10,91	11,36	10,29	10,32	11,49
90	14,66	17,98	17,38	15,82	16,30	18,00
120	20,21	22,42	23,09	21,57	21,90	23,86
P (cm/s)	$2,98 \cdot 10^{-05}$	$3,22 \cdot 10^{-05}$	$3,21 \cdot 10^{-05}$	$2,90 \cdot 10^{-05}$	$2,99 \cdot 10^{-05}$	$3,23 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$3,14 \cdot 10^{-05} \pm 1,37 \cdot 10^{-06}$			$3,04 \cdot 10^{-05} \pm 1,70 \cdot 10^{-06}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,97$						

Tabla IV.277 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100µM en monocapas MDCK-MDR1 p35 (VER 2).

MDCK-MDR1 p35	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	$P_{AB}(cm/s)$	DE	$P_{BA}(cm/s)$	DE	
VER-1	$2,86 \cdot 10^{-05}$	$6,34 \cdot 10^{-07}$	$3,04 \cdot 10^{-05}$	$1,58 \cdot 10^{-06}$	1,06
VER-2	$3,14 \cdot 10^{-05}$	$1,37 \cdot 10^{-06}$	$3,04 \cdot 10^{-05}$	$1,70 \cdot 10^{-06}$	0,97

Tabla IV.278 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 µM en monocapas MDCK-MDR1 p35.

MDCK-MDR1 p45 VER-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,44	4,94	5,40	4,33	3,38	3,54
60	11,66	10,82	12,48	8,90	8,25	8,26
90	16,95	15,68	17,97	13,24	12,37	12,03
120	21,82	20,98	23,14	17,05	16,62	16,38
P (cm/s)	$2,75 \cdot 10^{-05}$	$2,68 \cdot 10^{-05}$	$2,96 \cdot 10^{-05}$	$2,15 \cdot 10^{-05}$	$2,21 \cdot 10^{-05}$	$2,14 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,80 \cdot 10^{-05} \pm 1,50 \cdot 10^{-06}$			$2,16 \cdot 10^{-05} \pm 4,23 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,77						

Tabla IV.279 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p45 (VER 1).

MDCK-MDR1 p45 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,53	3,72	3,93	6,01	3,29	3,03
60	9,91	9,85	9,93	12,57	9,08	8,43
90	15,33	16,18	15,58	17,71	13,82	13,08
120	20,08	20,34	20,81	21,78	18,21	17,74
P (cm/s)	$2,78 \cdot 10^{-05}$	$2,84 \cdot 10^{-05}$	$2,84 \cdot 10^{-05}$	$2,65 \cdot 10^{-05}$	$2,50 \cdot 10^{-05}$	$2,46 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,82 \cdot 10^{-05} \pm 3,43 \cdot 10^{-07}$			$2,54 \cdot 10^{-05} \pm 9,82 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,90						

Tabla IV.280 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p45 (VER 2).

MDCK-MDR1 p45 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	3,65	4,34	4,12	2,85	3,11	2,96
60	9,54	9,70	10,03	7,44	7,79	7,98
90	14,18	15,01	15,84	11,82	12,25	12,70
120	19,21	19,82	20,26	15,46	16,89	16,83
P (cm/s)	$2,59 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$2,74 \cdot 10^{-05}$	$2,13 \cdot 10^{-05}$	$2,31 \cdot 10^{-05}$	$2,34 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,65 \cdot 10^{-05} \pm 7,92 \cdot 10^{-07}$			$2,26 \cdot 10^{-05} \pm 1,12 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,85						

Tabla IV.281 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo $100\mu\text{M}$ en monocapas MDCK-MDR1 p45 (VER 3).

MDCK-MDR1 p45	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P _{BA} /P _{AB}
	P _{AB} (cm/s)	DE	P _{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$2,80 \cdot 10^{-05}$	$1,50 \cdot 10^{-06}$	$2,16 \cdot 10^{-05}$	$4,23 \cdot 10^{-07}$	0,77
VER-2	$2,82 \cdot 10^{-05}$	$3,43 \cdot 10^{-07}$	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$9,82 \cdot 10^{-07}$	0,90
VER-3	$2,65 \cdot 10^{-05}$	$7,92 \cdot 10^{-07}$	$2,26 \cdot 10^{-05}$	$1,12 \cdot 10^{-06}$	0,85

Tabla IV.282 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo $100\mu\text{M}$ en monocapas MDCK-MDR1 p45.

MDCK-MDR1 p55 VER-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,08	5,30	5,69	4,17	4,40	5,10
60	10,53	11,02	11,84	8,83	9,23	9,53
90	15,75	16,11	17,28	13,93	13,89	14,82
120	21,94	21,96	22,12	18,69	18,74	19,73
P (cm/s)	$2,82 \cdot 10^{-05}$	$2,78 \cdot 10^{-05}$	$2,76 \cdot 10^{-05}$	$2,46 \cdot 10^{-05}$	$2,41 \cdot 10^{-05}$	$2,48 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,79 \cdot 10^{-05} \pm 2,75 \cdot 10^{-07}$			$2,45 \cdot 10^{-05} \pm 3,76 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 0,88						

Tabla IV.283 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p55 (VER 1).

MDCK-MDR1 p55 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,65	5,39	5,18	4,36	4,32	5,01
60	11,21	10,61	9,97	9,70	8,93	10,75
90	16,48	15,55	14,63	14,44	13,89	15,65
120	20,85	20,48	19,00	19,16	18,52	20,87
P (cm/s)	$2,57 \cdot 10^{-05}$	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$	$2,65 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,48 \cdot 10^{-05} \pm 1,30 \cdot 10^{-06}$			$2,51 \cdot 10^{-05} \pm 1,27 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,01						

Tabla IV.284 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p55 (VER 2).

MDCK-MDR1 p55 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	5,72	6,07	5,30	4,82	4,10	4,31
60	11,17	11,97	10,48	9,46	8,44	8,93
90	15,83	16,78	15,09	14,58	12,83	13,15
120	20,29	21,35	19,73	19,92	17,45	17,78
P (cm/s)	$2,44 \cdot 10^{-05}$	$2,56 \cdot 10^{-05}$	$2,42 \cdot 10^{-05}$	$2,55 \cdot 10^{-05}$	$2,24 \cdot 10^{-05}$	$2,25 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,47 \cdot 10^{-05} \pm 7,37 \cdot 10^{-07}$			$2,35 \cdot 10^{-05} \pm 1,72 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 0,95						

Tabla IV.285 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo $100\mu\text{M}$ en monocapas MDCK-MDR1 p55 (VER 3).

MDCK-MDR1 p55	Transporte AP		Transporte BL		Cociente	
	P _{AB} (cm/s)	DE	P _{BA} (cm/s)	DE	P _{BA} /P _{AB}	DE
VER-1	$2,79 \cdot 10^{-05}$	$2,75 \cdot 10^{-07}$	$2,45 \cdot 10^{-05}$	$3,76 \cdot 10^{-07}$	0,88	
VER-2	$2,48 \cdot 10^{-05}$	$1,30 \cdot 10^{-06}$	$2,51 \cdot 10^{-05}$	$1,27 \cdot 10^{-06}$	1,01	
VER-3	$2,47 \cdot 10^{-05}$	$7,37 \cdot 10^{-07}$	$2,35 \cdot 10^{-05}$	$1,72 \cdot 10^{-06}$	0,95	

Tabla IV.286 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo $100\mu\text{M}$ en monocapas MDCK-MDR1 p55.

MDCK-MDR1 p65 VER-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	10,94	10,07	4,72	4,86	4,68	5,05
60	17,04	5,68	12,11	10,43	10,61	11,04
90	21,70	16,60	18,78	16,29	15,95	17,00
120	26,71	21,21	24,82	20,68	20,87	22,25
P (cm/s)	$2,62 \cdot 10^{-05}$	$2,24 \cdot 10^{-05}$	$3,38 \cdot 10^{-05}$	$2,69 \cdot 10^{-05}$	$2,72 \cdot 10^{-05}$	$2,91 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,75 \cdot 10^{-05} \pm 5,81 \cdot 10^{-06}$			$2,77 \cdot 10^{-05} \pm 1,17 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,01						

Tabla IV.287 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo $100\mu\text{M}$ en monocapas MDCK-MDR1 p65 (VER 1).

MDCK-MDR1 p65 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,54	6,54	7,35	5,23	4,81	4,89
60	12,29	12,29	12,93	11,37	16,13	14,48
90	17,27	17,27	18,22	16,62	20,26	19,06
120	21,45	21,45	22,80	21,13	24,58	23,51
P (cm/s)	$2,51 \cdot 10^{-05}$	$2,51 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$2,68 \cdot 10^{-05}$	$3,20 \cdot 10^{-05}$	$3,05 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,54 \cdot 10^{-05} \pm 5,66 \cdot 10^{-07}$			$2,98 \cdot 10^{-05} \pm 2,72 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 1,17						

Tabla IV. 288 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo $100\mu\text{M}$ en monocapas MDCK-MDR1 p65 (VER 2).

MDCK-MDR1 p65 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	7,34	7,28	7,95	5,26	5,55	5,25
60	13,37	13,69	13,95	10,60	11,21	10,64
90	18,66	18,92	19,00	15,13	16,12	15,50
120	23,12	23,59	23,69	19,35	20,44	19,69
P (cm/s)	$2,68 \cdot 10^{-05}$	$2,74 \cdot 10^{-05}$	$2,64 \cdot 10^{-05}$	$2,36 \cdot 10^{-05}$	$2,50 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$
P±DE (cm/s)	$2,68 \cdot 10^{-05} \pm 5,10 \cdot 10^{-07}$			$2,43 \cdot 10^{-05} \pm 7,02 \cdot 10^{-07}$		
$P_{BA}/P_{AB} = 0,91$						

Tabla IV.289 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p65 (VER 3).

MDCK-MDR1 p65	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P_{BA}/P_{AB}
	P_{AB} (cm/s)	DE	P_{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$2,75 \cdot 10^{-05}$	$5,81 \cdot 10^{-06}$	$2,77 \cdot 10^{-05}$	$1,17 \cdot 10^{-06}$	1,01
VER-2	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$5,66 \cdot 10^{-07}$	$2,98 \cdot 10^{-05}$	$2,72 \cdot 10^{-06}$	1,17
VER-3	$2,68 \cdot 10^{-05}$	$5,10 \cdot 10^{-07}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$7,02 \cdot 10^{-07}$	0,91

Tabla IV.290 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p65.

MDCK-MDR1 p85 VER-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	7,20	6,55	6,91	4,92	5,29	4,93
60	13,07	12,26	12,74	10,08	10,69	9,85
90	18,14	16,86	18,05	14,33	15,62	14,23
120	22,57	21,19	21,92	18,67	19,77	18,35
P (cm/s)	$2,59 \cdot 10^{-05}$	$2,45 \cdot 10^{-05}$	$2,54 \cdot 10^{-05}$	$2,30 \cdot 10^{-05}$	$2,44 \cdot 10^{-05}$	$2,25 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,53 \cdot 10^{-05} \pm 6,84 \cdot 10^{-07}$			$2,33 \cdot 10^{-05} \pm 9,93 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 0,92						

Tabla IV.291 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p85 (VER 1).

MDCK-MDR1 p85 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	6,00	6,75	6,93	4,98	4,77	4,52
60	11,87	12,25	12,98	9,35	9,81	9,36
90	18,14	17,56	17,95	13,93	14,90	14,28
120	22,57	21,79	22,51	18,10	19,11	18,78
P (cm/s)	$2,07 \cdot 10^{-05}$	$2,55 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$2,22 \cdot 10^{-05}$	$2,43 \cdot 10^{-05}$	$2,41 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,41 \cdot 10^{-05} \pm 2,93 \cdot 10^{-06}$			$2,35 \cdot 10^{-05} \pm 1,16 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 0,98						

Tabla IV.292 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p85 (VER 2).

MDCK-MDR1 p85 VER-3 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	7,08	7,13	6,94	5,03	4,82	4,92
60	9,75	9,22	9,43	10,78	10,31	9,63
90	19,06	18,08	18,18	15,72	14,93	14,02
120	23,49	22,26	22,69	20,45	19,40	17,77
P (cm/s)	$2,96 \cdot 10^{-05}$	$2,74 \cdot 10^{-05}$	$2,83 \cdot 10^{-05}$	$2,58 \cdot 10^{-05}$	$2,44 \cdot 10^{-05}$	$2,17 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$2,84 \cdot 10^{-05} \pm 1,10 \cdot 10^{-06}$			$2,40 \cdot 10^{-05} \pm 2,11 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB} = 0,84						

Tabla IV.293 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) obtenidas tras administrar verapamilo $100 \mu\text{M}$ en monocapas MDCK-MDR1 p85 (VER 3).

MDCK-MDR1 p85	Transporte AP		Transporte BL		Cociente P _{BA} /P _{AB}
	P _{AB} (cm/s)	DE	P _{BA} (cm/s)	DE	
VER-1	$2,53 \cdot 10^{-05}$	$6,84 \cdot 10^{-07}$	$2,33 \cdot 10^{-05}$	$9,93 \cdot 10^{-07}$	0,92
VER-2	$2,41 \cdot 10^{-05}$	$2,93 \cdot 10^{-06}$	$2,35 \cdot 10^{-05}$	$1,16 \cdot 10^{-06}$	0,98
VER-3	$2,84 \cdot 10^{-05}$	$1,10 \cdot 10^{-06}$	$2,40 \cdot 10^{-05}$	$2,11 \cdot 10^{-06}$	0,84

Tabla IV.294 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (P_{ab}) y Basolateral-Apical (P_{ba}) de verapamilo $100 \mu\text{M}$ en monocapas MDCK-MDR1 p85.

MDCK-MDR1 p95 VER-1 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	10,02	14,81	10,47	6,37	6,24	6,32
60	19,36	24,29	20,32	13,84	13,85	13,64
90	27,24	32,47	29,07	21,62	20,94	21,22
120	33,48	38,12	34,53	28,46	27,84	27,91
P (cm/s)	$3,95 \cdot 10^{-05}$	$3,95 \cdot 10^{-05}$	$4,09 \cdot 10^{-05}$	$3,74 \cdot 10^{-05}$	$3,63 \cdot 10^{-05}$	$3,65 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$3,99 \cdot 10^{-05} \pm 7,96 \cdot 10^{-07}$			$3,67 \cdot 10^{-05} \pm 5,77 \cdot 10^{-07}$		
P_{BA}/P_{AB}= 0,92						

Tabla IV.295 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p95 (VER 1).

MDCK-MDR1 p95 VER-2 100 (μM)						
Tiempo (min)	Cantidades (nmol)					
	Transporte apical-basal			Transporte basal-apical		
	1	2	3	4	5	6
30	10,02	14,81	10,47	6,86	6,68	6,59
60	19,36	24,29	20,32	14,40	14,94	14,67
90	27,24	32,47	29,07	21,09	22,93	22,31
120	33,48	38,12	34,53	28,20	30,16	29,72
P (cm/s)	$3,95 \cdot 10^{-05}$	$3,95 \cdot 10^{-05}$	$4,09 \cdot 10^{-05}$	$3,57 \cdot 10^{-05}$	$3,96 \cdot 10^{-05}$	$3,89 \cdot 10^{-05}$
P\pmDE (cm/s)	$3,99 \cdot 10^{-05} \pm 7,96 \cdot 10^{-07}$			$3,81 \cdot 10^{-05} \pm 2,08 \cdot 10^{-06}$		
P_{BA}/P_{AB}= 0,95						

Tabla IV.296 Valores de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) obtenidas tras administrar verapamilo 100 μM en monocapas MDCK-MDR1 p95 (VER 2).

MDCK-MDR1 p95	Transporte AP		Transporte BL		Cociente
	P _{AB} (cm/s)	DE	P _{BA} (cm/s)	DE	P _{BA} /P _{AB}
VER-1	$3,99 \cdot 10^{-05}$	$7,96 \cdot 10^{-07}$	$3,67 \cdot 10^{-05}$	$5,77 \cdot 10^{-07}$	0,92
VER-2	$3,99 \cdot 10^{-05}$	$7,96 \cdot 10^{-07}$	$3,81 \cdot 10^{-05}$	$2,08 \cdot 10^{-06}$	0,95

Tabla IV.297 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) de verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 p95.

MDCK-MDR1	Permeabilidad (cm/s)		
VER	P _{AB} \pm DE (cm/s)	P _{BA} \pm DE (cm/s)	Ratio
p25	$2,68 \cdot 10^{-05} \pm 1,48 \cdot 10^{-06}$	$2,40 \cdot 10^{-05} \pm 3,59 \cdot 10^{-07}$	0,90
p35	$3,00 \cdot 10^{-05} \pm 1,98 \cdot 10^{-06}$	$3,04 \cdot 10^{-05} \pm 3,09 \cdot 10^{-08}$	1,01
p45	$2,75 \cdot 10^{-05} \pm 9,34 \cdot 10^{-07}$	$2,32 \cdot 10^{-05} \pm 1,93 \cdot 10^{-06}$	0,84
p55	$2,58 \cdot 10^{-05} \pm 1,81 \cdot 10^{-06}$	$2,44 \cdot 10^{-05} \pm 8,27 \cdot 10^{-07}$	0,94
p65	$2,66 \cdot 10^{-05} \pm 1,04 \cdot 10^{-06}$	$2,73 \cdot 10^{-05} \pm 2,75 \cdot 10^{-06}$	1,03
p85	$2,59 \cdot 10^{-05} \pm 2,22 \cdot 10^{-06}$	$2,36 \cdot 10^{-05} \pm 3,42 \cdot 10^{-07}$	0,91
p95	$3,99 \cdot 10^{-05} \pm 4,34 \cdot 10^{-06}$	$3,74 \cdot 10^{-05} \pm 9,43 \cdot 10^{-07}$	0,94

Tabla IV.298 Valores medios de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) y Basolateral-Apical (Pba) de verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 a los diferentes pases celulares.

