



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio farmacocinético de la cianamida en la rata, en el perro y en voluntarios sanos

Helena Colom Codina

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

70. P.N.

***ESTUDIO FARMACOCINETICO DE LA CIANAMIDA EN
LA RATA, EN EL PERRO Y EN VOLUNTARIOS SANOS***

HELENA COLOM CODINA

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700084104



El trabajo de la presente Memoria ha sido subvencionado por la beca nº
87/1404 otorgada por el FIS (1988-1989).

Los Doctores D. Rosendo Obach Vidal y D. José Domenech Berrozpe, en su calidad de Profesor Titular y Catedrático de Biofarmacia y Farmacocinética, respectivamente, de la Subunidad de Biofarmacia y Farmacocinética, del Departamento de Farmacia, de la División IV de Ciencias de la Salud, de la Universidad de Barcelona,

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral titulada "Estudio Farmacocinético de la cianamida en la rata, en el perro y en voluntarios sanos" ha sido realizada por la Licenciada en Farmacia, Helena Colom Codina, para optar al Grado de Doctor, ha sido desarrollada bajo su dirección y, concluido el desarrollo bibliográfico y experimental, autorizan su presentación para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Barcelona, Noviembre 1993.



Fdo.: Dr. Rosendo Obach Vidal



Fdo.: Dr. José Domenech Berrozpe

**SUBUNIDAD DE BIOFARMACIA Y FARMACOCINETICA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACIA, 1986-1988

**ESTUDIO FARMACOCINETICO DE LA CIANAMIDA EN LA RATA, EN
EL PERRO Y EN VOLUNTARIOS SANOS**

**Memoria presentada por HELENA COLOM CODINA, licenciada en Farmacia,
para optar al título de DOCTOR EN FARMACIA.**

**Memoria dirigida por los Doctores D. ROSENDO OBACH VIDAL y D. JOSE
DOMENECH BERROZPE.**

**HELENA COLOM CODINA
Barcelona, Noviembre 1993**

AGRAÏMENTS

Finalitzada aquesta Memòria, vull expressar el meu agraïment, especialment als Drs. Rossend Obach i Josep Domenech, directors de la mateixa, llur criteri, dedicació i constant recolzament en tots sentits així com llur aportació científica i advertències, han estat decisius a l'hora de fer possible aquest treball.

Al Dr. Joaquim Moreno pel seu esperit crític en la revisió de la Memòria, i a la Dra. Concepció Peraire per les seves constants mostres d'apreci i amistad, consells i ajuda en el desenvolupament d'aquest treball.

També el meu reconeixement a Laboratoris LASA S.A. per la facilitació de part del material emprat, així com de l'utilitatge necessari per dur a terme aquest treball i de la bibliografia sobre el tema.

Al Dr. Joan Pruñonosa pel seu constant ajut i assessorament oferts, així com a tots els meus companys de Laboratoris LASA perquè en tot moment m'han demostrat la seva companyonia.

A la Dra. Ana Calpena, al Dr. Jacinto Lauroba, a la Dra. Elvira Escribano i al Dr. Ignacio Díez pel seu suport durant la realització d'aquest treball.

A tots els que en algun moment han estat vinculats a la Subunitat de Biofarmàcia i Farmacocinètica des dels meus inicis en la mateixa.

A la Montserrat Rius i al José Antonio Cordero pel seu constant estímulo, confiança i amistat.

Als meus pares, a qui pertany aquest treball en la mateixa mesura que a mi.

Gràcies

Als meus pares i germans

INDICE

I.	INTRODUCCION	1
1.1.	Tendencias en el consumo de alcohol	1
1.2.	Marcadores bioquímicos, hematológicos y clínicos del alcoholismo	6
1.3.	Polimorfismo genético de la alcohol- y aldehído-deshidrogenasa hepáticas humanas y su relación con el metabolismo del alcohol y el alcoholismo	8
1.4.	Metabolismo del etanol	9
1.5.	Aldehído-deshidrogenasa	18
1.6.	Farmacocinética de la eliminación del etanol	21
1.7.	Hepatotoxicidad del alcohol	23
1.7.1.	Efectos mediados a través de la alcohol-deshidrogenasa	23
1.7.2.	Efectos tóxicos relacionados con el sistema microsomal de oxidación del etanol	25
1.7.3.	Incremento de la toxicidad debida a xenobióticos. Carcinogénesis. Interacción con las vitaminas liposolubles	25
1.7.4.	Efectos adversos del acetaldehído	27
1.7.4.1.	Formación de aductos y alteraciones microtubulares	27
1.7.4.2.	Promoción de la peroxidación lipídica e interacción con cisteína, glutatión y S-adenosil-L-metionina	28
1.7.5.	Alteraciones del metabolismo del colágeno	29
1.8.	Tratamiento de los problemas relacionados con el alcohol: fármacos tradicionales y nuevas tendencias	29
1.8.1.	Intoxicación alcohólica	30
1.8.2.	Síndrome de abstinencia	30
1.8.3.	Fármacos que reducen el consumo de alcohol	31
1.8.4.	Otras complicaciones clínicas	32