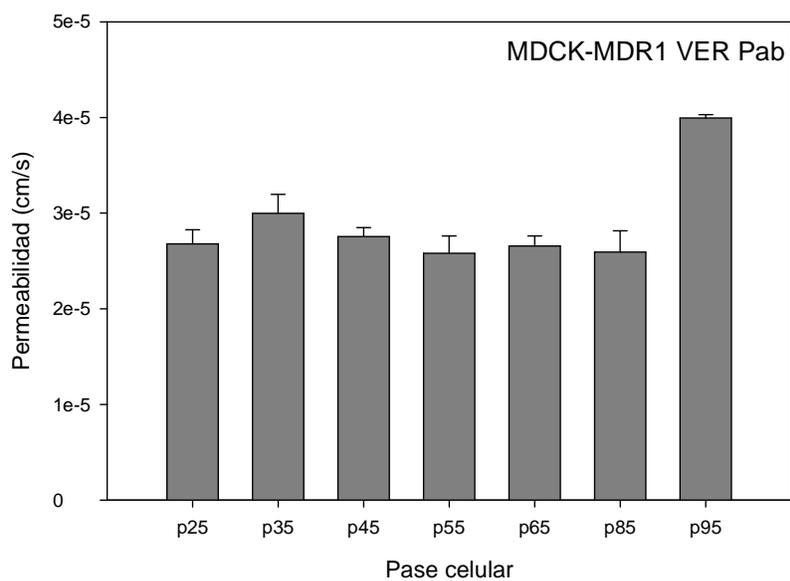


Figura IV.28 Representación gráfica de la Permeabilidad Apical-Basolateral (Pab) de verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 a los diferentes pases celulares.

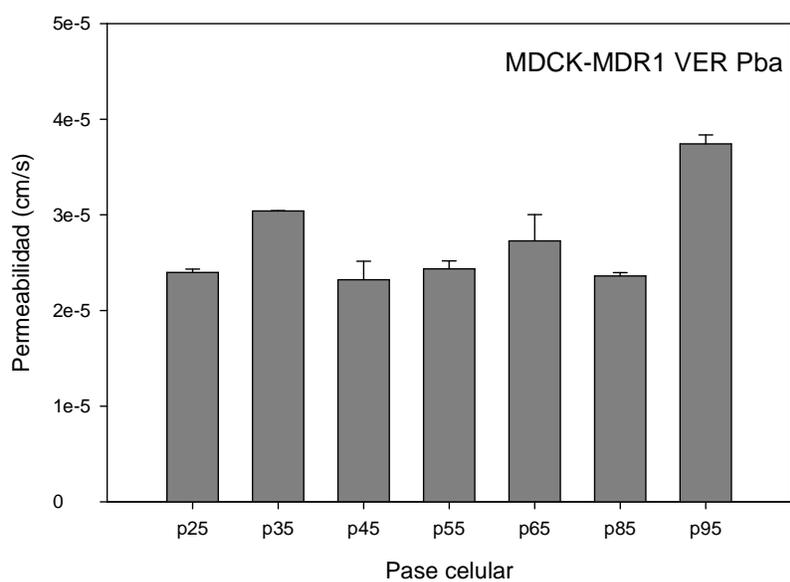


Figura IV.29 Representación gráfica de la Permeabilidad Basolateral-Apical (Pba) de verapamilo 100 μ M en monocapas MDCK-MDR1 a los diferentes pases celulares.

A continuación se detallan los análisis estadísticos de comparación de las permeabilidades obtenidas en las distintas líneas celulares y a los distintos pases.

Fuente de variación		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Pase	Hipótesis	15,824	7	2,261	8,011	0,000
	Error	17,097	60,587	0,282 ^a		
Línea	Hipótesis	29,463	3	9,821	37,687	0,000
	Error	16,661	63,934	0,261 ^b		
Plato (Línea*Pase)	Hipótesis	100,410	20	5,021	17,687	0,000
	Error	17,134	60,360	0,284 ^c		
Línea *Pase	Hipótesis	17,193	60	0,287	4,180	0,000
	Error	30,853	450	0,069 ^d		
Dirección	Hipótesis	9,677	1	9,677	141,139	0,000
	Error	30,853	450	0,069 ^d		
Dirección *Línea	Hipótesis	11,182	3	3,727	54,365	0,000
	Error	30,853	450	0,069 ^d		
TEERratio	Hipótesis	0,035	1	0,035	0,516	0,473
	Error	30,853	450	0,069 ^d		

a. 0,980MS (Plato(Pase*Línea)) + 0,020MS (Error)

b. 0,885MS (Plato(Pase*Línea)) + 0,115MS (Error)

c. 0,988MS (Plato(Pase*Línea)) + 0,012MS (Error)

d. MS (Error)

Tabla IV.299 Resultado del análisis de varianza factorial univariante de los valores de permeabilidad del verapamilo en las diferentes líneas celulares y a los distintos pases.

Pase * Línea * Dirección

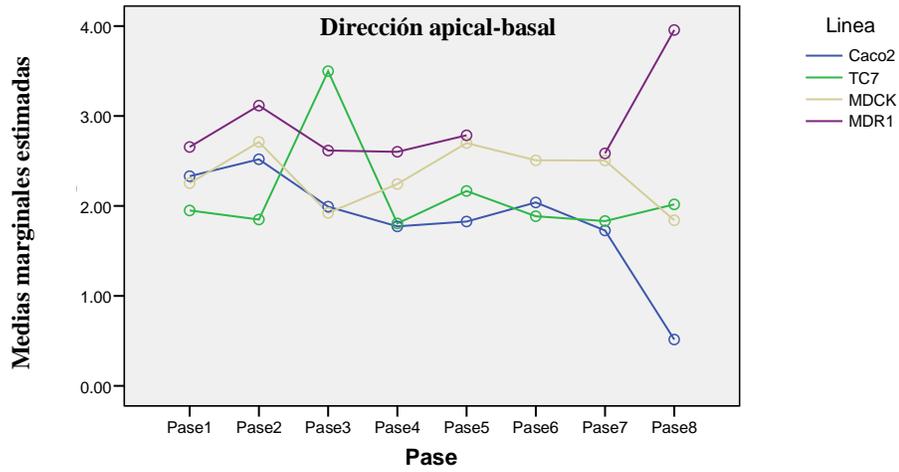


Figura IV.30 Representación gráfica de las medias marginales estimadas de la permeabilidad Apical-Basolateral del verapamilo a los diferentes pases celulares en las distintas líneas celulares.

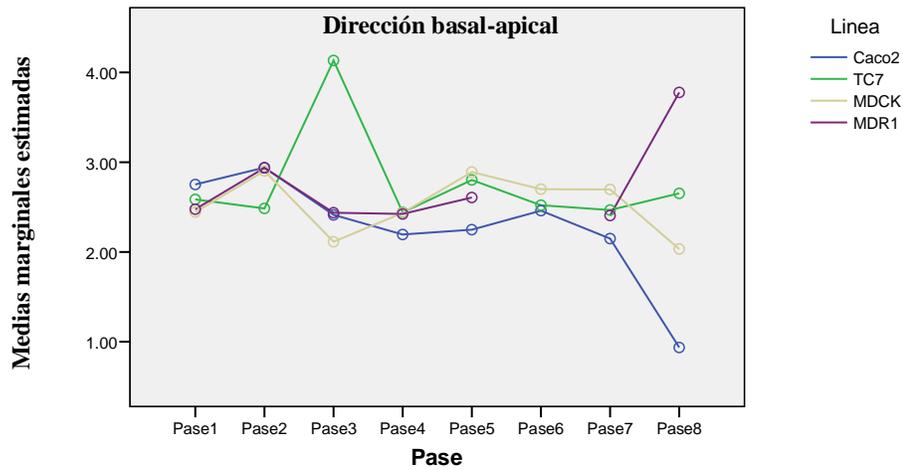


Figura IV.31 Representación gráfica de las medias marginales estimadas de la permeabilidad Basolateral-Apical del verapamilo a los diferentes pases celulares en las distintas líneas celulares.

Pase * Direccion * Linea

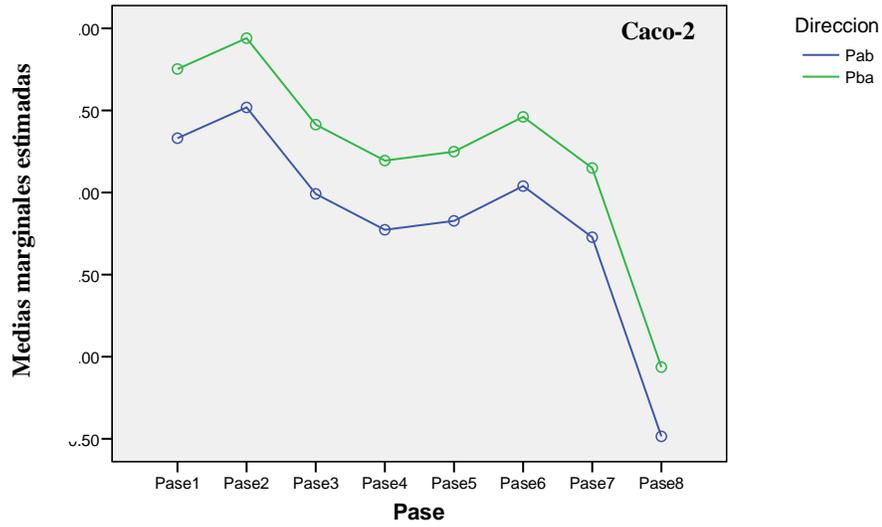


Figura IV.32 Representación gráfica de las medias marginales estimadas de la permeabilidad Apical-Basolateral y la Basolateral-Apical del verapamilo en los diferentes pases celulares en Caco-2.

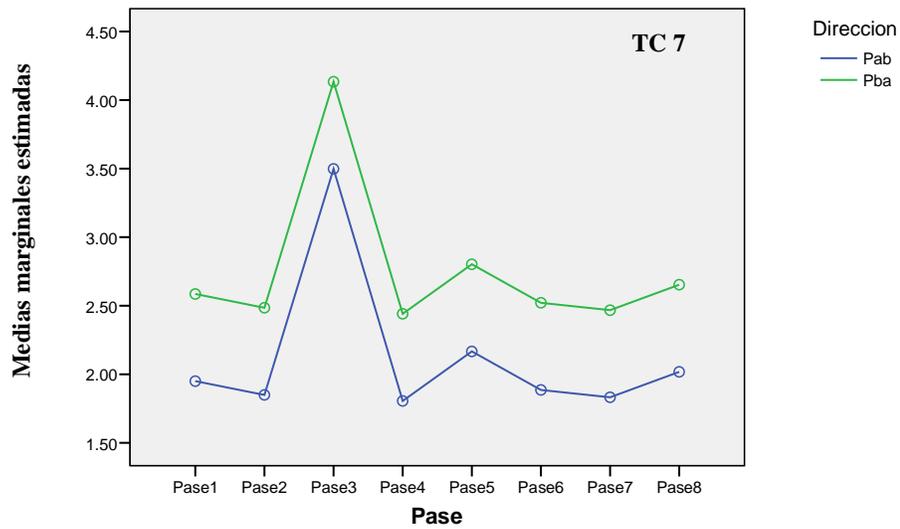


Figura IV.33 Representación gráfica de las medias marginales estimadas de la permeabilidad Apical-Basolateral y la Basolateral-Apical del verapamilo en los diferentes pases celulares en TC7.

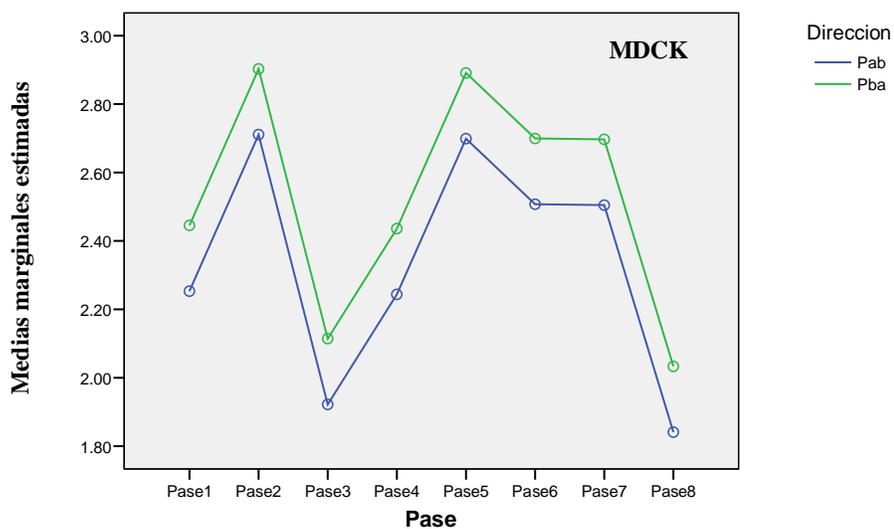


Figura IV.34 Representación gráfica de las medias marginales estimadas de la permeabilidad Apical-Basolateral y la Basolateral-Apical del verapamilo en los diferentes pases celulares en MDCK.

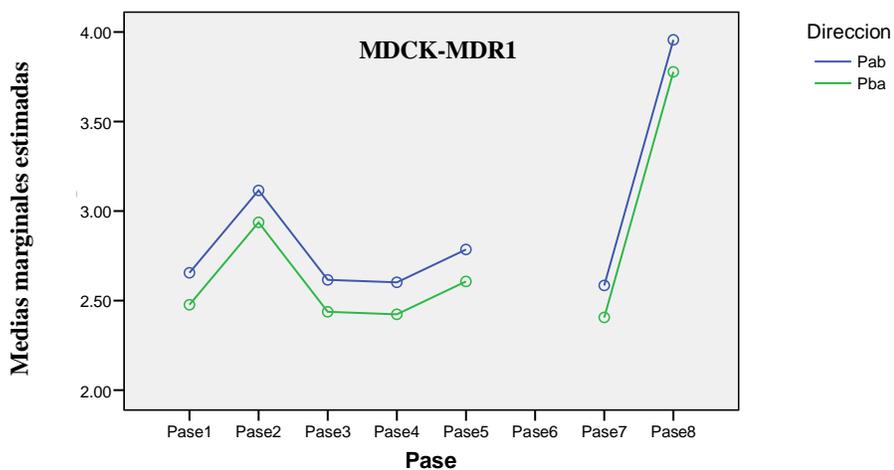


Figura IV.35 Representación gráfica de las medias marginales estimadas de la permeabilidad Apical-Basolateral y la Basolateral-Apical del verapamilo en los diferentes pases celulares en MDCK-MDR1.

Finalmente se calcularon los coeficientes de variación (CV) para cada pase, línea, dirección y plato. Los resultados obtenidos se detallan en las Tablas IV. 300-303.

Pase	Media (cm/s) x 10⁻⁵	DE(cm/s) x 10⁻⁵	CV (%)
1	2,43	0,25	10,28
2	2,65	0,25	9,43
3	2,64	0,25	9,47
4	2,24	0,25	11,16
5	2,50	0,25	9,99
6	2,35	0,34	14,46
7	2,30	0,25	10,89
8	2,07	0,25	12,10

Tabla IV.300 Resultado de los Coeficientes de variación calculados a partir de las permeabilidades del verapamilo 100 μ M obtenidas a los distintos pases ensayados en las 4 líneas celulares.

Línea	Media (cm/s) x 10 ⁻⁵	DE(cm/s) x 10 ⁻⁵	CV (%)
Caco2	2,05	0,24	11,70
TC7	2,44	0,24	9,82
MDCK	2,43	0,24	9,87
MDR1	2,75	0,32	11,65

Tabla IV.301 Resultado de los Coeficientes de variación calculados a partir de las permeabilidades del verapamilo 100 μ M obtenidas en las 4 líneas celulares ensayadas.

Dirección	Media (cm/s) x 10 ⁻⁵	DE(cm/s) x 10 ⁻⁵	CV (%)
Pab	2,25	0,33	14,64
Pba	2,55	0,33	12,96

Tabla IV.302 Resultado de los Coeficientes de variación calculados a partir de las permeabilidades del verapamilo 100 μ M obtenidas en la dirección Apical-Basolateral y la Basolateral-Apical en las 4 líneas celulares ensayadas.

Plato	Media (cm/s) x 10 ⁻⁵	DE(cm/s) x 10 ⁻⁵	CV (%)
Valor Mínimo (plato 91)	3,90	0,26	6,67
Valor Máximo (plato 22)	0,68	0,26	38,18

Tabla IV.303 Resultado de los Coeficientes de variación máximo y mínimo obtenidos a partir de las permeabilidades del verapamilo 100 μ M de cada plato en las 4 líneas celulares ensayadas.

D. Detección de la apoptosis por citometría de flujo

La pérdida de la asimetría de membrana es un fenómeno que parece ser universal en el proceso apoptótico. Por tanto, las células que están sufriendo apoptosis se pueden detectar marcando las células con Anexina V-FITC. Esta se une a los restos de fosfatidilserina expuestos al exterior por la pérdida de asimetría de su membrana. Para distinguir las células de una situación necrótica se tiñen también con IP, el cual entrará en las células que hayan perdido la integridad de la membrana tal y como ocurre con las células necróticas.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo están divididos en cuatro cuadrantes en los cuales aparece una distribución de células. En el eje X aparece la fluorescencia de la anexina-FITC y en el eje Y aparece la fluorescencia correspondiente al IP, según en el cuadrante en el que estemos tendremos:

- Cuadrante inferior izquierdo: células viables; no unen anexina y excluyen IP.
- Cuadrante inferior derecho: células en apoptosis temprana; unen anexina y excluyen IP.
- Cuadrante superior derecho: células en apoptosis tardía; unen anexina e incorporan IP.
- Cuadrante superior izquierdo: células necróticas; sólo incorporan IP.