Indice

1.9.	Inhibidores de la aldehído-deshidrogenasa	33
1.9.1.	Cianamida	34
1.9.1.1.	Estudios farmacocinéticos	36
1.9.1.2.	Reacción cianamida-etanol	48
1.10.	Bibliografía	53
II.	OBJETIVOS	70
III.	MATERIAL Y METODOS	73
3.1.	MEDICAMENTO SELECCIONADO	73
3.1.1.	Estructura y propiedades físico-químicas	73
3.2.	ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION	75
3.2.1.	Estudio en la rata	75
3.2.2.	Estudio en el perro	76
3.3.	ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS Y FARMACODINÁMICOS EN EL HOMBRE	77
3.4.	TECNICAS BIOLÓGICAS	79
3.4.1.	MATERIALES	79
3.4.1.1.	Material	79
3.4.1.2.	Aparatos auxiliares	82
3.4.1.3.	Reactivos	84
3.4.1.4.	Soluciones para el ensayo	85
3.4.1.4.1.	Estudios en animales de experimentación	85
3.4.1.4.1.1.	Ensayos en la rata	86
3.4.1.4.1.2.	Ensayos en el perro	87
3.4.1.4.2.	Estudios en el hombre	87
3.4.2.	MÉTODOS	89
3.4.2.1.	Estudios en animales de experimentación	89
3.4.2.1.1.	Ensayos en la rata	89

	3.4.2.1.2. Ensayos en el perro	92
	3.4.2.2. Estudios en el hombre	94
3.5.	TECNICAS ANALITICAS	100
	3.5.1. Determinación de cianamida en plasma	101
	3.5.1.1. Preparación de las muestras	101
	3.5.1.1.1. Estudios en animales de experimentación	101
	3.5.1.1.2. Estudios en el hombre	101
	3.5.1.2. Preparación de las soluciones patrón	103
	3.5.1.3. Soluciones para el ensayo	104
	3.5.1.4. Descripción del método analítico . . .	105
	3.5.1.5. Validación de la metódica analítica .	112
	3.5.2. Determinación de la actividad de la aldehíodeshi- drogenasa en hematíes	123
	3.5.2.1. Preparación de las muestras	123
	3.5.2.2. Preparación de las soluciones para el ensayo	124
	3.5.2.3. Preparación de las soluciones patrón	128
	3.5.2.4. Descripción del método analítico . . .	129
	3.5.2.4.1. Reacción de obtención de DOPAC a partir de DOPAL .	130
	3.5.2.4.2. Valoración	131
	3.5.2.4.3. Validación de la metódica analítica	135
	3.5.2.4.4. Determinación de la con- centración de hemoglobina . . .	137
	3.5.2.4.5. Cálculos	138
3.6.	TRATAMIENTO DE LOS DATOS EXPERIMEN- TALES	140
	3.6.1. ESTUDIO FARMACOCINETICO	140
	3.6.1.1. Aproximación no compartimental . . .	141
	3.6.1.1.1. Bases del tratamiento far-	

	macocinético utilizado en la aproximación no compartimental	141
3.6.1.2.	Aproximación compartimental	153
3.6.1.2.1.	Análisis compartimental	153
3.6.1.2.2.	Modelado farmacocinético	155
3.6.1.2.2.1.	Administración intravenosa	157
3.6.1.2.2.2.	Administración oral	171
3.6.1.2.2.3.	Estudios de absorción. Determinación del grado de absorción	176
3.6.1.2.2.4.	Modelos no lineales	180
3.6.1.2.3.	Estimación de parámetros	182
3.6.1.2.3.1.	Métodos de regresión no lineal. Algoritmos de ponderación	182
3.6.1.2.3.2.	Algoritmos matemáticos utilizados en la estimación de parámetros	189
3.6.1.2.3.3.	Obtención de las estimas iniciales de los parámetros farmacocinéticos	194
3.6.1.2.3.4.	Bondad del ajustado y selección del modelo farmacocinético óptimo	197
3.6.1.2.3.5.	Programas utilizados en el ajustado de los datos experimentales	203
3.6.1.2.3.6.	Estudio de la linealidad cinética	215
3.6.2.	ESTUDIO FARMACODINAMICO	216
3.6.2.1.	Estudio de la respuesta farmacológica	216
3.6.2.2.	Ajustado de modelos cinético-dinámicos a los resultados experimentales	217
3.6.3.	METODOS ESTADISTICOS	225
3.7.	Bibliografía	228

IV.	RESULTADOS	233
4.1.	ESTUDIO FARMACOCINETICO EN LA RATA	233
4.1.1.	Niveles plasmáticos de fármaco	233
4.1.1.1.	Administración intravenosa	233
4.1.1.2.	Administración oral	234
4.1.2.	Tratamiento no compartimental de los datos ex- perimentales	236
4.1.3.	Tratamiento compartimental de los datos experi- mentales	238
4.1.3.1.	Administración intravenosa	238
4.1.3.1.1.	Elección del modelo farmacociné- tico óptimo	238
4.1.3.1.2.	Parámetros farmacocinéticos	239
4.1.3.2.	Administración oral	240
4.1.3.2.1.	Elección del modelo farmacociné- tico óptimo	240
4.1.3.2.2.	Parámetros farmacocinéticos	241
4.2.	ESTUDIO FARMACOCINETICO EN EL PERRO	241
4.2.1	Niveles plasmáticos de fármaco	241
4.2.1.1.	Administración intravenosa	241
4.2.1.2.	Administración oral	261
4.2.2.	Tratamiento no compartimental de los datos ex- perimentales	261
4.2.2.1.	Administración intravenosa	261
4.2.2.2.	Administración oral	270
4.2.3.	Tratamiento compartimental de los datos experi- mentales	271
4.2.3.1.	Administración intravenosa	271
4.2.3.1.1.	Elección del modelo farmacociné- tico óptimo	271
4.2.3.1.2.	Parámetros farmacocinéticos	274
4.2.3.2.	Administración oral	278