Caco-2	Céls. viables An-/IP- (%)	Apoptosis temprana An+/IP-(%)	Apoptosis tardia An+/IP+(%)	Necrosis An-/IP+ (%)
p38-a	84,62	0,13	4,99	10,26
p38-b	83,95	0,13	5,56	10,36
p38-c	84,64	0,14	4,67	10,55
Media ± DE (CV)	84,40 ± 0,39 (0,47)	0,13 ± 0,01 (4,33)	5,07 ± 0,45 (8,89)	10,39 ± 0,15 (1,42)
p108-a	95,45	0,00	1,62	2,89
p108-b	94,17	0,02	2,80	3,01
p108-c	94,61	0,03	2,53	2,83
Media ± DE (CV)	94,74 ± 0,65 (0,69)	0,02 ± 0,02 (91,65)	2,32 ± 0,62 (26,69)	2,91 ± 0,09 (3,15)

Tabla IV.304 Cuantificación de la apoptosis por citometria de flujo en células Caco-2 en los pases 38 (inicial) y 108 (final).

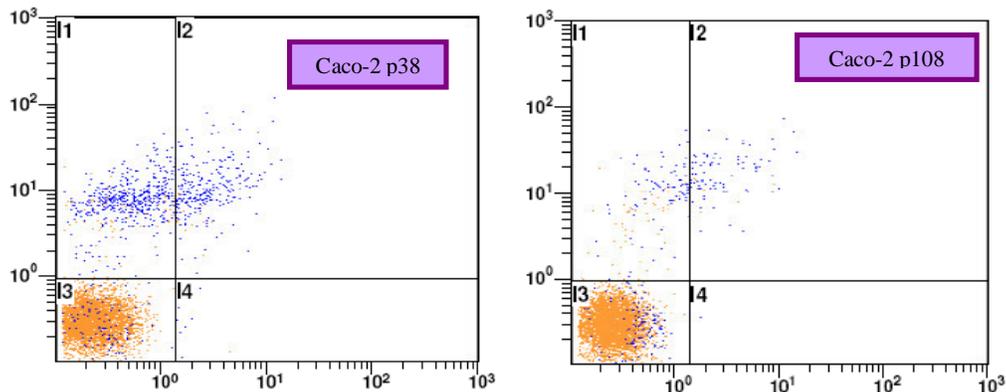


Figura IV. 36 Representación gráfica del resultado de la citometria de flujo de las células Caco-2 pase 38 (inicial) y pase 108 (final).

TC-7	Céls. viables An-/IP- (%)	Apoptosis temprana An+/IP-(%)	Apoptosis tardia An+/IP+(%)	Necrosis An-/IP+ (%)
p85-a	81,77	0,08	6,89	11,26
p85-b	81,13	0,10	6,70	12,07
p85-c	80,94	0,14	6,39	12,53
Media \pm DE (CV)	81,28 \pm 0,43 (0,54)	0,11 \pm 0,03 (28,64)	6,66 \pm 0,25 (3,79)	11,95 \pm 0,64 (5,38)
p155-a	78,47	0,04	2,63	18,86
p155-b	77,59	0,03	1,91	20,47
p155-c	78,28	0,01	1,42	20,29
Media \pm DE (CV)	78,11 \pm 0,46 (0,59)	0,03 \pm 0,02 (57,28)	1,99 \pm 0,61 (30,64)	19,87 \pm 0,88 (4,44)

Tabla IV.305 Cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo en células TC7 en los pases 85 (inicial) y 155 (final).

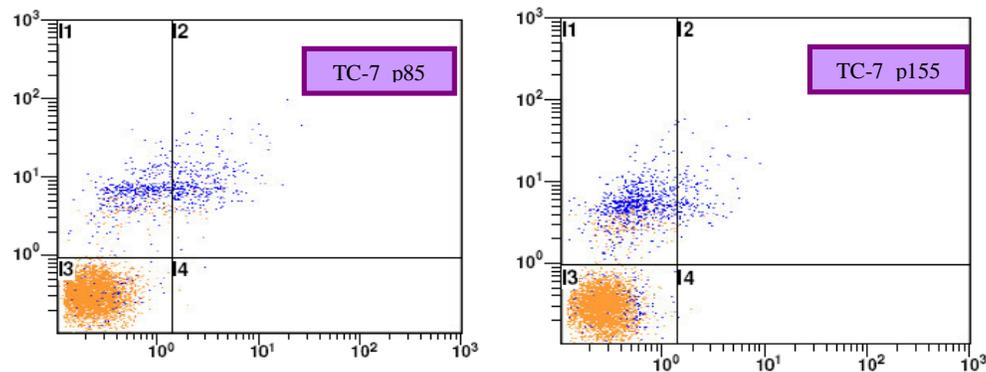


Figura IV. 37 Representación gráfica del resultado de la citometría de flujo de las células TC7 pase 85 (inicial) y el pase 105 (final).

MDCK	Céls. viables An-/IP- (%)	Apoptosis temprana An+/IP- (%)	Apoptosis tardía An+/IP+ (%)	Necrosis An-/IP+ (%)
p25-a	93,89	1,37	4,33	0,41
p25-b	94,71	1,46	3,15	0,68
p25-c	93,55	1,77	4,15	0,53
Media \pm DE (CV)	94,05 \pm 0,60 (0,63)	1,53 \pm 0,21 (13,69)	3,88 \pm 0,64 (16,40)	0,54 \pm 0,14 (25,05)
p95-a	98,18	0,36	1,30	0,16
p95-b	96,06	0,24	1,52	0,18
p95-c	98,26	0,18	1,39	0,17
Media \pm DE (CV)	97,50 \pm 1,25 (1,28)	0,26 \pm 0,09 (35,25)	1,40 \pm 0,11 (7,88)	0,17 \pm 0,01 (5,88)

Tabla IV.306 Cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo en células MDCK en los pases 25 (inicial) y 95 (final).

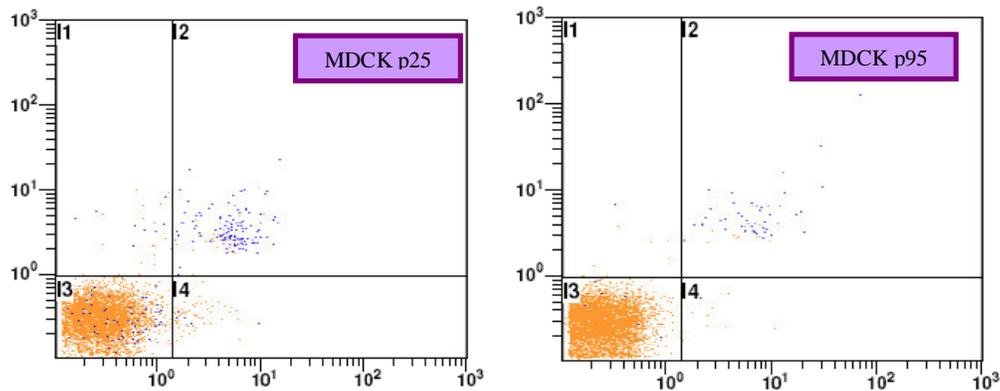


Figura IV. 38 Representación gráfica del resultado de la citometría de flujo de las células MDCK pase 25 (inicial) y pase 95 (final).

MDCK-MDR1	Céls. viables An-/IP- (%)	Apoptosis temprana An+/IP- (%)	Apoptosis tardía An+/IP+ (%)	Necrosis An-/IP+ (%)
p25-a	89,65	0,23	9,37	0,75
p25-b	90,08	0,23	8,82	0,87
p25-c	90,04	0,20	9,00	0,76
Media \pm DE (CV)	89,92 \pm 0,24 (0,26)	0,22 \pm 0,02 (7,87)	9,06 \pm 0,28 (3,09)	0,79 \pm 0,07 (8,39)
p95-a	95,66	0,99	3,08	0,27
p95-b	95,66	1,12	3,05	0,17
p95-c	95,18	1,07	3,47	0,28
Media \pm DE (CV)	95,50 \pm 0,28 (0,29)	1,06 \pm 0,07 (6,19)	3,20 \pm 0,23 (7,32)	0,24 \pm 0,06 (25,34)

Tabla IV.307 Cuantificación de la apoptosis por citometria de flujo en células MDCK-MDR1 en los pases 25 (inicial) y 95 (final).

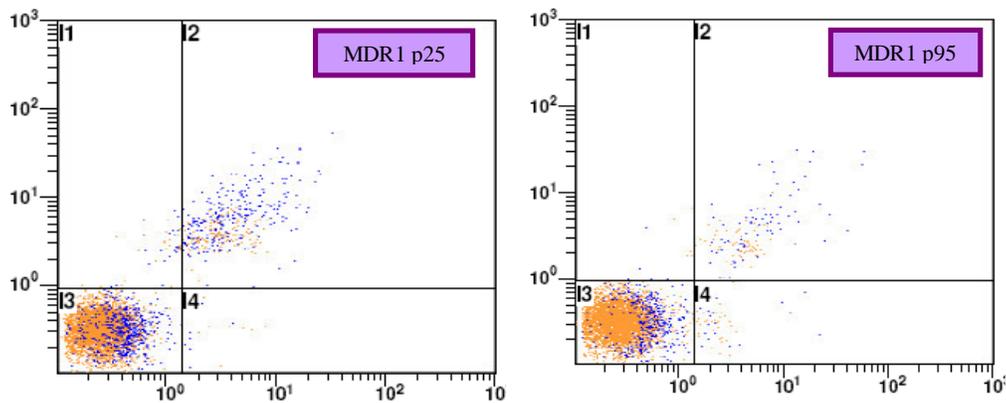


Figura IV. 39 Representación gráfica del resultado de la citometria de flujo de las células MDCK-MDR1 pase 25 (inicial) y el pase 95 (final).

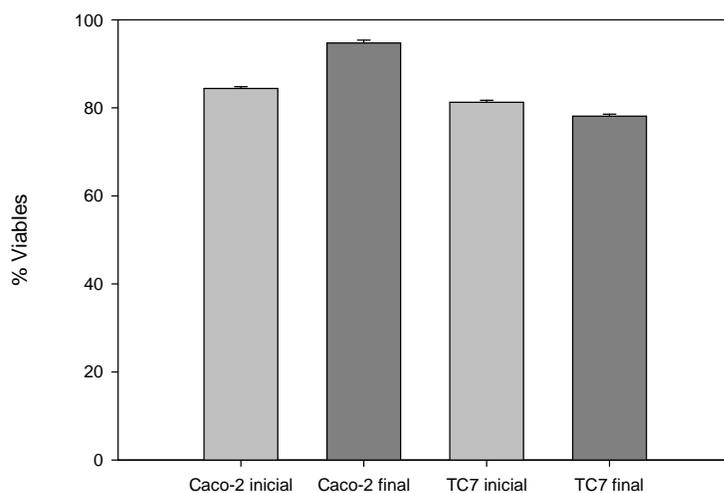


Figura IV. 40 Representación gráfica del porcentaje de células viables en las líneas celulares Caco-2 y TC7 en los pases inicial y final.

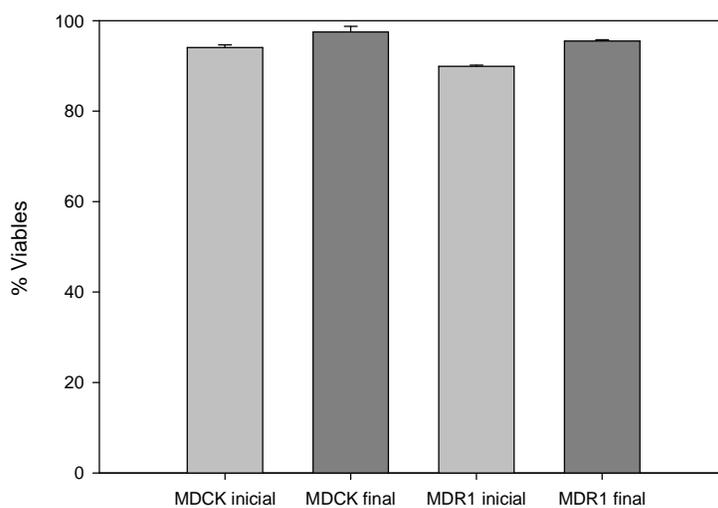


Figura IV. 41 Representación gráfica del porcentaje de células viables en las líneas celulares MDCK y MDCK-MDR1 en los pases inicial y final.

Con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los porcentajes de células viables en el pase final y en el pase inicial se procedió a realizar la prueba t de Student para cada línea celular.

Línea celular	t	Grados de libertad	Sig.
Caco-2	-23,574	4	0,000
TC7	8,634	4	0,001
MDCK	-4,321	4	0,012
MDCK-MDR1	-26,462	4	0,000

Tabla IV.308 Prueba de t de Student para la comparación de los porcentajes de células viables en los pases final e inicial en las diferentes líneas celulares.

E. Validación de los métodos analíticos

Con el fin de validar las concentraciones obtenidas durante el proceso de valoración de las muestras se realizaron estudios de linealidad a las curvas de calibración utilizadas para valorar las muestras en cada técnica empleada. Puesto que la ordenada en el origen es distinta de cero se utilizaron las curvas con ordenada para obtener los valores de concentración a cada ensayo.

1. Validación de los ensayos *in situ*

En las Tablas IV. 309 y IV. 310 se detallan los valores de la ordenada en el origen y la pendiente, y sus errores estándar (ES), y el coeficiente de

correlación (r^2) de las rectas empleadas para cada compuesto en los ensayos *in situ*.

METOPROLOL				
Validación de los ensayos <i>in situ</i>. Linealidad				
ordenada	ES	pendiente	ES	r
$1,37 \cdot 10^8$	$4,63 \cdot 10^6$	$1,56 \cdot 10^6$	$1,37 \cdot 10^8$	0,99
$1,68 \cdot 10^7$	$3,47 \cdot 10^6$	$2,05 \cdot 10^6$	$5,23 \cdot 10^4$	0,99
$2,11 \cdot 10^6$	$1,13 \cdot 10^6$	$1,61 \cdot 10^6$	$2,30 \cdot 10^4$	0,99
$1,80 \cdot 10^6$	$5,08 \cdot 10^5$	$1,79 \cdot 10^6$	$1,03 \cdot 10^4$	1,00
$2,04 \cdot 10^6$	$9,78 \cdot 10^5$	$1,76 \cdot 10^6$	$1,99 \cdot 10^4$	0,99

Tabla IV. 309 Ensayo de linealidad de las curvas de calibración empleadas en para valoración de las muestras obtenidas en los ensayos *in situ* de metoprolol $100 \mu\text{M}$.

VERAPAMILO				
Validación de los ensayos <i>in situ</i>. Linealidad				
ordenada	ES	pendiente	ES	r
$3,36 \cdot 10^6$	$7,92 \cdot 10^6$	$4,91 \cdot 10^6$	$1,19 \cdot 10^5$	0,99
$1,04 \cdot 10^6$	$3,91 \cdot 10^6$	$5,00 \cdot 10^6$	$5,88 \cdot 10^4$	0,99
$1,47 \cdot 10^6$	$2,24 \cdot 10^6$	$5,06 \cdot 10^6$	$4,12 \cdot 10^4$	0,99
$5,79 \cdot 10^6$	$5,69 \cdot 10^6$	$4,19 \cdot 10^6$	$8,56 \cdot 10^4$	0,99
$4,87 \cdot 10^6$	$2,57 \cdot 10^6$	$5,00 \cdot 10^6$	$3,86 \cdot 10^4$	0,99

Tabla IV. 310 Ensayo de linealidad de las curvas de calibración empleadas en para valoración de las muestras obtenidas en los ensayos *in situ* de verapamilo $100 \mu\text{M}$.

En las Tablas IV.311 y IV.312 se detallan los resultados de los ensayos de precisión y exactitud realizados sobre tres patrones de concentración conocida a través del error absoluto (E_a) y error relativo (E_r %). En la Tabla IV. 313 se presentan los límites de detección y cuantificación.

METOPROLOL								
Validación de los ensayos <i>in situ</i>. Exactitud y precisión								
P_{50%}	E_a	E_r (%)	P_{70%}	E_a	E_r (%)	P_{90%}	E_a	E_r (%)
49,49	0,51	1,02	70,23	0,23	0,33	90,23	0,23	0,26
53,02	3,02	6,04	72,06	2,06	2,95	89,56	0,44	0,49
52,49	2,49	4,98	71,51	1,51	1,36	88,78	1,22	1,36

Tabla IV. 311 Ensayo de exactitud y precisión de las curvas de calibración empleadas en la valoración de las muestras obtenidas en los ensayos *in situ* de metoprolol 100 μ M.

VERAPAMILO								
Validación de los ensayos <i>in situ</i>. Exactitud y precisión								
P_{50%}	E_a	E_r (%)	P_{70%}	E_a	E_r (%)	P_{90%}	E_a	E_r (%)
48,62	1,38	2,77	70,41	0,41	0,59	91,02	1,02	1,13
51,01	1,01	2,02	70,40	0,40	0,56	90,60	0,60	0,67
51,02	1,02	2,05	70,44	0,44	0,62	90,01	0,01	0,01

Tabla IV. 312 Ensayo de exactitud y precisión de las curvas de calibración empleadas en la valoración de las muestras obtenidas en los ensayos *in situ* de verapamilo 100 μ M.

Validación de los ensayos <i>in situ</i>			
METOPROLOL		VERAPAMILO	
Límite de detección	Límite de cuantificación	Límite de detección	Límite de cuantificación
9,83	29,78	5,32	16,12
5,60	16,97	2,58	7,81
2,31	7,00	1,46	4,43
1,83	5,54	4,47	13,56
0,93	2,83	1,69	5,13

Tabla IV. 313 Límites de detección y cuantificación en μM de la técnica empleada para la determinación de la constante aparente de velocidad de absorción *in situ* de ambos compuestos.

1. Validación de los ensayos *in vitro*

En las Tablas IV. 314 y IV. 315 se detallan los valores de la ordenada en el origen y la pendiente, y sus errores estándar (ES), y el coeficiente de correlación (r^2) de las rectas empleadas para cada compuesto en los ensayos *in vitro*.

METOPROLOL				
Validación de los ensayos <i>in vitro</i>. Linealidad				
ordenada	ES	pendiente	ES	r
$1,42 \cdot 10^7$	$3,07 \cdot 10^6$	$4,68 \cdot 10^6$	$6,24 \cdot 10^4$	0,99
$1,54 \cdot 10^7$	$3,22 \cdot 10^6$	$4,84 \cdot 10^6$	$5,95 \cdot 10^4$	0,99
$4,59 \cdot 10^5$	$3,47 \cdot 10^6$	$4,66 \cdot 10^6$	$7,04 \cdot 10^4$	0,99
$4,53 \cdot 10^6$	$2,48 \cdot 10^6$	$4,02 \cdot 10^6$	$4,81 \cdot 10^4$	0,99
$5,51 \cdot 10^6$	$1,90 \cdot 10^6$	$4,93 \cdot 10^6$	$3,67 \cdot 10^4$	1,00

Tabla IV. 314 Ensayo de linealidad de las curvas de calibración empleadas en para valoración de las muestras obtenidas en los ensayos *in vitro* de metoprolol $100 \mu\text{M}$.

VERAPAMILO				
Validación de los ensayos <i>in vitro</i>. Linealidad				
ordenada	ES	pendiente	ES	r
$2,06 \cdot 10^6$	$4,67 \cdot 10^6$	$3,83 \cdot 10^6$	$9,04 \cdot 10^4$	0,99
$2,81 \cdot 10^6$	$1,54 \cdot 10^6$	$4,05 \cdot 10^6$	$2,98 \cdot 10^4$	1,00
$2,75 \cdot 10^6$	$1,91 \cdot 10^6$	$4,16 \cdot 10^6$	$4,45 \cdot 10^4$	0,99
$1,23 \cdot 10^6$	$5,68 \cdot 10^6$	$7,68 \cdot 10^6$	$1,10 \cdot 10^5$	0,99
$2,35 \cdot 10^6$	$6,21 \cdot 10^6$	$7,48 \cdot 10^6$	$1,20 \cdot 10^5$	0,99

Tabla IV. 315 Ensayo de linealidad de las curvas de calibración empleadas en para valoración de las muestras obtenidas en los ensayos *in vitro* de verapamilo $100 \mu\text{M}$.

En las Tablas IV.316 y IV.317 se detallan los resultados de los ensayos de precisión y exactitud realizados sobre tres patrones de concentración conocida a través del error absoluto (E_a) y error relativo (E_r %). En la Tabla IV. 318 se presentan los límites de detección y cuantificación.

METOPROLOL								
Validación de los ensayos <i>in vitro</i> . Exactitud y precisión								
P _{50%}	E_a	E_r (%)	P _{70%}	E_a	E_r (%)	P _{90%}	E_a	E_r (%)
52,55	2,55	5,10	71,84	1,84	2,63	88,83	1,16	1,29
50,51	0,51	1,02	69,79	0,21	0,31	90,01	0,01	0,01
46,41	3,59	7,18	72,60	2,60	3,71	91,82	1,82	2,02

Tabla IV. 316 Ensayo de exactitud y precisión de las curvas de calibración empleadas en la valoración de las muestras obtenidas en los ensayos *in vitro* de metoprolol 100 μ M.

VERAPAMILO								
Validación de los ensayos <i>in vitro</i> . Exactitud y precisión								
P _{50%}	E_a	E_r (%)	P _{70%}	E_a	E_r (%)	P _{90%}	E_a	E_r (%)
54,91	4,91	9,82	69,63	0,37	0,53	87,40	2,60	2,89
49,32	0,68	1,36	71,74	1,74	2,48	89,73	0,27	0,30
49,44	0,56	1,12	71,82	1,82	2,59	89,46	0,54	0,60

Tabla IV. 317 Ensayo de exactitud y precisión de las curvas de calibración empleadas en la valoración de las muestras obtenidas en los ensayos *in vitro* de verapamilo 100 μ M.

Validación de los ensayos <i>in vitro</i>			
METOPROLOL		VERAPAMILO	
Límite de detección	Límite de cuantificación	Límite de detección	Límite de cuantificación
2,17	6,57	4,02	12,18
2,20	6,65	1,26	3,80
2,46	7,44	1,52	4,60
2,04	6,18	2,44	7,40
1,27	3,85	2,74	8,30

*Tabla IV. 318 Límites de detección y cuantificación en μM de la técnica empleada para la determinación del coeficiente de permeabilidad efectiva *in vitro* de ambos compuestos.*

Los métodos analíticos empleados en este trabajo han demostrado ser suficientemente selectivos y sensibles para la correcta cuantificación del metoprolol y del verapamilo, a su correspondiente concentración.

V. Discusión

El presente trabajo de investigación forma parte de un proyecto cuyo objetivo final es caracterizar la variabilidad asociada a los experimentos de perfusión *in situ* en rata e *in vitro* en cultivos celulares en distintos laboratorios y estimar cuales son los factores principales responsables de la misma. Con esta información será posible establecer de qué modo pueden estandarizarse y/o ponderarse los distintos resultados si se conoce el protocolo experimental.

Con este fin se ha caracterizado la permeabilidad intestinal de dos fármacos modelo, metoprolol y verapamilo, en cinco razas de rata utilizando en

ambas machos y hembras y en 4 líneas celulares utilizando distintos pases, es decir monocapas celulares formadas en un rango de generaciones entre 10 y 80.

Se seleccionó metoprolol porque es el patrón utilizado para clasificar los compuestos en alta o baja permeabilidad y verapamilo como conocido sustrato de Glicoproteína-P.

A. Diseño de los ensayos *in situ*

Los modelos animales no son siempre los más apropiados para el estudio de la absorción intestinal, ya que su uso conlleva implicaciones logísticas, económicas e industriales. En muchas ocasiones los ensayos *in vitro* son más baratos que los *in vivo*, y sobre todo, permiten emitir resultados con mucha mayor rapidez, lo cual presenta un gran aliciente para las industrias.

Modelos experimentales para el estudio de la absorción intestinal

Figura V. 1. Esquema de las ventajas e inconvenientes de los distintos sistemas experimentales

La ventaja de los métodos *in situ* es que mantienen las características propias de la realidad fisiológica en el animal completo, como puede ser la capa de mucus, la presencia de los movimientos peristálticos o de las secreciones intestinales.

Por ello, en función del número de compuestos a estudiar y del objeto concreto del estudio de absorción se seleccionan unos u otros. No existe el método perfecto, sino el adecuado para cada objetivo experimental.

1. Condiciones experimentales

En la primera fase de este trabajo de investigación se han utilizado 5 razas distintas de rata, usando grupos de 6 a 8 animales machos y grupos de 6 a 8 animales hembras de cada raza. Los fármacos modelo se han perfundido a una concentración de 100 μM con el objetivo de comparar los valores de la constante de velocidad de absorción para cada grupo y ver si existen diferencias entre las distintas razas y entre ambos sexos.

Las 5 razas de rata seleccionadas fueron: Wistar Han TM, Wistar Unilever, Sprague Dawley[®]TM, Long-Evans y CD*IGS.

Las dos razas de Wistar y las Sprague Dawley son las utilizadas de manera más habitual en la industria y en las universidades para realizar estudios de absorción y de cribado de nuevas moléculas¹⁶⁶⁻¹⁶⁹. Las Long Evans son ampliamente utilizadas en estudios de comportamiento y las CD*IGS en estudios de nutrición y obesidad¹¹⁹⁻¹²³.

2. Parámetros de absorción

Como parámetro representativo del proceso de absorción se ha utilizado la constante aparente de velocidad de absorción (K_{ap}), ya que es un índice de la velocidad de absorción intrínseca del soluto ($K_{ap} = (dA/dt)/A$). Esta constante aparente ha sido determinada *in situ* por el método de Doluisio y colaboradores¹²⁷. Este método se lleva a cabo sin recirculación, lo que evita la desorganización de la capa acuosa de difusión adyacente a la membrana. En el caso de que se

produjese este hecho, se alterarían las condiciones fisiológicas, que son imprescindibles para obtener la información más exacta posible a partir del ensayo.

Por otra parte se ha elegido este método porque se considera que, en general, los procedimientos *in situ* reproducen con más fiabilidad los procesos de absorción que tienen lugar *in vivo*. El volumen perfundido permanece todo el tiempo de ensayo (30 minutos) en contacto con la mucosa intestinal, por lo que el rendimiento de la absorción es mayor que el obtenido por otras técnicas, en las cuales el contacto fluido-mucosa es intermitente. Puesto que se realiza *in situ* permite un muestreo cómodo y reproducible. Además se mantienen condiciones de flujo sanguíneo e integridad tisular similares a las que prevalecen *in vivo*.

El método de trabajo empleado hace posible la obtención de constantes aparentes de velocidad de absorción sin que éstas estén limitadas por la disolución ni por otros factores físico-químicos o biológicos (como ocurre *in vivo* con el vaciado gástrico para compuestos de elevada velocidad de absorción). A su vez es posible transformar las constantes aparentes de velocidad de absorción de primer orden en valores de permeabilidad intestinal efectiva con el fin de posibilitar la comparación con los valores habituales referenciados en la bibliografía. La transformación de constantes en permeabilidades se realiza tomando como referencia la longitud intestinal media y el volumen perfundido de disolución¹⁶⁴.

La constante obtenida así como el valor de permeabilidad permite cuantificar el proceso de absorción en cada una de las situaciones analizadas.

Paralelamente al proceso de absorción del fármaco, en el tracto gastrointestinal se produce un proceso de reabsorción de agua. Este proceso sigue una cinética de orden cero. Es necesaria su cuantificación, ya que una reabsorción de esta magnitud o superior falsea por exceso las concentraciones del fármaco en lumen intestinal, sobre todo en las últimas muestras del ensayo, lo que origina constante de velocidad de absorción falseada por defecto. Este problema se ha solucionado corrigiendo individualmente la concentración de cada una de las muestras, en función del volumen de líquido remanente.

B. Diseño de los ensayos *in vitro*

El desarrollo de técnicas *in vitro* para el estudio de la permeabilidad intestinal ha constituido uno de los grandes avances de la Biofarmacia en la última década. Las monocapas de células de carcinoma de colon humano presentan la ventaja de crecer de forma polarizada formando una monocapa de características muy similares a la barrera intestinal. Estas células expresan además muchos de los portadores intestinales incluidos los portadores de secreción como la Glicoproteína P y, por lo tanto, constituye un buen modelo para caracterizar procesos de absorción y secreción activa.

Este modelo *in vitro* presenta la ventaja de ser más adecuado para el análisis simultáneo de un número elevado de moléculas (*highthroughput screening*), pero como todos los métodos *in vitro* pierde muchas de las características propias de la realidad fisiológica en el animal completo como puede ser la capa de mucus, la presencia de los movimientos peristálticos o de las secreciones intestinales¹⁴².

De todos los posibles modelos establecidos para el estudio de la permeabilidad intestinal se seleccionaron las líneas Caco-2/ATCC y TC7 y las líneas celulares MDCK y MDCK-MDR1, por ser las más utilizadas tanto a nivel industrial como para la investigación básica.

1. Condiciones experimentales

El sistema celular Caco-2 (células de carcinoma de colon humano) permite evaluar la capacidad de los fármacos para atravesar la barrera intestinal, así como el estudio de su mecanismo de transporte. Varios estudios que comparan el valor de permeabilidad *in vitro* Caco-2 (P_{ap}) con el correspondiente dato de absorción *in vivo* en humanos para un gran número de fármacos y compuestos con diferentes características físico-químicas han mostrado una elevada correlación entre datos *in vitro* e *in vivo*^{1, 12, 161-163}.

Las MDCK (Madin Darby canine kidney) son la línea celular epitelial más estudiada con respecto a su genética, composición lipídica, expresión de proteínas y otros parámetros. Las MDCK se utilizan en estudios de permeabilidad debido a su tiempo rápido de crecimiento y a que poseen valores de TEER bajos comparados con las Caco-2. Estas células con frecuencia son usadas para estudiar el mantenimiento y el desarrollo de la morfología epitelial polarizada y sus funciones¹⁸⁰.

La línea celular MDCK-MDR1 deriva de las MDCK transfectadas con el gen *mdr-1*, que codifica a la P-gp. Estas células expresan altos niveles de P-gp y se diferencian rápidamente¹⁵⁸. Las MDCK-MDR1 son extensamente usadas en la

evaluación de nuevos fármacos, y en el estudio de los mecanismos de interacción del fármaco y su absorción o transporte. Al poseer unos altos niveles de expresión de la P-gp es un buen modelo para detectar sustratos o inhibidores de este transportador¹⁵⁸.

El protocolo de trabajo utilizado mantiene el mismo pH en la cámara dadora y en la receptora, tanto en un sentido de transporte como en el otro. Determinados autores utilizan un pH en la cámara apical de 6.2 ya que consideran que ese valor se aproxima más al valor fisiológico en duodeno y yeyuno que son los lugares de absorción mayoritarios. No obstante se ha considerado que dado que los experimentos realizados en rata *in situ* se habían desarrollado a pH 7.00 era más adecuado mantener las mismas condiciones de ionización del compuesto ensayado para no incorporar más causas de variabilidad entre los dos sistemas que dificultaran la comparación de resultados. Por otro lado, el uso de un gradiente de pH en el cultivo celular implica que se generen diferencias en el porcentaje de fármaco ionizado en ambas cámaras, lo que condiciona diferencias en la permeabilidad Apical-Basolateral frente a la Basolateral-Apical, ya que el compuesto queda retenido en la cámara donde su grado de ionización es mayor.

Por ello, para estudios que intentan discernir la presencia de transportadores en base al ratio Pba/Pab es preferible utilizar protocolos en ausencia de gradiente de pH.

2. Parámetros de absorción

Como parámetro representativo del proceso de absorción *in vitro* se ha calculado el coeficiente de permeabilidad efectiva (Peff). Los valores de

permeabilidad se calculan por regresión lineal de las cantidades acumuladas de fármaco en el compartimento receptor frente al tiempo, de acuerdo con esta expresión $P_{eff} = b/S \cdot C$, donde (b) es la pendiente de la regresión, (S) la superficie de la monocapa y (C) la concentración en la cámara dadora.

La permeabilidad efectiva se ha determinado en los dos sentidos. Así se diferencia entre la permeabilidad en sentido Apical-Basolateral P_{AB} y la permeabilidad en el sentido contrario, P_{BA} , Basolateral-Apical.

El cociente de ambas permeabilidades R (P_{BA}/P_{AB}), proporciona una información muy útil acerca del mecanismo de transporte implicado en el proceso, siempre que las soluciones de las cámaras apical y basal estén ajustadas al mismo pH.

C. Validación de la técnica analítica

La valoración de ambos compuestos se ha realizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La detección se ha realizado por fluorescencia, gracias a la capacidad que presentan ambos compuestos de sufrir excitación a 307 nm el metoprolol y a 320 nm el verapamilo y de emitir a 231 nm el metoprolol y a 275 nm el verapamilo; esto dota de gran selectividad a la técnica, ya que reduce al mínimo la posible interferencia de compuestos endógenos presentes en las muestras biológicas que no poseen capacidad fluorescente.

Los resultados de la validación del método analítico se detallan en las Tablas IV. 309-318 y muestran que la concentración ensayada se encontró en todo momento por encima del límite de detección del método y dentro del ámbito de las rectas de calibración. Por otro lado la precisión y exactitud del método analítico se mantuvieron dentro de los límites recomendados, con valores de error relativo, representativos de la exactitud, menores al 5% y valores de coeficiente de variación, que informan de la precisión, menores al 15% ²¹³.

D. Interpretación de los resultados

1. Estudios en rata

1.1 Metoprolol

En la Tabla IV. 12 se muestra un resumen de las K_{ap} promedias para el metoprolol en las distintas razas y para machos y hembras. Esos mismos resultados se representan en la Figura IV. 1.

Con el fin de establecer si la especie y el sexo del animal empleado para los ensayos de absorción son factores que influyen en los valores de las constantes aparentes de velocidad de absorción (K_{ap}) obtenidos se procedió a realizar un análisis estadístico de comparación de las K_{ap} obtenidas para cada animal a una única concentración ensayada del compuesto.

En la Tabla IV. 13 se muestra el análisis de varianza de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ($\alpha=0.05$) que ponen de manifiesto la existencia

de diferencias significativas entre los valores de velocidad de absorción entre machos y hembras dentro de la raza CD*IGS. Cuando comparamos las K_{ap} entre machos y hembras dentro de las demás especies no se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

Al comparar las K_{ap} de machos y hembras de W. Unilever con las diferentes especies no se observan diferencias estadísticamente significativas con W. Han, Long Evans y CD*IGS exceptuando entre las hembras W. Unilever con hembras CD*IGS que sí mostraron diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a la comparación con Sprague Dawley sí existen diferencias entre hembras de W. Unilever con machos y hembras de Sprague Dawley, al igual que machos de W. unilever y hembras de Sprague Dawley, pero no se encontraron diferencias entre machos W. Unilever y machos Sprague Dawley (Tabla IV. 13).

Al comparar las K_{ap} de machos y hembras de W. Han con las diferentes especies no se observan diferencias estadísticamente significativas con Long Evans. Al comparar con CD*IGS, las únicas diferencias se encontraron entre machos de W. Han y hembras de CD*IGS. En cuanto a los machos y hembras de Sprague Dawley sí se mostraron diferencias significativas tanto con machos como con hembras de W. Han (Tabla IV. 13).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la constante de velocidad aparente obtenidas en los machos y hembras CD*IGS y los machos y hembras Long Evans. Sí que se observaron diferencias entre los machos CD*IGS y los machos y hembras Sprague Dawley, pero no entre las hembras CD*IGS y los machos y hembras Sprague Dawley (Tabla IV. 13).