4.2.3.2.1. Elección del modelo farmacocinético óptimo	278
4.2.3.1.2. Parámetros farmacocinéticos	279
4.2.4. Estudio de la linealidad cinética	280
4.2.5. Cálculo de la Biodisponibilidad	286
4.3. ESTUDIOS EN EL HOMBRE	287
4.3.1. ESTUDIO FARMACOCINETICO EN EL HOMBRE	287
4.3.1.1. Niveles plasmáticos de fármaco	287
4.3.1.1.1. Infusión intravenosa	287
4.3.1.1.2. Administración oral	314
4.3.1.2. Tratamiento no compartimental de los datos experimentales	325
4.3.1.2.1. Estudio tras infusión intravenosa del fármaco	325
4.3.1.2.2. Administración oral	330
4.3.1.2.3. Estudio de la linealidad cinética	334
4.3.1.2.4. Cálculo de la Biodisponibilidad	337
4.3.1.3. Tratamiento compartimental de los resultados experimentales	339
4.3.1.3.1. Elección del modelo farmacocinético óptimo	339
4.3.1.3.2. Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la infusión intravenosa del fármaco	340
4.3.1.3.3. Estudio de la linealidad cinética	348
4.3.1.3.4. Administración oral	352
4.3.1.3.4.1. Cálculo del grado de absorción por el método de Loo-Riegelman	353

4.3.1.3.4.2. Tratamiento con Modelos que comportan pérdida de fármaco por efecto de primer paso en el lugar de absorción	362
4.3.2. ESTUDIO FARMACODINAMICO	373
4.3.2.1. Estudio de la actividad de la ALDH en sangre de voluntarios sanos	373
4.3.2.2. Ajustado de modelos cinético-dinámicos a los datos experimentales tras la administración oral de cianamida a voluntarios sanos	386
4.3.2.3. Estudio de correlación entre el comportamiento farmacocinético y el comportamiento farmacodinámico del fármaco en voluntarios sanos	394
V. DISCUSION	395
5.1. ESTUDIOS FARMACOCINETICOS	395
5.1.1. Estudios farmacocinéticos en el animal de experimentación	395
5.1.1.1. Estudio farmacocinético en la rata	395
5.1.1.2. Estudio farmacocinético en el perro	398
5.1.1.3. Comparación del comportamiento farmacocinético de la cianamida en la rata y en el perro	402
5.1.2. Estudios farmacocinéticos en el hombre	404
5.1.2.1. Disposición de la cianamida en el hombre	405
5.1.2.2. Estudio de la linealidad cinética	408
5.1.2.3. Comparación del comportamiento farmacocinético de la cianamida en el hombre y en el animal de experimentación (rata y perro)	409

Indice

5.1.2.4.	Estudios tras la administración oral de la cianamida en el hombre	413
5.2.	ESTUDIO FARMACODINAMICO	418
5.3.	CONCLUSIONES	425
5.4.	Bibliografía	429

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

1.1. Tendencias en el consumo de alcohol

En 1894 un médico sueco, Magnus Hauss, relacionó numerosas afecciones gastrointestinales, neurológicas, psicológicas y cardiológicas con la ingesta desmesurada de alcohol etílico; sin embargo, no será hasta después de la segunda guerra mundial cuando, gracias a los estudios de Jellinek de la escuela Francesa, se hablará del concepto de alcoholismo como enfermedad.

Estudios recientes llevados a cabo por " The Finnish Foundation for Alcohol Studies " de Finlandia (Pyörala, 1990), sobre las tendencias del consumo de alcohol en los países mediterráneos vinícolas (España, Portugal, Francia e Italia) desde principios de la década de los años 50 hasta los 80, indican que durante este tiempo el consumo de alcohol, en general, ha disminuido en España, Francia e Italia mientras que el consumo de vino se ha reducido en todos los países estudiados. De hecho la disminución observada en España, Portugal e Italia se debe a que el consumo tradicional de vino ha sido substituído por una nueva bebida con bajo contenido en alcohol, la cerveza, sin embargo en Francia dicha disminución no ha sido reemplazada por ninguna otra bebida alcohólica. Por otra parte, hay que destacar que si bien en Francia este fenómeno se ha venido observando ya desde los años 50, época en la que el consumo de vino en este país fue de aproximadamente 140 litros anuales per cápita, siendo los niveles de consumo actuales de 75 litros anuales per cápita, en España e Italia la reducción del consumo de alcohol no fue evidente hasta a partir de los años 70, habiendo experimentado un notable incremento desde los años 50 hasta los 70; concretamente, hacia mediados de los años 70 el consumo de vino alcanzó niveles per cápita de 75 y 115 litros en España e Italia, respectivamente. Estadísticas del año 1987 demuestran que el consumo per cápita, de vino, bebidas alcohólicas destiladas y cerveza en España, durante este año fue de 54.0, 3.0 y 64.5 litros, respectivamente; el consumo per cápita de vino en Italia fue de 79.0 litros. En la Tabla 1.1 se presentan los índices de

Introducción

consumo total de alcohol per cápita, expresado en términos de alcohol absoluto, en 30 países distintos, registrados durante el año 1987 (Pyörala, 1990).

Tabla 1.1. *Indices de consumo de alcohol total per cápita (litros) en 30 países distintos durante el año 1987.*

País	Consumo (l)	País	Consumo (l)
Francia	13.0	Checoslovaquia	8.6
Luxemburgo	13.0	Países Bajos	8.3
España	12.7	Nueva Zelanda	8.3
Suiza	11.0	Canadá	7.8
Hungría	10.7	Rumanía	7.6
Bélgica	10.7	USA	7.6
Alemania Federal	10.6	Yugoslavia	7.6
Portugal	10.5	Gran Bretaña	7.3
Alemania Democrática	10.5	Polonia	7.2
Italia	10.0	Finlandia	7.1
Austria	9.9	Japón	6.3
Dinamarca	9.6	Chipre	6.3
Bulgaria	8.9	Uruguay	5.5
Argentina	8.9	Suecia	5.4
Australia	8.8	Grecia	5.4

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, a pesar de que el consumo de alcohol y sus consecuencias parecen ser bastante considerables en España, poca es la atención que tradicionalmente se les había prestado. Aunque el Gobierno Español puso en funcionamiento un Plan Nacional sobre drogas (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1985) se presta más atención a las drogas ilícitas, y ello se debe probablemente a que el alcohol se considera como una droga de carácter social. Pero de hecho, ya sea desde el punto de vista médico, económico o social, las consecuencias del alcohol son mucho más costosas que

las de otras drogas; prueba de ello es que, según datos del año 1985, el 6 % de todas las muertes estaban relacionadas con el alcohol, ya fuese por enfermedad hepática o bien por accidente de tráfico y en otro estudio del año 1988 (Rodríguez y Camí, 1988) se vio que el 37.5 % de los enfermos del Hospital General de Barcelona eran alcohólicos o bebedores excesivos. Hasta hace poco, los estudios epidemiológicos sobre el tema eran escasos, pero parece que en la última década ha habido un cambio al respecto; de hecho, la mayor parte de datos se han obtenido a partir de estadísticas de producción más que de estudios epidemiológicos. Por otra parte, los pocos estudios existentes están de acuerdo con los cambios en las tendencias de consumo de alcohol descritos por Pyörala (Ministerio de sanidad y consumo, 1984; Queipo y col., 1986; Del Río y col., 1989; Alvarez y col., 1991). Efectivamente, dichos estudios confirman el establecimiento de la cerveza como bebida de preferencia, tanto entre jóvenes universitarios como entre adultos de edades comprendidas entre 14 y 30 años pertenecientes a la Comunidad de Castilla y León, un consumo de alcohol más extendido entre hombres que entre mujeres y en fines de semana más que durante la misma. Respecto a las estadísticas de producción, se ha visto que el consumo de alcohol per cápita se incrementó en más de un 200 % entre 1955 (9 litros de alcohol puro/año) y 1985 (20 litros/año). La ingesta de alcohol per cápita, desde 1980 a 1985, osciló de 19.4 litros/año en 1983, a 22.1 litros/año en 1982. Sin embargo, los datos obtenidos a partir de estudios epidemiológicos (8.1 litros/año, en 1980) (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1984) indicaron que el nivel de ingesta de alcohol era aproximadamente un 40 % del hallado a partir de las estadísticas de producción. Cabe señalar que en los últimos años las exportaciones de vinos y cavas al extranjero han experimentado un considerable aumento, hecho que edxplicaría las diferencias observadas.

Según un estudio sobre la prevalencia del consumo de alcohol, realizado en el marco de un estudio sobre la hipertensión arterial y otros factores de riesgo, en la comarca del Baix Ebre (Tarragona) (Espinás y col., 1989), son consumidores habituales de alcohol un 64.2 % del total de la población mayor

o igual a 20 años y, por sexos, el 79.4 % de los varones y el 48.2 % de las mujeres. Bajo la definición de bebedor excesivo lo son el 21.8 % de los varones y el 2.6 % de las mujeres. Los varones beben más cantidad de alcohol, con una media y desviación estándar de 47.1 ± 35.5 g/día, mientras que en las mujeres este valor es de 19.4 ± 12.4 g/día. Al mismo tiempo se observa un porcentaje de bebedores más elevado entre los individuos jóvenes, en los de situación laboral activa, en los de nivel socioprofesional medio y en los de nivel cultural medio y alto.

Según Conde y col. (Conde y col., 1990), uno de los problemas que se plantean al abordar estudios epidemiológicos sobre los trastornos alcohólicos, es el hecho de no utilizar criterios diagnósticos o definiciones suficientemente probadas por la psiquiatría actual (O.M.S., 1978; A.P.A., 1988), empleándose en su lugar clasificaciones ya superadas o, en el peor de los casos, simplemente criterios o términos propios o propuestos por las diversas escuelas y autores, siendo frecuentes, todavía, entre otras, las denominaciones de toxicomanía alcohólica, alcoholismo crónico, bebedor esporádico, etc. y que contribuyen sin duda a la dispersión de las cifras halladas al comparar la frecuencia de estos trastornos. Así, atendiendo a criterios cuantitativos, se establece un consumo a partir del cual existe un mayor riesgo de padecer las consecuencias orgánicas derivadas del mismo. Se ha propuesto 1 g/kg/día en el varón y 0.5 g/kg/día en la mujer y se considera bebedor excesivo o de riesgo al individuo que sobrepasa dicho consumo, constituyendo el principal grupo de riesgo en el desarrollo de la enfermedad. El DMS III (A.P.A), atendiendo a patrones de conducta frente al alcohol, distingue dentro del alcoholismo dos entidades diagnósticas: la primera de ellas es el abuso de alcohol caracterizado por un patrón de uso patológico y trastornos desadaptativos en el entorno familiar, social o laboral, de más de un mes de duración y la segunda, la dependencia al alcohol, si además existe abstinencia física.