Los valores de K_{ap} obtenidos en hembras Long Evans no mostraron diferencias con los valores de K_{ap} obtenidos en machos Sprague Dawley, pero sí con las K_{ap} de las hembras Sprague Dawley. Sí que se encontraron diferencias entre los machos Long Evans y los machos y hembras de Sprague Dawley (Tabla IV. 13).

Al comparar las dos razas de Wistar y las Sprague Dawley, que son las razas más utilizadas para realizar estudios de absorción, se observan diferencias significativas entre las Sprague Dawley y las Wistar tanto entre los machos como entre las hembras. En el único caso que no se aprecian diferencias estadísticamente significativas es entre los machos de Sprague Dawley y los machos de W. Unilever (Tabla IV. 13).

En la Tabla IV. 14 se muestran los coeficientes de variación (CV) de cada raza y sexo. Se observa que los machos pertenecientes a la raza CD*IGS son los que sufren mayor variabilidad en los resultados, en cambio las hembras de esta misma especie son las que muestran menor variabilidad. En el caso de las Wistar, tanto la Unilever como la Han, las hembras son casi el doble de variables que los machos. Lo contrario ocurre con las Long Evans, donde los machos son más variables que las hembras. Las Sprague Dawley no mostraron casi diferencias entre machos y hembras.

Finalmente en la Tabla IV. 15 se reflejan los coeficientes de variación obtenidos para cada raza, sin tener en cuenta el sexo. Se puede concluir que la raza más variable en este trabajo ha sido la CD*IGS, en cambio el resto de razas se han comportado igual de variables, dando valores de CV muy parecidos, aunque el de las Wistar Unilever es un poco más elevado.

En la Tabla IV. 16 se muestran los coeficientes de variación atendiendo únicamente al sexo y, como puede observarse en dicha tabla, tanto los machos como las hembras mostraron valores similares.

En resumen, dada la amplia utilización de ratas de raza Wistar para estudios de absorción, nuestros resultados parecen justificar la selección de machos para estos ensayos por presentar una menor variabilidad interindividual. Por otra parte, comparando las ratas Wistar con las Sprague Dawley, que son las razas más utilizadas en cribado de absorción, el valor de la constante de velocidad de absorción del metoprolol es similar en los machos de ambas razas lo que permitiría en principio la comparación y/o combinación de datos procedentes de ambos tipos de animales, dado además su modesto coeficiente de variación (alrededor del 10%).

En promedio la variabilidad de las Wistar se sitúa entre el 10-15% al igual que las Sprague y Long Evans mientras que las CD-IGS muestran una variabilidad mucho mayor que desaconsejaría su uso para caracterizar parámetros de absorción.

1.2 Verapamilo

En la Tabla IV. 27 se muestra un resumen de las K_{ap} promedias para el verapamilo en las distintas razas y para machos y hembras. Esos mismos resultados se representan en la Figura IV. 2.

Con el fin de establecer si la especie y el sexo del animal empleado para los ensayos de absorción son factores que influyen en los valores de las constantes aparentes de velocidad de absorción (K_{ap}) obtenidos se procedió a realizar un análisis estadístico de comparación de las K_{ap} obtenidas para cada animal a una única concentración ensayada del compuesto.

En la Tabla IV. 28 se muestra el análisis de varianza de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ($\alpha=0.05$) que ponen de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los valores de velocidad de absorción entre machos y hembras dentro de las razas W. Unilever, CD*IGS y Long Evans. Cuando comparamos las K_{ap} entre machos y hembras dentro de las demás especies (W. Han y Sprague Dawley) no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

Al comparar las K_{ap} de machos y hembras de W. Unilever con las diferentes especies no se observan diferencias estadísticamente significativas entre machos W. Unilever y machos CD*IGS y machos Long Evans. Con el resto sí que hay diferencias estadísticamente significativas. Las hembras W. Unilever mostraron diferencias con los machos CD*IGS, los machos Long Evans y con machos y hembra Sprague Dawley (Tabla IV. 28).

Las constantes de absorción obtenidas en machos W. Han mostraron diferencias estadísticamente significativas con machos CD*IGS y machos Long Evans. Lo mismo se observó con las constantes de absorción obtenidas en hembras W. Han que también mostraron diferencias estadísticamente significativas con machos CD*IGS y machos Long Evans (Tabla IV. 28).

Los valores de K_{ap} obtenidos en machos CD*IGS no mostraron diferencias significativas con los valores de K_{ap} de los machos Long Evans, pero sí con hembras Long Evans y con machos y hembras de la especie Sprague Dawley. Con los valores de K_{ap} obtenidos en hembras CD*IGS ocurre lo contrario, muestran diferencias estadísticamente significativas con los valores de la K_{ap} de machos Long Evans y no muestran diferencias con las hembras Long Evans y con machos y hembras de la especie Sprague Dawley (Tabla IV. 28).

Al comparar las K_{ap} obtenidas con machos Long Evans con las obtenidas con machos y hembras Sprague Dawley se encuentran diferencias estadísticamente significativas. Estas diferencias no se observan al comparar las K_{ap} de las hembras Long Evans con las obtenidas con machos y hembras Sprague Dawley (Tabla IV. 28).

Al comparar nuevamente las dos razas de Wistar y las Sprague Dawley, se observan diferencias significativas entre las Sprague Dawley y las W. Unilever tanto en machos como en hembras. En cambio, entre las Sprague Dawley y las W. Han no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos (Tabla IV. 28).

A la vista de los resultados, las diferencias halladas entre los valores de permeabilidad no son homogéneas entre razas ni género. No obstante los resultados de permeabilidad promedio para el compuesto de permeabilidad pasiva, metoprolol, son más parecidos, es decir, que al comparar los resultados se han encontrado menos diferencias significativas entre los distintos casos, que los de verapamilo para el que la diferente expresión del portador añade una fuente adicional de variación.

En el caso de las dos razas Wistar y la raza Long Evans los resultados son similares para el metoprolol, incluyendo los obtenidos con hembras que clásicamente se consideraban más variables, como puede observarse en la Tabla IV. 12. También se puede observar que los valores de permeabilidad que más difieren del resto se encuentran en la raza Sprague Dawley.

Para el verapamilo, los machos proporcionan resultados más heterogéneos, es decir, los valores de permeabilidad obtenidos para el verapamilo difieren entre las distintas razas, mientras que las hembras de las cinco razas ofrecen menos diferencias entre los valores de permeabilidad obtenidos, es decir, los resultados son menos variables entre ellos. En este caso, la raza Wistar Han es la que presenta los resultados menos divergentes cuando comparamos el valor de permeabilidad promedia obtenido tanto en machos como en hembras, conforme se refleja en la Tabla IV. 27.

En la Tabla IV. 29 se muestran los coeficientes de variación (CV) obtenidos para cada raza y sexo. Se observa que las hembras de la raza Wistar Unilever son las más variables, pero su valor de CV no difiere mucho del resto. En cambio, las Sprague Dawley macho son las menos variables con diferencia, ya que su valor de CV es muy inferior al de resto de razas y sexos. En el caso de las Wistar Unilever, las CD*IGS y las Sprague Dawley las hembras son más variables que los machos. En cambio, en las Wistar Han y las Long Evans los machos son más variables que las hembras.

En la Tabla IV. 30 se observan los coeficientes de variación obtenidos para cada raza sin tener en cuenta el sexo del animal. La raza más variable fue la

Wistar Unilever, en cambio la menos variable fue la Sprague Dawley, seguida de la Wistar Han. Las CD*IGS y las Long Evans resultaron casi igual de variables.

En la Tabla IV. 31 se muestran los valores de los coeficientes de variación obtenidos para cada sexo sin tener en cuenta la raza. En este caso, se observa que los machos son más variables que las hembras, dando un valor de CV casi el doble que el CV de las hembras.

La explicación posible para estas diferencias entre razas y sexos puede encontrarse en los niveles de expresión de portador, aspecto que se abordará en un estudio posterior. La hipótesis de partida que se puede extraer a partir de los datos experimentales es que en general las hembras presenten un mayor nivel de expresión del transportador que se traduciría en constantes de absorción más bajas y homogéneas, mientras que en los machos al ser el nivel de expresión más pequeño, también es más variable y ello se refleja en constantes más grandes pero con más variabilidad entre individuos.

2. Estudios en células

2.1 Metoprolol

Con el fin de determinar la variabilidad en la obtención del valor de permeabilidad del metoprolol se realizaron ensayos a una concentración de 100 μM en 4 líneas celulares (Caco-2, MDCK, TC7 y MDCK-MDR1) y en 8 pases distintos.

Como puede observarse en la Tabla IV. 69 los valores medios de permeabilidad en monocapas Caco-2 difieren entre los diferentes pases. Se detecta una mayor homogeneidad de los valores de permeabilidad entre los pases 58, 68, 78 y 88. Los valores que más difieren del resto son los obtenidos en el pase 38 (pase inicial).

El valor de la P_{eff} media en monocapas Caco-2 es $2,12 \cdot 10^{-5}$ cm/s conforme se aprecia en la Tabla IV. 170. Si se compara con los valores de la Tabla II.7, no se observan diferencias. En dicha tabla, se muestra el valor de la P_{eff} a diferentes concentraciones, calculados en diferentes laboratorios. Para la concentración ensayada en este trabajo (100 μ M) se encuentra en la bibliografía una P_{eff} de $2,16 \cdot 10^{-5}$ cm/s. Respecto a la variabilidad promedio obtenida en otros laboratorios frente a la obtenida en este trabajo, se observa que es de magnitud similar con valores interlaboratorio alrededor del 50% e intralaboratorio del 15%, frente al 11% obtenido en nuestra línea Caco-2.

En la Tabla IV. 102 se muestran los valores medios de permeabilidad obtenidos en monocapas TC-7. Como se puede observar, los valores de permeabilidad difieren entre los diferentes pases y también con los obtenidos en monocapas Caco-2.

Los valores medios de permeabilidad obtenidos en monocapas MDCK y MDCK-MDR1, se muestran en las Tablas IV. 135 y IV. 167, respectivamente. En ambas líneas celulares, los valores de la permeabilidad varían entre los diferentes pases.

Para determinar si estas diferencias observadas en los valores de permeabilidad obtenidos en las diferentes líneas celulares y a diferentes pases eran significativas se procedió a su análisis estadístico, mediante un análisis de varianza factorial univariante.

Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla IV. 168. Según se observa, el valor de permeabilidad de metoprolol cambia con los pases sucesivos, es decir, que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de permeabilidad obtenidos a diferentes pases celulares.

En cuanto a la línea celular, existen diferencias significativas entre las diferentes líneas, es decir, que cada línea obtiene valores de permeabilidad diferentes para el metoprolol.

Al estudiar el efecto de la interacción línea celular*pase, también se obtienen diferencias estadísticamente significativas, lo que significa que el valor de la permeabilidad del metoprolol cambia más en unas líneas celulares que en otras a medida que se van efectuando los pases. Como puede observarse en la Figura IV.16, las dos líneas celulares que muestran mayor variabilidad en los valores de permeabilidad Apical-Basolateral del metoprolol a los diferentes pases son Caco-2 y MDCK-MDR1. En cambio, MDCK es la línea celular que muestra menos diferencias entre los distintos pases. En la Figura IV.17 se muestran los valores de la permeabilidad Basolateral-Apical del metoprolol en las diferentes líneas celulares y a los distintos pases. En esta gráfica se aprecia que las Caco-2 y las MDCK-MDR1 son las que muestran más diferencias en el valor de la P_{BA} en los distintos pases y que las MDCK, nuevamente, son las que menos diferencias muestran.

La dirección del valor de permeabilidad (permeabilidad Apical-Basolateral vs permeabilidad Basolateral-Apical) no tiene efecto en global para las cuatro líneas celulares; pero cuando se deslinda por línea celular, es decir, estudiamos el efecto de la interacción dirección*línea sí que existen diferencias. Este efecto puede observarse mejor en las Figuras IV. 18, IV. 19, IV. 20 y IV. 21. En ellas podemos detectar que no hay diferencias significativas entre las permeabilidades apical- basolateral y Basolateral-Apical en las líneas celulares Caco-2 y MDCK, pero sí se observan pequeñas diferencias en las líneas TC-7 y MDCK-MDR1. Este último dato es desconcertante ya que el metoprolol es un compuesto que se transporta por difusión pasiva a través de la membrana celular y no es sustrato de la Glicoproteína-P, por tanto no se espera detectar diferencias en cuanto a la dirección del ensayo. No obstante, el ratio P_{BA}/P_{AB} no supera el valor de 2, que habitualmente se establece como límite para considerar que la P-gp podría estar implicada, ni está por debajo de 0,5 para suponer la presencia de un transportador de absorción. Esto apunta a la necesidad de fijar un valor límite para dichos ratios, pues es posible que por azar se detecten esas diferencias. Y en todo caso, la implicación del transportador habría que confirmarla realizando experimentos usando varias concentraciones iniciales.

En la Tabla IV. 169 se muestran los coeficientes de variación (CV) calculados para cada pase en las 4 líneas celulares. Como puede observarse, los valores de los CV son similares en los ocho pases, siendo los dos últimos pases un poco más variables que el resto.

Los CV calculados para las distintas líneas celulares se muestran en la Tabla IV. 170. La línea celular con menor CV fue MDCK (9,34), con lo cual se

considera la menos variable. Caco-2, TC7 y las MDCK-MDR1 poseen CV similares.

En cuanto a la variabilidad observada basándonos en la dirección del ensayo, los resultados de los CV se pueden observar en la Tabla IV. 171. La variabilidad es la misma en dirección Apical-Basolateral que en la Basolateral-Apical (CV=7,49).

Por último, en la Tabla IV. 172 se muestran los valores de los CV máximo y mínimos obtenidos para calcular la variabilidad dentro de los platos ensayados. El plato con mayor variabilidad fue el número 19 con un CV de 31,51 y el plato con menor CV fue el 2 (5,19).

2.2 Verapamilo

Con el fin de determinar la variabilidad en la obtención del valor de permeabilidad del verapamilo se realizaron ensayos a una concentración de 100 μ M en 4 líneas celulares (Caco-2, MDCK, TC7 y MDCK-MDR1) y en 8 pases distintos.

Como puede observarse en la Tabla IV. 205 los valores medios de permeabilidad en monocapas Caco-2 difieren entre los diferentes pases. Se detecta una mayor diferencia de los valores de permeabilidad en el pase 108 (pase final) con respecto a los demás pases.

En la Tabla IV. 238 se muestran los valores medios de permeabilidad obtenidos en monocapas TC-7. Como se puede observar, los valores de

permeabilidad difieren entre los diferentes pases, obteniendo un valor máximo de permeabilidad en el pase 105.

Los valores medios de permeabilidad obtenidos en monocapas MDCK y MDCK-MDR1, se muestran en las Tablas IV. 271 y IV. 298, respectivamente. En ambas líneas celulares, los valores de la permeabilidad varían entre los diferentes pases.

Para determinar si estas diferencias observadas en los valores de permeabilidad obtenidos en las diferentes líneas celulares y a distintos pases eran significativas se procedió a su análisis estadístico, mediante un análisis de varianza factorial univariante.

Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla IV. 299. Según se observa, el valor de permeabilidad del verapamilo cambia con los pases sucesivos, es decir, que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de permeabilidad obtenidos a diferentes pases celulares.

En cuanto a la línea celular, existen diferencias significativas entre las diferentes líneas, es decir, que cada línea obtiene valores de permeabilidad diferentes para el verapamilo, uno de los motivos es por la diferencia en los niveles de expresión de la Glicoproteína-P, ya que tanto la línea celular TC-7 como MDCK-MDR1 tienen una sobreexpresión de este transportador.

Al estudiar el efecto de la interacción línea celular*pase, también se obtienen diferencias estadísticamente significativas, lo que significa que el valor de la permeabilidad del verapamilo cambia más en unas líneas celulares que en

otras a medida que se van efectuando los pases, es decir, que la evolución de las permeabilidades en los distintos pases, es diferente según la línea. Como puede observarse en la Figura IV.30, las líneas celulares que muestran mayor variabilidad en los valores de permeabilidad Apical-Basolateral del verapamilo a los diferentes pases son Caco-2, TC7 y MDCK-MDR1. En cambio, MDCK es la línea celular que muestra menos diferencias entre los distintos pases. En la Figura IV.31 se muestran los valores de la permeabilidad Basolateral-Apical del verapamilo en las diferentes líneas celulares y a los distintos pases. En esta gráfica se aprecia que las Caco-2 son las que muestran más diferencias en el valor de la P_{BA} en los distintos pases y que las MDCK, nuevamente, son las que menos diferencias muestran.

La dirección del valor de permeabilidad (permeabilidad Apical-Basolateral vs permeabilidad Basolateral-Apical) sí tiene efecto en global para las cuatro líneas celulares. Cuando se deslinda por línea celular, es decir, estudiamos el efecto de la interacción dirección*línea sí que existen diferencias. Este efecto puede observarse mejor en las Figuras IV. 32, IV. 33, IV. 34 y IV. 35. En ellas podemos detectar que hay diferencias significativas entre las permeabilidades Apical- Basolateral y Basolateral-Apical en las 4 líneas celulares. En este caso, sí que existen diferencias en las 4 líneas a diferencia de lo que ocurría con el metoprolol donde sólo se detectaban en TC-7 y MDCK-MDR1. Este hecho se debe a que el verapamilo es sustrato de la Glicoproteína-P, con lo cual es lógico encontrar diferencias significativas entre los valores de la permeabilidad Apical-Basolateral y Basolateral-Apical.

En la Tabla IV. 300 se muestran los coeficientes de variación (CV) calculados para cada pase en las 4 líneas celulares. Como puede observarse, los

valores de los CV son similares excepto el pase 6 y 8 que son un poco más variables que el resto.