Los mismos autores (Conde y col., 1990) hacen también referencia al sesgo que se produce en función del clínico o especialista que realiza la investigación, capaz de motivar lo que se conoce como "principio de economía diagnóstica" que lleva al clínico a reducir el problema a la especificación del diagnóstico "principal" desde el punto de vista de su especialidad, sin tener en cuenta los "secundarios".

En una encuesta formulada a médicos de atención primaria (Gili y col., 1990) para conocer los factores que influyen en la detección y tratamiento de pacientes con problemas relacionados con el alcohol, se comprobó que el número de pacientes diagnosticado estaba relacionado con la educación formal previa recibida sobre este tema. Los médicos estaban muy interesados en el problema y en sus soluciones, pero no estaban satisfechos ni se sentían gratificados con su trabajo. Los sentimientos gratificantes estaban directamente relacionados con la formación previa y los que se sentían más gratificados diagnosticaban más pacientes.

Según Muñoz y col. (Muñoz y col., 1989) una historia clínica en la que se recojan problemas de adaptación al medio laboral o familiar, antecedentes traumáticos, cambios de carácter o del humor, junto a una exploración en la que se contemplen signos físicos fuertemente relacionados con el consumo de alcohol, puede hacer sospechar la enfermedad antes de que esta se haga evidente. Dichos autores aconsejan la utilización del método propuesto por Skinner (Skinner, 1986) basado en datos de historia clínica y exploración física (índice clínico del alcohol) que demostró ser eficaz en la detección del alcoholismo y cuya aplicación sistemática en A.P.S. parece de utilidad. Sin embargo opinan que el ensayo MALT (Rodríguez Martos y col., 1981) sólo es un buen método para la confirmación diagnóstica en pacientes sospechosos de alcoholismo por datos de historia y/o exploración.

1.2. Marcadores bioquímicos, hematológicos y clínicos del alcoholismo

Se han llevado a cabo diversos estudios sobre la existencia de marcadores del alcoholismo, ya sean de tipo bioquímico, hematológico o bien clínico.

En un estudio llevado a cabo por el Medical Services Study Group of The Royal College of Physicians of London (Whitehead y col., 1978), para investigar el abuso de alcohol como una de las causas de muerte por debajo de los 50 años de edad, se vio que los niveles séricos de gamma-glutamyl-transpeptidasa (Γ -GT) aumentaban al incrementarse la ingesta de alcohol, si bien es cierto que dicho aumento podía también deberse a otras causas ya fueran de origen hepático (carcinoma hepático secundario) o extrahepático, como, por ejemplo, infecciones o tratamiento de las mismas, o simplemente a causas no aparentes. Sin embargo, cuando se observan además niveles séricos elevados de ácido úrico y de aspartato-transaminasa (AT), entonces es probable que los niveles elevados de Γ -GT sean también debidos a un elevado consumo de alcohol.

Por otra parte, se observó que una ingesta elevada de alcohol conllevaba un aumento del volumen celular medio en sangre, sin anemia aparente (Wu y col., 1974), siendo el mecanismo de ello todavía desconocido; el alcohol podría tener un efecto osmótico directo sobre los glóbulos rojos, pero parece improbable que se deba a una deficiencia de ácido fólico o vitamina B₁₂, puesto que el tratamiento con ácido fólico fue ineficaz y no se detectó deficiencia de vitamina B₁₂; además, la macrocitosis desapareció al suspenderse la ingesta de alcohol (Wu y col., 1974; Lindenbaum y Lieber, 1969; Wright y Lee, 1978). Sin embargo, cabe destacar que tras una ingesta elevada de alcohol los cambios observados fueron mucho más acentuados para la Γ -GT y AT que para el ácido úrico sérico y el volumen celular medio. Así pues, valores aislados elevados de los dos últimos parámetros, no son significativos si no van acompañados de un incremento en los valores de los dos primeros, en cuyo caso existe una gran

probabilidad de que las anomalías observadas se deban al alcohol. Como consecuencia, Γ -GT y AT pueden considerarse marcadores extraordinariamente sensibles, observándose niveles elevados de los mismos en individuos cuyo consumo de alcohol se encontraba dentro de los límites aceptados social y profesionalmente como normales.

En un trabajo posterior, Towell y col. (Towell y col., 1985a) intentaron correlacionar el descenso en los niveles de actividad de la aldehíodeshidrogenasa eritrocitaria de pacientes caucasianos de menos de 40 años hasta más de 60, procedentes de un centro de desintoxicación para alcohólicos, con 35 parámetros bioquímicos y hematológicos estándar, incluyendo los representativos de patología hepática debida al alcohol; concretamente, se determinaron, entre otros, los valores de glucosa, nitrógeno ureico sanguíneo (BUN), creatinina, Na^+ , K^+ , Cl^- , CO_2 , ácido úrico, Ca^{2+} , fosfato, las relaciones albúmina/globulinas, y creatina/BUN, proteínas totales, albúmina, colesterol, bilirrubina total, bilirrubina directa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT), glutamil-oxalacetato-transaminasa (SGOT), lactato-deshidrogenasa, globulinas, glóbulos blancos, glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media y plaquetas. El hecho de no haber observado correlación entre ellos o bien correlaciones demasiado bajas para poder hacer predicciones, sugirió que el descenso en la actividad de la aldehído-deshidrogenasa eritrocitaria podía ser indicador de un elevado consumo de alcohol, sin existencia de patología hepática asociada. Estudios efectuados por los mismos autores (Towell y col., 1984; Towell y col., 1985b) demostraron que la actividad de la ALDH eritrocitaria disminuía en pacientes tratados con fármacos antianginosos del tipo de los ésteres de nitrato y también con fármacos hipoglucemiantes del tipo de la sulfonilurea. Ambos tipos de tratamiento dan lugar a una reacción de tipo aversivo, como la que dan el disulfiram o la cianamida, inducida por el alcohol (Dipalma, 1982; Fitzgerald y col., 1962) y ello se debe a un incremento de la concentración de acetaldehído en sangre como consecuencia de la inhibición de la ALDH hepática (Brien y

Introducción

col., 1979). Por lo tanto, puesto que la ALDH eritrocitaria permite monitorizar "in vivo" la inhibición de la actividad de la ALDH hepática, el descenso de esta última no tiene porque correlacionarse tampoco con la magnitud de una posible patología hepática asociada.

1.3. Polimorfismo genético de la alcohol- y aldehído-deshidrogenasa hepáticas humanas y su relación con el metabolismo del alcohol y el alcoholismo

Tanto los diversos efectos farmacológicos del etanol como la adicción al consumo de alcohol, están relacionados con las concentraciones tisulares de alcohol o bien de sus metabolitos. El metabolismo oxidativo del etanol en el hígado está catalizado principalmente por la alcohol-deshidrogenasa (ADH) y la aldehído-deshidrogenasa (Figura 1.1). Ambas enzimas existen en múltiples formas moleculares, de forma que se han propuesto diversos modelos genéticos para poder explicar la multiplicidad de isoenzimas (Bosron y Li, 1986). Las subunidades de la alcohol-deshidrogenasa están codificadas por 5 locus de gen distintos y el polimorfismo genético se da en dos de los locus de la alcohol-deshidrogenasa. Los diferentes isoenzimas producidos por los dos locus polimorfos de la alcohol-deshidrogenasa, dan cuenta de las diferencias en el comportamiento electroforético del enzima observado en individuos distintos. Alguna de dichas variantes muestra propiedades cinéticas distintas y ello explica también las diferencias, en la velocidad de eliminación del etanol de un individuo a otro, con desviaciones de 2 a 3 veces. Puesto que ha sido posible conocer la secuencia de aminoácidos de varias subunidades de la alcohol-deshidrogenasa, y se han clonado varios de los genes codificadores de dicho enzima, también se han podido averiguar algunos de los cambios estructurales que dan lugar a las distintas propiedades catalíticas y electroforéticas del mismo.

También se ha observado polimorfismo genético a nivel de los locus de genes de la aldehído-deshidrogenasa, concretamente, los que codifican el isoenzima mitocondrial de baja K_m . Dicha variante presenta una actividad

catalítica muy baja o prácticamente nula. Los individuos con este isoenzima muestran niveles de acetaldehído en sangre más elevados de lo que cabría esperar y por lo tanto experimentan una reacción de tipo aversivo frente al alcoholismo. Estudios epidemiológicos han demostrado la existencia de una predisposición genética frente al abuso de alcohol, por lo que sería razonable suponer que el polimorfismo ya sea de la alcohol- o bien de la aldehído-deshidrogenasa, podría ser uno de los factores biológicos que contribuyeran a la naturaleza hereditaria de dicho fenómeno.

1.4. Metabolismo del etanol

Tal como se ha venido mencionando, el enfermo alcohólico sufre trastornos orgánicos y psíquicos. El alcohol ingerido no puede almacenarse en el organismo, constituyendo un aporte calórico que debe ser oxidado necesariamente. En la Figura 1.1, se muestran las etapas implicadas en el metabolismo del etanol, que en los mamíferos se dan principalmente en el hígado e involucran a dos sistemas enzimáticos (Hawkins y Kalant, 1972).

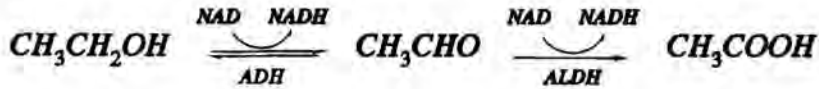


Figura 1.1. Esquema representativo del metabolismo del alcohol etílico.