Los CV calculados para las distintas líneas celulares se muestran en la Tabla IV. 301. Las líneas celulares con mayor CV fueron Caco-2 y MDCK-MDR1. En cambio TC7 y MDCK presentaron CV menores.

En cuanto a la variabilidad observada basándonos en la dirección del ensayo, los resultados de los CV se pueden observar en la Tabla IV. 302. Se encuentra una mayor variabilidad en la dirección Apical-Basolateral que en la Basolateral-Apical.

Por último, en la Tabla IV. 303 se muestran los valores de los CV máximo y mínimos obtenidos para calcular la variabilidad dentro de los platos ensayados. El plato con mayor variabilidad fue el número 22 con un CV de 38,18 y el plato con menor CV fue el 91 (6,67).

Si se observan los datos promedios de este trabajo al respecto de este fármaco su valor en monocapas Caco-2 es $2,05 \cdot 10^{-5}$ cm/s según se aprecia en la Tabla IV. 301. Si se compara con los valores reportados en la bibliografía que se resume en la Tabla II.8, no se observan diferencias relevantes. En dicha tabla, se muestra el valor de la Peff a diferentes concentraciones, calculados en diferentes laboratorios. Para la concentración que se ha ensayado en este trabajo (100 μ M) el valor citado en la bibliografía es de $3,51 \cdot 10^{-5}$ cm/s. Respecto a la variabilidad promedia obtenida en otros laboratorios frente a la obtenida en este trabajo, al igual que se ha demostrado para el metoprolol, se observa que es de magnitud similar con valores interlaboratorio alrededor del 90% e intralaboratorio del 5%

(con algún caso excepcionalmente alto cuando los valores de expresión de Glicoproteína-P es pequeño³) frente al 11,7% obtenido en la línea Caco-2. Cabe destacar que para el verapamilo la variabilidad interlaboratorio es muy superior a la observada para el metoprolol debido posiblemente al factor nivel de expresión de la proteína transportadora.

3. Correlación de los resultados *in situ-in vitro*

Para obtener la relación entre la Peff obtenida en Caco-2 y la calculada mediante ensayos *in situ* en rata, para el metoprolol y el verapamilo, se ha calculado la Peff global en ratas para ambos compuestos y la Peff global en monocapas Caco-2. Para el metoprolol en ratas, se obtuvo una Peff media de $5,96 \cdot 10^{-5}$ cm/s. En Caco-2, esta Peff promedio fue de $2,12 \cdot 10^{-5}$ cm/s. Al calcular el ratio Peff rata / Peff Caco-2, obtenemos un valor de 2,81. En el caso del verapamilo, la Peff global en rata es de $7,99 \cdot 10^{-5}$ cm/s y la de Caco-2 es de $2,06 \cdot 10^{-5}$ cm/s. El ratio Peff rata / Peff Caco-2 es de 3,88. Este valor corresponde esencialmente a la diferencia en área de transporte en un sistema frente a otro. Se debe considerar que en el intestino de la rata están presentes los pliegues de Kerkring y los villi, mientras que en el modelo celular sólo se encuentran presentes los microvilli de cada enterocito. Ello se traduce en que existe una diferencia en cuanto al área transversal al transporte de la sustancia y se refleja en la diferente magnitud de las permeabilidades obtenidas con ambos modelos experimentales. Esta diferencia en otros trabajos realizados en este laboratorio con series homólogas de compuestos se sitúa en un valor alrededor de 4^{164, 171} lo que es consistente con los resultados obtenidos ahora.

Respecto a la capacidad discriminativa de ambos sistemas, se observa que los valores de P_{eff} de metoprolol y verapamilo en rata son claramente diferentes y superiores en el verapamilo que es la molécula de mayor lipofilia, mientras que en el modelo celular Caco-2 la discriminación entre ambos compuestos no es tan clara. Esta diferencia podría atribuirse a una mayor expresión de la Glicoproteína-P en el modelo Caco-2, que redujera el valor de P_{eff} , igualándolo con el de metoprolol. No obstante esta explicación no resulta suficiente ya que en los tres modelos celulares el cociente P_{BA}/P_{AB} a las concentraciones de verapamilo ensayadas es prácticamente uno con lo que el modelo está midiendo a efectos prácticos únicamente la permeabilidad difusional. La mayor restricción de la vía paracelular en el modelo Caco-2 y también para las otras líneas celulares, podría en parte explicar que el verapamilo fuera menos permeable en el sistema celular frente al modelo *in vivo*, y otra posible razón es que, superado el valor de permeabilidad de metoprolol, ya bastante elevado, el sistema pierda capacidad discriminativa debido a la limitación difusional de la capa acuosa estática. En otro trabajo de experimentación realizado en nuestro laboratorio con una serie homóloga de quinolonas de lipofilia creciente, se observó que al representar el valor de permeabilidad frente a la lipofilia se alcanzaba un valor asintótico para la P_{eff} debido a la resistencia de la capa acuosa incluso cuando los experimentos se realizan con la agitación orbital adecuada¹³⁷. El espesor de la capa de difusión en rata se estima alrededor de las 100 micras mientras que para el sistema Caco-2 bajo agitación de 50 rpm en placas de 6 pocillos. (Equivalente hidrodinamicamente a 100 rpm en placas de 12 pocillos) oscila alrededor de las 800 micras. Es decir un compuesto de lipofilia más elevada que el metoprolol se verá limitado en el modelo Caco-2 por la difusión acuosa mucho más que en el sistema *in vivo*, o lo que es lo mismo la capacidad discriminativa del sistema celular es menos para compuestos de elevada permeabilidad.

Uno de los objetivos de esta tesis ha sido caracterizar la variabilidad de los modelos experimentales por un lado a la vez que comparar las magnitudes de las P_{eff} obtenidas en nuestros modelos versus la de otros laboratorios con el fin de explorar la posibilidad de combinar datos de diferentes laboratorios e incluso de distintos modelos experimentales.

En la Tabla V. 1 se muestran valores de permeabilidad obtenidos en dos modelos celulares y en rata, utilizados para su correlación con los valores de fracción absorbida en humanos. Cabe destacar, a la vista de los resultados en nuestro laboratorio, que las variabilidades obtenidas en otros grupos de investigación para las permeabilidades en rata son sustancialmente mayores con un CV promedio de 60%, aunque en cuanto a magnitud para la P_{eff} de metoprolol, los valores son similares a los obtenidos en este trabajo ($5,9 \cdot 10^{-5}$ cm/s frente a $5,95 \cdot 10^{-5}$ cm/s). Ello apoya la hipótesis de que el método de perfusión *in situ* sin recirculación de Doluisio proporciona permeabilidades con menos variabilidad que el método usado en el mencionado trabajo, que fue el de perfusión de un solo paso (“single pass perfussion”), especialmente para compuestos de baja permeabilidad aunque las magnitudes del citado parámetro no sean tan diferentes.

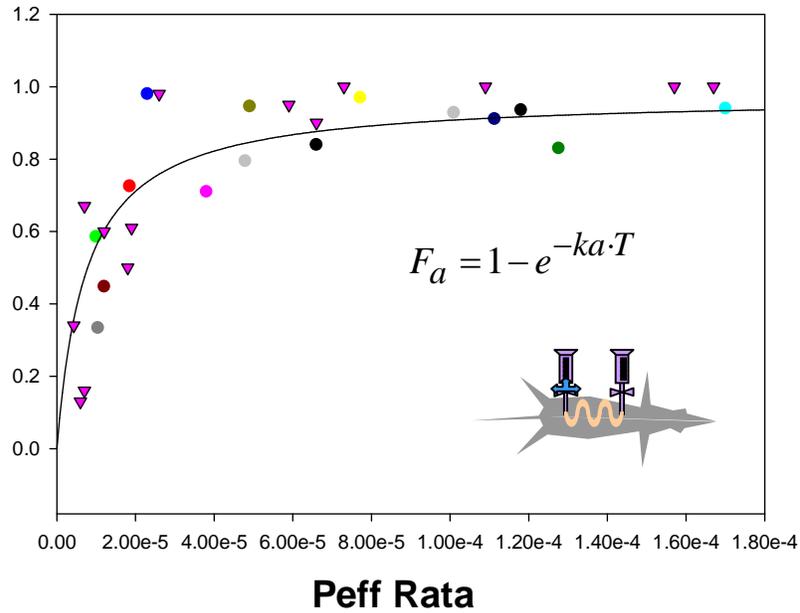
COMPUESTOS	Peff RATA (10 ⁻⁰⁴ cm/s)	Papp MDCK ^a (10 ⁻⁰⁴ cm/s)	Papp Caco-2 ^a (10 ⁻⁰⁴ cm/s)	Absorción en humanos ^b (%)
Aciclovir	0,07 ± 0,02	0,02 ± 0,02	No detectado	16 ^c
Antipirina	0,73 ± 0,02	1,50 ± 1,00	1,50 ± 0,12	100
Atenolol	0,18 ± 0,09	0,018 ± 0,009	0,033 ± 0,004	50
Cefalexino	0,26 ± 0,06	0,005 ± 0,002	0,003 ± 0,001	98
Dexametasona	1,57 ± 0,21	0,20 ± 0,02	0,40 ± 0,04	100
Furosemida	0,19 ± 0,72	0,006 ± 0,004	0,0014 ± 0,0001	61
Hidroclorotiazida	0,07 ± 0,03	0,010 ± 0,003	0,09 ± 0,04	67
Ketoprofeno	1,09 ± 0,72	0,20 ± 0,02	0,93 ± 0,10	100
Metoprolol	0,59 ± 0,13	1,50 ± 0,10	1,40 ± 0,10	95
Nadolol	0,043 ± 0,007	0,01 ± 0,04	0,004 ± 0,003	34
Naproxeno	1,67 ± 0,82	N.D.	N.D.	100
Propranolol	0,66 ± 0,29	1,70 ± 0,06	1,10 ± 0,13	90
Sulfasalacino	0,06 ± 0,03	0,005 ± 0,004	0,006 ± 0,011	13 ^d
Terbutalino	0,12 ± 0,09	0,010 ± 0,003	0,004 ± 0,002	60 ^e

Los valores de la permeabilidad efectiva (Peff) en rata están expresados en forma de media ± desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. ^a Irvine y col. (1999). ^b Wessel y col. (1998). ^c Obtenido de Glaxo Wellcome. ^d Artursson y Karlsson (1991). ^e Fagerholm y col. (1996). N.D. parámetro no determinado; Papp, permeabilidad aparente.

Tabla V. 1 Parámetros de absorción de 14 compuestos determinados en las líneas celulares MDCK y Caco-2, en perfusión intestinal en rata y en humanos.

(Tabla adaptada de Salphati y col.¹⁹⁹)

Por ejemplo en la siguiente figura se han superpuesto valores de permeabilidad obtenidos en rata con el método de perfusión in situ de un solo paso frente a valores obtenidos en nuestro laboratorio con el método de Doluisio. Como se observa, y en concordancia con lo anteriormente descrito sobre la magnitud de las permeabilidades obtenidas en este trabajo frente a los valores de la bibliografía, los valores de ambas especies son perfectamente combinables y de magnitud similar. Otro factor a destacar es que el en trabajo de Salphati y col. se utilizaron ratas Sprague Dawley, lo que asimismo apoya la hipótesis de que los resultados obtenidos en ambas razas son comparables y combinables cuando el mecanismo de absorción es la difusión pasiva.



- Sánchez-Castaño G. et al. *J Pharm Sci* 89(11) 1395-1403 (2000)
- ▼ Salphati L et al. *J Pharm Pharmacol* 2001, 53 1007-1013.

Figura V.2 Correlación entre los valores de permeabilidad efectiva en rata y la fracción oral absorbida (adaptada de Salphati y col.¹⁹⁹ y Sánchez-Castaño y col.¹³⁴)

4. Detección de la apoptosis por citometría de flujo

En este trabajo se ha cuantificado el porcentaje de apoptosis en células Caco-2, TC-7, MDCK y MDCK-MDR1 tanto en el pase inicial al que se comenzaban los ensayos como en el pase final, último pase utilizado para los ensayos, con el fin de detectar diferencias en cuanto al porcentaje de células viables a medida que se suceden los pases celulares.

En las Tablas IV. 304, IV. 305, IV. 306 y IV. 307 se exponen el porcentaje de células positivas en anexinaV-FITC, es decir los porcentajes correspondientes a los cuadrantes superior derecho, e inferior derecho de los gráficos posteriores, o lo que es lo mismo las células que se encuentran en situación de apoptosis temprana y apoptosis tardía; el porcentaje de células que sufren necrosis que incluyen IP y el porcentaje de células viables que no unen anexina y excluyen IP.

En la Tabla IV. 304 se observa que el porcentaje de células que sufren apoptosis y necrosis, en la línea celular Caco-2, disminuye del pase inicial al pase final, habiendo en el pase 108 un porcentaje de células viables del 95% aproximadamente, mientras que en el pase 38 el número de células viables no supera el 85%.

En la Tabla IV. 305, donde se representan los resultados de TC7, se observa lo contrario; el porcentaje de células viables es menor en el pase final (78% aproximadamente) que en el pase inicial (alrededor del 81%).

En la Figura IV. 38 se representa el porcentaje de células viables en el pase inicial y final, en las líneas celulares Caco-2 y TC7.

El porcentaje de células viables en MDCK, que se representan en la Tabla IV. 306, es mayor en el pase final (pase 95) con respecto al pase inicial (pase 25) debido, en mayor parte, a que el número de células que sufren apoptosis tardía disminuye de un 4% aproximadamente en el pase inicial a un 1,5% en el pase final. El porcentaje de células que sufren apoptosis temprana y necrosis también disminuye considerablemente.

En la Tabla IV. 307 se muestra el caso de la línea celular MDCK-MDR1, donde también se observa que el porcentaje de células viables aumenta, pasando de un 90% en el pase 25 (inicial) a casi un 96% en el pase 95 (final). El número de células que sufren apoptosis tardía y necrosis disminuye del pase inicial al pase final, pero si nos fijamos en la apoptosis temprana, el porcentaje es mayor en el pase final que en el pase inicial, aunque sigue siendo un porcentaje muy bajo, alrededor del 1% de las células en el pase final sufren apoptosis temprana.

En la Figura IV. 41 se observa como hay un aumento del número de células viables en el pase final con respecto al pase inicial tanto en las MDCK como en las MDCK-MDR1.

Como se ve, en todas las líneas celulares, a medida que se suceden los pases, el porcentaje de células viables aumenta, exceptuando la línea celular TC7 donde se observa el fenómeno contrario.

Para comprobar si las diferencias observadas en el porcentaje de células viables entre el pase final e inicial eran significativas, se procedió a realizar la prueba estadística de la T-student en las diferentes líneas celulares. Conforme se aprecia en la Tabla IV. 308, en las cuatro líneas celulares, estas diferencias son estadísticamente significativas. Por lo tanto, será más conveniente usar pases más elevados para la realización de ensayos de absorción en las líneas celulares Caco-2, MDCK y MDCK-MDR1. En cambio, en cuanto a la línea celular TC7, sería mejor usar pases menos elevados.

VI. Conclusiones

En este trabajo se ha procedido a la caracterización de la variabilidad asociada a los experimentos de perfusión *in situ* en rata e *in vitro* en cultivos celulares en nuestro laboratorio. Estimar cuales son los factores principales responsables de la misma. Para ello se ha caracterizado la influencia de la raza y el sexo en animales, y del pase, la línea celular y la dirección del ensayo en experimentos *in vitro*.

Ensayos en intestino completo de rata:

1. Para un fármaco modelo de difusión pasiva no se observan, en general, diferencias significativas en la magnitud de la constante de velocidad de absorción asociadas al sexo del animal. Pero dado que la variabilidad asociada a las hembras es en casi todas las razas superior, se confirma que la elección de ratas macho para la realización de estudios de absorción permite obtener parámetros más precisos.
2. El verapamilo, como modelo de fármaco sustrato de un transportador, presenta en intestino completo de rata diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la constante de velocidad de absorción entre machos y hembras, excepto para las razas Wistar Han y Sprague Dawley. Es decir, para fármacos con mecanismos de absorción mediados por transportadores es relevante la selección de la raza y del sexo del animal.
3. En el caso del verapamilo, en promedio, los machos presentan coeficientes de variación más elevados que las hembras entre todas las razas utilizadas.
4. Los machos de las razas Wistar Unilever y Wistar Han presentan una menor variabilidad interindividual, lo que convierte a dichas razas en un modelo adecuado para la realización de estudios de absorción.
5. Los machos de las razas Wistar y de las Sprague Dawley, que son las más utilizadas en cribado de absorción, presentan un valor de la constante de

velocidad de absorción del metoprolol similar, lo que permitiría en principio la comparación y/o combinación de datos procedentes de ambos tipos de animales.

Ensayos *in vitro* en cultivos celulares:

6. El valor de permeabilidad del metoprolol y el verapamilo cambia con los pases sucesivos y con las líneas celulares. Ello sustenta la recomendación de restringir los experimentos a un ámbito de 10 pases cuando se pretende comparar o combinar resultados.
7. La variabilidad promedia (considerando distintos pases, líneas celulares y platos) es del 10% en ambos compuestos, y por tanto, similar a la obtenida en el modelo animal. Ello demuestra que el trabajo con protocolos estandarizados permite, al menos dentro de un laboratorio, mantener la precisión de los resultados.
8. El efecto dirección sólo se observa como significativo para el verapamilo como sustrato de la Glicoproteína-P.

Citometría de flujo:

9. El análisis cuantitativo de la apoptosis mediante citometría de flujo muestra que hay una disminución del porcentaje de células que sufren apoptosis del pase inicial al pase final en Caco-2, MDCK y MDCK-MDR1, mientras que en la línea celular TC7 ocurre lo contrario.

VII. Objetivos futuros

Los objetivos futuros de este trabajo de investigación son continuar con el proyecto en el que se pretende caracterizar la variabilidad asociada a los experimentos de perfusión *in situ* en rata y modelos de cálculo de permeabilidad en cultivos celulares en distintos laboratorios.