Las alcoholdehidrogenasas citosólicas son unos de los enzimas responsables de la oxidación del etanol tanto en humanos como en animales de experimentación, siendo la etapa que catalizan la considerada limitante de la velocidad de oxidación del etanol "in vivo". Dichos enzimas constituyen de un 2 a un 3 % de las proteínas solubles presentes en el hígado humano en condiciones normales y se cree que juegan un papel importante en el metabolismo intermediario, aunque éste todavía se desconoce. Los isoenzimas de la ADH humana son codificados, como mínimo, por 5 locus de genes

Introducción

distintos (Bosron y Li, 1986) y se clasifican en tres clases diferentes en función de sus características de movilidad electroforética, propiedades inmunológicas, especificidad de sustratos y sensibilidad frente a sustancias inhibitoras (Valkonen y Goldman, 1988). Los genes que codifican las alcohol-deshidrogenasas de clase I (ADH1, ADH2 y ADH3) y el que codifica la de clase III (ADH5) pertenecen al cromosoma 4, mientras que se desconoce la localización del gen que codifica la alcohol-deshidrogenasa de clase II (ADH4). Las alcohol-deshidrogenasas que se conocen están formadas por dos subunidades, poseen tamaños moleculares, así como estequiometría de zinc, parecidos y también son comparables en cuanto a su unión al NADH y pH óptimo de oxidación de alcoholes.

Las alcohol-deshidrogenasas que pertenecen a la clase I presentan puntos isoeléctricos entre 9 y 11, son capaces de oxidar un amplio intervalo de sustratos, son inhibidas por pirazoles sustituidos en posición 4 y experimentan reacciones inmunológicas cruzadas (Bosron y col., 1983; Hempel y col., 1985). La alcohol-deshidrogenasa de clase II posee un punto isoeléctrico entre 8 y 9, se caracteriza por una mayor especificidad de sustrato y es menos sensible a la inhibición por pirazol que las de clase I. La clase III está constituida por isoenzimas aniónicas, insensibles al pirazol y de punto isoeléctrico de aproximadamente 6 (Pares y Vallee, 1981; Wagner y col., 1984). Las propiedades físicas de las ADH de clase III son similares a las de clase I y II, pero difieren en la especificidad de sustrato y en las características cinéticas. Los sustratos de las ADH de clase III son preferentemente alcoholes de cadena larga, de forma que no son saturadas por etanol hasta concentraciones de 2M (Wagner y col., 1984). Las ADH humanas de clase I y II presentan una similitud antigénica a la ADH de caballo; ello no ocurre con la ADH humana de clase III (Adinolfi y col., 1984).

Hasta hace poco, se creía que la principal vía del metabolismo hepático del etanol era la de la alcohol-deshidrogenasa, con una pequeña contribución por parte del enzima catalasa en los peroxisomas. Efectivamente, la oxidación del

etanol no asociada a la ADH que ocurría en otras fracciones subcelulares aisladas del hígado se atribuía a una reacción dependiente del peróxido de hidrógeno, mediada por una presunta contaminación del enzima catalasa de dichas fracciones. Por otro lado, se vio que dicha reacción presentaba más especificidad por el metanol que por el etanol o alcoholes de cadena más larga, y era extraordinariamente sensible frente a los inhibidores de la catalasa, como azida o cianuro (Orme-Johnson y Ziegler, 1965). El hecho de haber observado, tanto en la rata como en el hombre, que un consumo crónico de etanol iba acompañado de una proliferación de membranas microsomales, sugirió que los microsomas hepáticos podían constituir un sistema de oxidación del etanol, diferente al de la ADH y al de la catalasa. Efectivamente, esto se demostró "in vitro" (Lieber y De Carli, 1968, 1970), comprobándose, además, que la velocidad de oxidación del etanol, catalizada por el sistema microsomal de oxidación del etanol (SMOE), era unas 10 veces mayor que la observada por Orme-Johnson y Ziegler (Orme-Johnson y Ziegler, 1965) y que dicho sistema era dependiente del citocroma P450. Todo ello llevó a unos resultados que pueden resumirse en los siguientes puntos:

- a) el aislamiento de la fracción microsomal hepática que contenía el citocromo P450, sin presencia alguna de actividad ADH ni catalasa es susceptible de oxidar al etanol así como a alcoholes de cadena alifática más larga, como por ejemplo el butanol que no es sustrato de la catalasa (Teschke y col., 1972, 1974a; Mezey y col., 1973)
- b) la reconstitución del sistema de oxidación del etanol con NADPH-citocromo-P450-reductasa, fosfolípido y P-450 microsomal, ya sea parcial o bien altamente purificado, procedente de ratas no tratadas (Ohnishi y Lieber, 1977), ó bien de ratas pretratadas con fenobarbital (Miwa y col., 1978).

El consumo crónico de etanol es consecuencia de la inducción de un único P450, tal como han demostrado Ohnishi y Lieber (Ohnishi y Lieber, 1977)

utilizando una fracción de P450 microsomal hepático aislado de ratas pretratadas con etanol. También Koop y col. (Koop y col., 1982) aislaron un isoenzima de P450 de microsomas de hígado de conejos administrados de forma crónica con etanol; concretamente, se trataba del isoenzima 3a ó también denominado P450_{ALC} para indicar que el etanol se comporta ya sea como inductor ya sea como sustrato de dicho isoenzima. Dichos autores (Koop y col., 1982) prefieren la denominación de alcohol-P450-oxigenasa a la del sistema microsomal de oxidación del etanol (SMOE), utilizada en un principio por Lieber y De Carli (Lieber y De Carli, 1970); la razón de ello está en que el citocromo P450 no sólo se encuentra en los microsomas, sino también en las mitocondrias y en el núcleo; por otra parte, el etanol no es el único sustrato del sistema y los autores consideran también que el sistema queda así mejor definido desde un punto de vista bioquímico. Mediante ensayos de cuantificación inmunoquímica, se ha visto que el citocromo P450_{ALC} es inducido por otros agentes además del etanol, concretamente por imidazol (Koop y Coon, 1984), tricloroetileno, acetona, pirazol e isoniazida (Koop y col., 1985). Se desconoce el mecanismo por el cual los niveles de P-450_{ALC} son elevados. La inducción de dicha proteína podría ser consecuencia de un incremento del mARN traducible, de una estabilización del mARN existente, de un aumento en la traducción del mARN existente, ó bien de un descenso en la velocidad de degradación del isoenzima. Ensayos llevados a cabo con ADNc complementario indican que, en la rata, el tratamiento previo con fenobarbital o 3-metilcolantreno, incrementa la síntesis de mARN específico (Adesnik y col., 1981; Morville y col., 1983). Está pues por ver si la inducción de P-450_{ALC} comporta un mecanismo similar, o bien es un cambio de tipo hormonal o metabólico del animal el que lleva indirectamente a la inducción del enzima.