Uno de estos objetivos es cuantificar la cantidad de Glicoproteína-P presente en cada pase celular ensayado en las cuatro líneas celulares utilizadas en los experimentos *in vitro*. Para ello se realizarán técnicas de Western Blot y de microarrays para calcular tanto la cantidad de proteína expresada como la cantidad de RNAm que codifica a dicha proteína.

Otro de los objetivos es realizar ensayos de permeabilidad en las cuatro líneas celulares en el pase inicial, medio y final usando diversos compuestos: Lucifer Yellow, Rodamina, Cefadroxilo y Quinidina, con el fin de explorar las diferencias en la vía paracelular, transcelular y las asociadas a la expresión de transportadores de absorción y secreción.

VIII. Bibliografía

1. Artursson P, Palma K, Luthmanb K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; **46**: 27-43.
2. Usansky HH, Sinko PJ. Estimating human drug oral absorption kinetics from Caco-2 permeability using an absorption-disposition model: Model development and evaluation and derivation of analytical solutions for k_a and F_a . *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **314** (1): 391-399.
3. Shirasaka Y, Kawasaki M, Sakane T, Omatsu H, Moriya Y, Nakamura T, Sakaeda T, Okumura K, Langguth P, Yamashita S. Induction of human P-

- glycoprotein in Caco-2 cells: development of a highly sensitive assay system for P-glycoprotein-mediated drug transport. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006; **21**(5): 414-23.
4. Bock U, Günday N, Haltner E. Comparison of MDCK cells transfected with the human MDR1 gene and the Caco-2 cell line as model of the human intestinal mucosa. *Póster Acrossbarriers*, Saarbrücken, Alemania (2009).
 5. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Ed. Springfield. Methuen, London (1959).
 6. Páez X. “Fisiología del aparato digestivo”. 2006. [Consulta: 4 abril de 2009] < <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/13295/1/p9.pdf> >
 7. Plá Delfina JM, Martín Villodre A. Absorción gastrointestinal. In: José Doménech Berrozpe, José Martínez Lanao, Plá Delfina JM, eds. *Biofarmacia y farmacocinética. Volumen II* 1998; 129 -143.
 8. Thews G, Mutschler E, Vaupel P. Tracto gastrointestinal y digestión. *Anatomía, Fisiología y Patología del hombre*. Barcelona: Reverté 1983; 358 - 360.
 9. Ballard ST, Hunter JH, Taylor AE. Regulation of tight-junction permeability during nutrient absorption across the intestinal epithelium. *Annu Rev Nutr* 1995; **15**: 35-55.

10. Mayerson M. Principles of drug absorption. In: Gs Banker, CT Rothers, eds. *Modern Pharmaceutics*. Nueva York: Marcel Dekker 1995: 21-74.
11. Jackson MJ. Drug transport across gastrointestinal epithelia. *Physiology of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press. 1987: 1597-1621.
12. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **175**: 880-885.
13. Sanchez-Picó A, Peris-Ribera JE, Toledano C, Torres-Molina F, Casabó VG, Martín-Villodre A, Plá-Delfina JM. Non-linear intestinal absorption kinetics of cefradoxil in the rat. *J Pharm Pharmacol* 1989; 41:179-185.
14. Cormet-Boyaka E, Huneau JF, Mondrelle A. Secretion of sparfloxacin from the human intestinal Caco-2 cell line is altered by P-glycoprotein inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; **42**: 2607-2611.
15. Plá Delfina JM, Pérez Buendía JM, Casabó VG, Martín Villodre A. Absorption-partition relationships for true homologous series of compounds as a possible approach to study mechanisms of surfactants in absorption I. *Int J Pharm* 1987; **37**: 49-64.
16. Shiau YF, Fernández P, Jackson MJ, McMonagle S. Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine. *Am J Physiol* 1985; **248**: 608-617.

17. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; **175**: 720-31.
18. “Diagrama detallado de la membrana plasmática.” [Consulta: 18 mayo de 2009] < http://212.170.234.76/wikiEducared/images/5/5b/Membrana_con_elementos.jpg >
19. Sjostrand FS. The ultrastructure of the plasma membrane of columnar epithelium cells of the Mouse intestine. *J Ultrastruct Res* 1963; **8**: 517-543.
20. Brasitas TA, Schachter D. Lipid dynamics and lipid-protein interactions in rat enterocyte basolateral and microvillus membranas. *Biochemistry* 1980; **19**: 2763-2769.
21. Hayton WL. Rate-limiting barriers to intestinal drug absorption: a review. *J Pharmacokinet Biopharm* 1980; **8**: 321-334.
22. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacología* 2003; 244-247.
23. Bradshaw DM, Arceci RJ. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J Clin Oncol* 1998; **16**: 3674-90.
24. Krishan A, Fitz CM, Andritsch I. Drug retention, efflux, and resistance in tumor cells. *Cytometry* 1997; **29**: 279-85.
25. Berndt WO. The role of transport in chemical nephrotoxicity. *Toxicol Pathol* 1998; **26**: 52 -7.

26. Baly DL, Horuk R. The biology and biochemistry of the glucose transporter. *Biochim Biophys Acta* 1988; **947**: 571-90.
27. Owens MJ, Nemeroff CB. The serotonin transporter and depression. *Depress Anxiety* 1998; **8 Suppl 1**: 5-12.
28. Reit ME, Xu C, Chen NH. Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter. *Eur J Pharmacol* 1997; **324**: 1-10.
29. Stainer RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. Entrada de nutrientes en la célula. *Microbiología*. Barcelona: Reverte 211-215.
30. Guyton AC, Hall JE. Transporte de iones y moléculas a través de la membrana celular. *Tratado de Fisiología Medica*. Madrid: Mc Graw-Hill interamericana 1999: 45-60.
31. Swaan PW, Oie S, Szoka Jr. FC. Carrier-mediated oral drug delivery. *Adv. Drug Del Rev* 1996; **20**: 1-4.
32. He L, Vasiliou K, Nebert DW. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum Genomics* 2009; **3**:195-206.
33. Terao T, Hisanaga E, Sai Y, Tamai I, Tsuji A. Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier. *J Pharm Pharmacol* 1996; **48**: 1083-9.

34. Piquette-Miller M, Pak A, Kim H., Anari R, Shahzamani A. Decreased expression and activity of P-glycoprotein in rat liver during acute inflammation. *Pharm Res* 1998; **15**: 706-11.
35. Benet LZ, Izumi T, Zhang Y, Silverman JA, Wacher VJ. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release* 1999; **62**: 25-31.
36. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 1996; **97**: 2517-24.
37. Chan LM, Lowe S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004 Jan; 21(1):25-51.
38. Debenham PG, Kartner N, Siminovitch L, Riordan JR, Ling V. DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression. *Mol Cell Biol* 1982; **2**: 881-9.
39. Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiol Rev* 2006; **86**: 1179-1236.
40. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993; **75**: 451-62.

41. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP. Response to antiretroviral treatment in HIV-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 2002; 30-36.
42. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **70**: 189-199.
43. Hoffmeyer S, Burk O, Von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2000; **97**: 3473-3478.
44. Ueda K, Taguchi Y, Morishima M. How does P-glycoprotein recognize its substrates?. *Semin Cancer Biol* 1997; **8**: 151-9.
45. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 361-98. Review.
46. Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SD. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 931-959.

47. Sun J, He ZG, Cheng G, Wang SJ, Hao XH, Zou MJ. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Med Sci Monit.* 2004 Jan; 10(1):RA5-14. Review.
48. Sankatsing SUC, Beijnen JH, Schinkel AH, Lange J, Prins JM. P-glycoprotein in human immunodeficiency virus type 1 infection and therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1073-1081.
49. Wachter VJ, Wu CY, Benet LZ. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog* 1995; **13**: 129-34.
50. Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 1996; **49**: 311-8.
51. Schuetz EG, Schinkel AH, Relling MV, Schuetz JD. P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 4001-5.
52. Kim RB, Wandel C, Leake B. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm Res* 1999; **16**: 408-14.
53. Dallas S, Miller DS, Bendayan R. Multidrug Resistance-Associated Proteins: Expression and Function in the Central Nervous System. *Pharmacol Rev* 2006; **58**:140-161.

54. Couture L, Nash JA, Turgeon J. The ATP-Binding Cassette Transporters and Their Implication in Drug Disposition: A Special Look at the Heart. *Pharmacol Rev* 2006; **58**: 244–258.
55. Deeley RG, Westlake C, Cole S. Transmembrane Transport of Endo- and Xenobiotics by Mammalian ATP-Binding Cassette Multidrug Resistance Proteins. *Physiol Rev* 2006; **86**: 849–899.
56. Bakos E, Evers R, Szakacs G. Functional multidrug resistance protein (MRP) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem* 1998; **273**: 32167-75.
57. Chan LM, Lowe S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004 Jan; 21(1):25-51.
58. Nutrition MaGGWUTN. Human ABC transporters. 2002.
59. Wijnholds J, Scheffer GL, van der Valk M *et al*. Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage. *J Exp Med* 1998; **188**: 797-808.
60. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 1295-302.

61. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; **204**(3):216-37.
62. Rao VV, Dahlheimer JL, Bardgett ME *et al.* Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood- cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 3900-5.
63. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1461**: 347-57.
64. Peng KC, Cluzeaud F, Bens M *et al.* Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney. *J Histochem Cytochem* 1999; **47**: 757-68.
65. Oude Elferink RP, Frijters CM, Paulusma C, Groen AK. Regulation of canalicular transport activities. *J Hepatol* 1996; **24 Suppl 1**: 94-9.
66. Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ *et al.* Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 1996; **271**: 1126-8.
67. Taniguchi K, Wada M, Kohno K *et al.* A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* 1996; **56**: 4124-9.

68. Mottino AD, Hoffman T, Jennes L, Vore M. Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **293**: 717-23.
69. Jeynes BJ, Altmann GG. A region of mitochondrial division in the epithelium of the small intestine of the rat. *Anat Rec* 1975; **182**: 289-96.
70. Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 1999; **55**: 929-37.
71. Kool M, de Haas M, Scheffer GL *et al.* Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1997; **57**: 3537-47.
72. Ohga T, Koike K, Ono M *et al.* Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer Res* 1996; **56**: 4224-8.
73. Rost D, Konig J, WeiSC G, Klar E, Stremmel W, Keppler D. Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia. *Gastroenterology* 2001; **121**: 1203-8.

74. Hirohashi T, Suzuki H, Sugiyama Y. Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem* 1999; **274**: 15181-5.
75. König J, Rost D, Cui Y, Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 1999; **29**: 1156-63.
76. Kool M, van der Linden M, de Haas M *et al.* MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 6914-9.
77. Scheffer GL, Kool M, de Haas M *et al.* Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab Invest* 2002; **82**: 193-201.
78. Belinsky MG, Bain LJ, Balsara BB, Testa JR, Kruh GD. Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**: 1735-41.
79. Kiuchi Y, Suzuki H, Hirohashi T, Tyson CA, Sugiyama Y. cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Lett* 1998; **433**: 149-52.
80. Kuroda M, Kobayashi Y, Tanaka Y, Itani T, Mifuji R, Araki J, Kaito M, and Adachi Y. Increased hepatic and renal expressions of multidrug resistance associated protein 3 in Eisai hyperbilirubinuria rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; **19**:146–153.

81. Bakos E, Evers R, Szakacs G *et al.* Functional multidrug resistance protein (MRP) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem* 1998; **273**: 32167-75.
82. Wijnholds J. Drug resistance caused by multidrug resistance-associated proteins. *Novartis Found Symp* 2002; **243**: 69-79; discussion 80-2, 180-5.
83. Van Aobel RA, Smeets PH, Peters JG, Bindels RJ, and Russel FG. The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**:595–603.
84. Leggas M, Adachi M, Scheffer GL, Sun D, Wielinga P, Du G, Mercer KE, Zhuang Y, Panetta JC, Johnston B. Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Mol Cell Biol* 2004; **24**:7612–7621.
85. Lai L and Tan TM. Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)-mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues. *Biochem J* 2002; **361(Pt 3)**: 497–503.
86. Lee K, Klein-Szanto AJ, Kruh GD. Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 1934-40.
87. Chen ZS, Lee K, Kruh GD. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6- thioguanine. *J Biol Chem* 2001; **276**: 33747-54.

88. Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 2000; **275**: 30069-74.
89. McAleer MA, Breen MA, White NL, Matthews N. pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 23541-8.
90. Maher JM, Cherrington NJ, Slitt AL, and Klaasen CD. Tissue distribution and induction of the rat multidrug resistance-associated proteins 5 and 6. *Life Sci* 2006; **78**:2219–2215.
91. Maher JM, Slitt AL, Cherrington NJ, Cheng X, and Klaassen CD. Tissue distribution and hepatic and renal ontogeny of the multidrug resistance-associated protein (Mrp) family in mice. *Drug Metab Dispos* 2005; **33**:947–955.
92. Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ *et al.* Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 2000; **25**: 228-31.
93. Belinsky MG, Kruh GD. MOAT-E (ARA) is a full-length MRP/cMOAT subfamily transporter expressed in kidney and liver. *Br J Cancer* 1999; **80**: 1342-9.

94. Beck K, Hayashi K, Nishiguchi B, Le Saux O, Hayashi M, and Boyd CD. The distribution of Abcc6 in normal mouse tissues suggests multiple functions for this ABC transporter. *J Histochem Cytochem* 2003; **51**:887–902.
95. Sinko E, Ilias A, Ujhelly O, Homolya L, Scheffer GL, Bergen AA, Sarkadi B, and Varadi A Subcellular localization and N-glycosylation of human ABCC6, expressed in MDCKII cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **308**:263–269.
96. Wang S, Yue H, Derin RB, Guggino WB, Li M. Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* 2000; **103**: 169-79.
97. Tammur J, Prades C, Arnould I *et al.* Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. *Gene* 2001; **273**: 89-96.
98. Linsdell P, Hanrahan JW. Adenosine triphosphate-dependent asymmetry of anion permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J Gen Physiol* 1998; **111**: 601-14.
99. Linsdell P, Hanrahan JW. Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* 1998; **275**: C323-6.
100. Suzuki T, Nishio K, Tanabe S. The MRP family and anticancer drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2001; **2**: 367-77.

101. Inagaki N, Gono T, Clement JP 4th *et al.* Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 1995; **270**: 1166-70.
102. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW *et al.* Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 1995; **268**: 423-6.
103. Fournet JC, Mayaud C, de Lonlay P *et al.* Unbalanced expression of 11p15 imprinted genes in focal forms of congenital hyperinsulinism: association with a reduction to homozygosity of a mutation in ABCC8 or KCNJ11. *Am J Pathol* 2001; **158**: 2177-84.
104. Bitner-Glindzicz M, Lindley KJ, Rutland P *et al.* A recessive contiguous gene deletion causing infantile hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher type 1C gene. *Nat Genet* 2000; **26**: 56-60.
105. Chutkow WA, Simon MC, Le Beau MM, Burant CF. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular KATP channels. *Diabetes* 1996; **45**: 1439-45.
106. Inagaki N, Gono T, Clement JP *et al.* A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* 1996; **16**: 1011-7.

107. Babenko AP, González G, Bryan J. Pharmacology of sulfonylurea receptors. Separate domains of the regulatory subunits of K (ATP) channel isoforms are required for selective interaction with K (+) channel openers. *J Biol Chem* 2000; **275**: 717-20.
108. Hopper E, Belinsky MG, Zeng H, Tosolini A, Testa JR, Kruh GD. Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett* 2001; **162**: 181-91.
109. Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchavaleva I, Belinsky MG, and Kruh GD. Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res* 2004; **64**:4927–4930.
110. Bera TK, Lee S, Salvatore G, Lee B, Pastan I. MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. *Mol Med* 2001; **7**: 509-16.
111. Bortfeld M, Rius M, König J, Herold-Mende C, Nies AT, and Keppler D. Human multidrug resistance protein 8 (MRP8/ABCC11), an apical efflux pump for steroid sulfates, is an axonal protein of the CNS and peripheral nervous system. *Neuroscience* 2006; **137**:1247–1257.
112. Yabuuchi H, Shimizu H, Takayanagi S, Ishikawa T. Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **288**: 933-9.

113. Bera TK, Iavarone C, Kumar V, Lee S, Lee B, Pastan I. MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 6997-7002.
114. Klein I, Sarkadi B, Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1461**: 237-62.
115. Balimane PV, Chong S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discov Today* 2005 Mar 1; 10 (5): 335-43. Review.
116. Cabrera MA, Ruiz A, Fernández C, González I, Bermejo M. A topological-substructural molecular design (TOPS-MODE) approach to determining pharmacokinetics and pharmacological properties of 6-fluoroquinolone derivatives. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; **56**: 197-206.
117. Cabrera MA, González I, Fernández C, Navarro C, Bermejo M. A topological substructural approach for the prediction of P-glycoprotein substrates. *J Pharm Sci* 2006; 95: 589-606.
118. Perez MA, Sanz MB, Torres LR, Avalos RG, Gonzalez MP, Diaz HG. A topological sub-structural approach for predicting human intestinal absorption of drugs. *Eur J Med Chem.* 2004 Nov; 39 (11): 905-16.
119. Harlan Búsqueda de modelos animales: Wistar Unilever” [Consulta: 16 junio de 2009]<http://www.harlan.com/research_models_and_services/research_models_by_product_type/outbred_rats/wistar_unilever_europe.hl>

120. Harlan “Búsqueda de modelos animales: Wistar Han” [Consulta: 16 junio de 2009]<http://www.harlan.com/research_models_and_services/research_models_by_product_type/outbred_rats/wistar_hannover.hl>
121. Harlan “Búsqueda de modelos animales: Sprague Dawley” [Consulta: 16 junio de 2009]<http://www.harlan.com/research_models_and_services/research_models_by_product_type/outbred_rats/sprague_dawley_sd.hl>
122. Harlan “Búsqueda de modelos animales: Long Evans” [Consulta: 16 junio de 2009]<http://www.harlan.com/research_models_and_services/research_models_by_product_type/outbred_rats/long_evans.hl>
123. Charles Criver “Búsqueda de modelos animales: CD*IGS” [Consulta: 16 junio de 2009]<<http://www.criver.com/enUS/ProdServ/ByType/ResModOver/ResMod/Pages/CDRat.aspx>>
124. Lennernas H. Intestinal permeability. *J Pharm Sci* 1998; **87**: 403-410.
125. Lennernas H, Ahrenstedt O, Hallgren R, Knutson L, Ryde M, Paalzow LK. Regional jejunal perfusion, a new in vivo approach to study oral drug absorption in man. *Pharm Res* 1992; **9**: 1243-1251.
126. Fleisher D. Gastrointestinal transport of peptides. En *Peptide-based drug design*, A.C.S. books, American Cherminal Society, Washington D.C. 1995; 500-523.

127. Doluisio JT, Billups HF, Dittert LW, Sugita ET, Swintosky JV. Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J Pharm Sci* 1969; **58**:1196-1200.
128. Schanker LS, Tocco DJ, Brodie BB, Hogben CAM. Absorption of drugs from rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 1958; **123**: 81-88.
129. Moll-Navarro MJ, Merino M, Casabó VG, Nácher A, Polache A. Interaction of taurine on baclofen intestinal absorption: a nonlinear mathematical treatment using differential equations to describe kinetic inhibition models. *J Pharm Sci* 1996; **85**: 1248-54.
130. Estrada E, Hernández M. Transporte activo. In: HM Blume, ed. *Cinética del transporte a través de membranas*. Madrid 1976: 37-71.
131. Ladu BN, Mandel HG, Way EL. Inhibition of enzyme systems. *Fundamentals of drug metabolism and drug disposition*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company 1972: 406-407.
132. González Álvarez I. *Estudio in situ e in vitro de los mecanismos de absorción y secreción intestinal del 3'metilciprofloxacino*. Valencia. Tesis doctoral 2002.
133. Bermejo M, Merino V, Garrigues TM *et al*. Validation of a biophysical drug absorption model by the PATQSAR system. *J Pharm Sci* 1999; **88**: 398-405.

134. Sanchez-Castaño G, Ruiz-Garcia A, Banon N *et al.* Intrinsic absolute bioavailability prediction in rats based on *in situ* absorption rate constants and/or *in vitro* partition coefficients: 6- fluoroquinolones. *J Pharm Sci* 2000; **89**: 1395-403.
135. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrana permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem* 1998; **41**: 1007-10.
136. Sugano K, Nabuchi Y., Machida M., Aso Y. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *Int J Pham* 2003; **257**: 245-251.
137. Bermejo M, Avdeef A, Ruiz A, Nalda R, Ruell JA, Tsinman O, González I, Fernández C, Sánchez G, Garrigues TM, Merino V. PAMPA- a drug absorption in vitro model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *Eur J Pharm Sci.* 2004; **21**: 429- 41.
138. Fan MZ, Adeola O, Mcburney MI, Chessemann CI. Kinectic analysis of L- glutamine transport into porcine jejunal enterocyte brush-border membrane vesicle. *Comp Biochem Physiol A Mol Intrgr Physiol* 1998, **121**: 411-422.
139. Koga K, Murakami M, Kawashima S. Effects of fatty acid sucrose esters on ceftibufen transport by rat intestinal brush-border membrane vesicle. *Biol Pharm Bull* 1998, **21**:747-751.

140. Stein J, Milovic V, Gerhard R, Caspary WF. Simultaneous preparation of rabbit intestinal brush border and basolateral membrane vesicles. *Res Exp Med (Berl)* 1994, **194**: 305-312.
141. Stewart BH, Chan OH, Lu RH. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: relationship to absorption in humans. *Pharm Res* 1995; **12**: 693-9.
142. Pagliara A, Reist M, Geinoz S, Carrupt PA, Testa B. Evaluation and prediction of drug permeation. *J Pharm Pharmacol* 1999; **51**: 1339-57.
143. Díez-Sampedro A, Pérez M, Cobo MT, Martínez JA, Barber A. Effect of different beta-adrenergic on the intestinal absorption of galactose and phenylalanine. *J Pharm Pharmacol* 1998; **50**: 907-11.
144. Stewart BH, Amidon GL, Brabec RK. Uptake of prodrugs by rat intestinal mucosal cells: mechanism and pharmaceutical implications. *J Pharm Sci* 1986; **75**: 940-5.
145. Audus KL, Bartel RL, Hidalgo IJ, Borchardt RT. The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharm Res* 1990; **7**: 435-51.
146. Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 1988; **48**: 1936-42.

147. Stewart BH, Cham OH, Jezyk N, Fleisher D. Discrimination between drug candidates using models for evaluation of intestinal absorption. *Adv Drug Del Rev* 1997; **23**: 27-45.
148. Delie F, and Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1997; **14**:221-286.
149. Artursson P. Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1991; **8**: 305-330.
150. Hillgren K, Kato A, Borchardt RT. In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Med Res Rev*1995; **15**: 83-109.
151. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*, 1997; 58: 209-214.
152. Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT -29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 1986; **68**:1035-1040.
153. Zweibaum A, Laburthe M, Louvard D. Use of culture cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. *Handbook of physiology. The gastrointestinal system*, American Physiology Society, Bethesda, MD 1991; 223-255.

154. Prueksaritanont T, Gorham LM, Hochman JH, Tran LO, Vyas KP. Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestinal, and in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos* 1996; **24**: 634-642.
155. Mehran M, Levy E, Bendeyan M, Seidman E. Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997; **33**: 118-128.
156. Van Beers EH, Ai RH, Rings EH, Einerhand AW, Dekker J, Buller HA. Lactase and sucrase-isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation. *Biochem J* 1995; **308**: 769-775.
157. Thews G, Mutschler E, Vaupel P. Tracto gastrointestinal y digestión. *Anatomía, Fisiología y Patología del hombre*. Barcelona: Reverté 1983: 358 - 360.
158. Braun A, Hämmerle S, Suda K, Rothen-Rutishauser B, Günthert M, Krämer SD, Wunderli-Allenspach H. Cell cultures as tools in biopharmacy. *Eur J Pharm Sci* 2000; **11**: 51-60.
159. González I, Fernández C, Garrigues TM, Casabó VG, Bermejo M. Kinetic modelling of passive transport and active efflux of a fluoroquinolone across Caco-2 cells using a compartmental approach in NONMEM. *Xenobiotica* 2005; **35** (12): 1067-1088.

160. Fernández C, González I, Casabó VG, Ruiz A, Bermejo M. Kinetic modelling of the intestinal transport of sarafloxacin. Studies in situ in rat and in vitro in Caco-2 cells. *J Drug Target* 2005; **13** (3): 199-212.
161. Stewart BH, Chan OH, Lu RH, Reyner EL, Schmid HL, Hamilton HW, Steinbaugh BA, Taylor MD. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: Relationship to absorption in humans. *Pharm Res* 1995; **12**: 693–699.
162. Cogburn JN, Donovan MG, Schasteen CS. A model of human small intestinal absorptive cells. 1. Transport barrier. *Pharm Res* 1991; **8**: 210–216.
163. Rubas W, Jezyk N, Grass GM. Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (Caco-2) cell line to colon of rabbit, monkey, and dog intestine and human drug absorption. *Pharm Res* 1993; **10**: 113-118.
164. González I, Fernández C, Casabó VG, Garrigues TM, Polli JE, Ruiz A, Bermejo M. In situ Kinetic Modelling of Intestinal Efflux in Rats: Functional Characterization of Segmental Differences and Correlation with in Vitro Results. *Biopharm Drug Dispos* 2007; **28**: 229–239.
165. Navarro C, González I, Casabó VG, Merino V, Bermejo M. Correlación entre modelos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* en estudios de absorción. *Med Uis* 2008; **21**: 17-31.

166. Varma VSM, Panchagnula R. Prediction of in vivo intestinal absorption enhancement on P-Glycoprotein inhibition, from rat in situ permeability. *J Pharm Sci* 2005; **94** (8): 1694-1704.
167. Kim JS, Mitchell S, Kijek P, Tsume Y, Hilfinger J, Amidon GL. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS Class I biowaiver requests. *Mol Pharm* 2006; **3** (6): 686-694.
168. Usansky HH, Hu P, Sinko PJ. Differential roles of P-Glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 2, and CYP3A on Saquinavir oral absorption in Sprague-Dawley rats. *Drug Metab Dispos* 2008; **36**: 863-869.
169. González I, González M, Oltra D, Merino V, Tökésic N, Ovádic J, Bermejo M. Unique pharmacology of KAR-2, a potential anti-cancer agent: Absorption modelling and selective mitotic spindle targeting. *Eur J Pharm Sci* 2009; **36**: 11-19.
170. Ruiz A, Bermejo M, Merino A, Sánchez G, Freixas J, Garrigues TM. Pharmacokinetics, bioavailability and absorption of flumequine in the rat. *Eur J Pharm Biopharm* 1999; **48**: 253-258.
171. Rodríguez M, Nalda R, Montalar M, Bermejo M, Merino V, Garrigues TM. Transintestinal secretion of ciprofloxacin, grepafloxacin and sparfloxacin: in vitro and in situ inhibition Studies. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; **55**: 241-246.
172. Volpe DA. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *J Pharm Sci* 2008; **97** (2): 712-725.

173. Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Expt Biol Med* 1997; **214**: 248-257.
174. Lu S, Gough AW, Bobrowski WF, Stewart BH. Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *J Pharm Sci* 1996; **85**: 270-273.
175. Yu H, Cook TJ, Sinko PJ. Evidence of diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharm Res* 1997; **14** (6): 757-762.
176. Arthur JM. The MDCK cell line is made up of populations of cells with diverse resistive and transport properties. *Tissue Cell* 2000; **32**: 446-450.
177. Neuhoff S, Artursson P, Zamora I, Ungell AL. Impact of Extracellular Protein Binding on Passive and Active Drug Transport Across Caco-2 Cells. *Pharm Res* 2006; **23**: 350-359.
178. D'Souza VM, Shertzer HG, Menon AG, Pauletti GM. High glucose concentration in isotonic media alters Caco-2 cell permeability. *AAPS PharmSci* 2003; **5**: article 24.
179. Bestwick CS, Milne L. Alteration of culture regime modifies antioxidant defenses independent of intracellular reactive oxygen levels and resistance to severe oxidative stress within confluent Caco-2 "intestinal cells". *Dig Dis Sci* 2001; **46**: 417-423.

180. Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, Grove JR. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J Pharm Sci* 1999; **88**: 28-33.
181. Hosoya HI, Kim KJ, Lee VHL. Age-dependent expression of P-glycoprotein gp170 in Caco-2 cell monolayers. *Pharm Res* 1996; **13**: 885-890.
182. Nagara N, Tavelin S, Artursson P. Contribution of the Paracellular Route to the pH-Dependent Epithelial Permeability to Cationic Drugs. *J Pharm Sci* 2004; **93**: 2972-2984.
183. Varma MVS, Panchagnula R. pH-Dependent Functional Activity of P-Glycoprotein in Limiting Intestinal Absorption of Protic Drugs: Kinetic Analysis of Quinidine Efflux in Situ. *J Pharm Sci* 2005; **94**: 2632-2643.
184. Johnson N, Lee KJ, Castelo J, Click K, Christopher R, Gordon P, Hollenbeck T, Moylan D, Ereso V, Holme K, Grass G, Sinko PJ, Lee YH. Impact of experimental conditions on in vitro permeability: (2) effect of pH, buffer and CO₂ incubation in Caco-2 cell. *AAPS PharmSci* 2001; **3**: abstract 723.
185. Neuhoff S, Ungell AL, Zamora I, Artursson P. pH-Dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions. *Pharm Res* 2003; **20** (8): 1141-1148.
186. Neuhoff S, Ungell AL, Zamora I, Artursson P. pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci* 2005; **25**: 211-220.

187. Sun D, Lennernas H, Welage LS, Barnett JL, Landowski CP, Foster D, Fleisher D, Lee KD, Amidon GL. Comparison of Human Duodenum and Caco-2 Gene Expression Profiles for 12,000 Gene Sequences Tags and Correlation with Permeability of 26 Drugs. *Pharm Res* 2002; **19**: 1400-1416.
188. Catálogo de medicamentos. Consejo general de colegios oficiales de farmacéuticos 2008.
189. Speight TM. Drug's, focus on metoprolol. *Adis International* 1986; **31**: 376-429.
190. Speight TM, Holford HG. Avery's drug treatment. *Adis International* 1997.
191. Vogelpoel H, Welink J, Amidon GL, Junginger HE, Midha KK, Möller H, Olling M, Shah VP, Barends DM. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on Biopharmaceutics Classification System (BCS) Literature Data: Verapamil Hydrochloride, Propranolol Hydrochloride, and Atenolol. *J Pharm Sci* 2004; **93**: 1945-1956.
192. Sorkin EM. Drug's, focus on verapamil. *Adis International* 1989; **38**: 19-76.
193. Karlsson J, Kuo SM, Ziemniak J, Artursson P. Transport of celiprolol across human intestinal epithelial (Caco-2) cells: mediation of secretion by multiple transporters including P- glycoprotein. *Br J Pharmacol* 1993; **110**: 1009-16.
194. Artursson P, Magnusson C. Epithelial transport of drugs in cell culture. II: effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of

- drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 1990; **79**: 595-600.
195. Gres MC, Julian B, Bourrie M, Meunier V, Roques C, Berger M, Boulenc X, Berger Y, Fabre G. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharm Res* 1998; **15**: 726-733.
196. Mandagere AK, Tompson TN, Hwang KK. Graphical model for estimating oral bioavailability of drugs in humans and other species from their Caco-2 permeability and in vitro liver enzyme metabolic stability rates. *J Med Chem* 2002; **45**: 304-311.
197. Korjamo T, Honkakoski P, Toppinen M, Niva S, Reinisalo M, Palmgren J, Mönkkönen J. Absorption properties and P-glycoprotein activity of modified Caco-2 cell lines. *Eur J Pharm Sci* 2005; **26**: 266-279.
198. Nalda Molina JR. *Permeabilidad de fármacos en cultivos celulares de carcinoma humano de colon (Caco-2): Puesta a punto de la técnica y determinación de la capacidad predictiva de la absorción*. Valencia. Tesis doctoral 2003.
199. Salphati L, Childers K, Pan L, Tsutsui K, Takahashi L. Evaluation of a single-pass intestinal-perfusion method in rat for the prediction of absorption in man. *J Pharm Pharmacol*. 2001; **53** (7):1007-13.

200. Hayeshi R, Hilgendorf C, Artursson P, Augustijns P, Brodin B, Dehertogh P, Fisher K, Fossati L, Hovenkamp E, Korjamo T, Masungi C, Maubon N, Mols R, Mullertz A, Monkkonen J, O'Driscoll C, Oppers-Tiemissen HM, Ragnarsson EG, Rooseboom M. and Ungell AL. Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories. *Eur J Pharm Sci.* 2008; **35**(5): 383-396.
201. Zakeri-Milania P, Valizadeha H, Tajerzadehc H, Azarmia Y, Islambolchilara Z, Barzegara S, Barzegar-Jalalia M. Predicting Human Intestinal Permeability using Single-pass Intestinal Perfusion in rat. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 2007; **10**(3):368-379.
202. Romiti N, Tramonti G, Donati A, Chieli E. Effects of grapefruit juice on the multidrug transporter P-glycoprotein in the human proximal tubular cell line HK-2. *Life Sci* 2004; **76**: 293–302.
203. Morishita T, Yamazaki M, Yata N, Kamada A. Studies on absorption of drugs. 8. Physicochemical factors affecting the absorption of sulfonamides from the rat small intestine. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1973; **21**: 2309-22.
204. Ruíz García A. *Predicción de la biodisponibilidad de nuevos fármacos mediante métodos in situ e in vitro (monocapas Caco-2) derivados del 3'metilciprofloxacino.* Valencia. Tesis Doctoral 2000.
205. Martín-Villodre A, Plá-Delfina JM, Moreno J. Studies on the reliability of a bihyperbolic functional absorption model. I. Ring-substituted anilines. *J Pharmacokinet Biopharm* 1986; **14**: 615-33.

206. Zúñiga JM, Orellana JM, Tur JA. Ciencia y tecnología del animal de laboratorio. Madrid: SECAL 2008.
207. Simione FP, Brown EM. *ATCC preservation methods*. Rokville: American Type Culture Collection 1991.
208. Janknegt R. Drug interactions with quinolones. *J Antimicrob Chemother* 1990; **26 Suppl D**: 7-29.
209. Kruse P, Patterson M. Tissue culture methods and applications. New York: Academia Press 1973: 471.
210. Hu M, Chen J, Tran D, Zhu Y, Leonardo G. The Caco-2 cell monolayers as an intestinal metabolism model: metabolism of dipeptide Phe-Pro. *J Drug Target* 1994; **2**: 79-89.
211. Hu M, Chen J, Zhu Y, Dantzig AH, Stratford RE Jr, Kuhfeld MT. Mechanism and kinetics of transcellular transport of a new beta-lactam antibiotic loracarbef across an intestinal epithelial membrana model system (Caco-2). *Pharm Res* 1994; **11**: 1405-13.
212. Hunter J, Hirst BH, Simmons NL. Epithelial secretion of vinblastine by human intestinal adenocarcinoma cell (HCT-8 and T84) layers expressing P-glycoprotein. *Br J Cancer* 1991; **64**: 437-44.

213. Herrera V, Ticona JC, Udaeta E, Chuqui R, Giménez A. Validación del método analítico para la cuantificación de alcaloides quinolínicos del extracto de *Galipea longiflora* Krause Kallunki. *Biofarbo* 2008; **16** (1): 47-53.