Además del etanol, el 1-butanol, 1-pentanol y la anilina son también sustratos del citocromo P-450_{ALC} (Morgan y col., 1982). Concretamente, el 1-butanol se ha utilizado como sustrato de dicho enzima para estudiar la relación entre la inducción del citocromo P-450_{ALC} de microsomas hepáticos aislados de conejos no tratados y tratados de forma crónica con isoniazida, tricloroetileno,

pirazol, etanol, imidazol y acetona y el incremento de actividad de oxidación del 1-butanol por dicho isoenzima (Coon y Koop, 1987). La elección de 1-butanol como sustrato se debe a que presenta un "turnover" más elevado que el etanol y, además, los blancos a tiempo cero son mucho menores para el butiraldehído que para el acetaldehído. Los resultados obtenidos indicaron la existencia de cierta correlación: al aumentar el contenido en P-450_{ALC} se observaba también un incremento en la actividad de oxidación del butanol.

El citocromo P-450_{ALC}, también es capaz de oxidar, con mayor actividad que otros isoenzimas de P-450, acetaminofen (Morgan y Koop, 1983), CCl₄ (Ingelman-Sundberg y Johansson, 1984), acetona (Koop y Casazza, 1985) y N-nitrosodimetilamina (NDMA) (Yang y col., 1985). Resultados similares se obtuvieron con el citocromo P-450j, el isoenzima hepático mayoritario purificado a partir de ratas tratadas con etanol y con isoniazida (Ryan y col., 1985; Ryan y col., 1986). Un isoenzima análogo al P-450j de rata fue detectado en humanos (Wrighton y col., 1986; Song y col., 1986). Concretamente, Wrighton y col. (Wrighton y col., 1986) purificaron por cromatografía de inmunoafinidad una proteína de hígado humano (HLj), cuya actividad catalítica frente al etanol no se ha descrito. Song y col. (Song y col., 1986) aislaron el ADNc complementario al P-450j humano y dedujeron su secuencia aminoacídica, comprobando que era homóloga, en un 94 %, a la del HLj (Wrighton y col., 1986), siendo idénticos los primeros 18 residuos aminoacídicos. Recientemente, Lasker y col. (Lasker y col., 1987a), han conseguido obtener la proteína humana purificada en una forma catalíticamente activa y con un elevado "turnover" frente al etanol y otros sustratos. Dichos autores determinaron las secuencias aminoacídicas del P-450_{ALC}, P-450_B y P-450_C, observando que únicamente el P-450_{ALC} presentaba 19 residuos comunes con el P-450j humano y 18 con el HLj. Nebert y col. (Nebert y col., 1987), propusieron una nueva nomenclatura para el P-450 humano inducible por etanol; así pues esta P-450-alcohol-oxigenasa se designó como P-450IIE1 para distinguirla de otros isoenzimas de P-450 que también pueden contribuir a la oxidación del etanol (Lasker y col., 1987b), quedando el término SMOE reservado a aquellos casos en los que se quiere expresar la

Introducción

capacidad de la totalidad de microsomas que pueden oxidar al etanol, más que a aquella fracción de actividad catalizada específicamente por la P-450IIE1.

El sistema microsomal de oxidación del etanol (SMOE) presenta un valor de K_m (constante de afinidad) relativamente elevado para el etanol (8-10 mM, respecto a 0.2-2 mM para la ADH); por este motivo, se supone que la ADH es responsable de la máxima oxidación del etanol cuando sus concentraciones en sangre son bajas; sin embargo, esto no es cierto cuando los niveles de alcohol son elevados o bien cuando hay consumo crónico del mismo. En estas circunstancias, el SMOE juega un papel muy importante, en parte debido a su inducibilidad (Lieber y De Carli, 1968, 1970). Matsuzaki y col. (Matsuzaki y col., 1981) estudiaron la contribución de cada una de las posibles vías de oxidación del etanol en el hígado, así como el incremento de las mismas tras el consumo crónico de alcohol. Dichos autores investigaron la diferencia existente entre las velocidades de oxidación de concentraciones bajas y elevadas de etanol (10-50 mM) en hepatocitos aislados de rata, no administradas y administradas crónicamente con etanol, en presencia de un inhibidor de la ADH, el pirazol, y también en presencia de un inhibidor del enzima catalasa, la azida. Los resultados obtenidos demostraron que la aceleración de la velocidad de oxidación del etanol, al aumentar su concentración en el hígado, perdura incluso tras la inhibición de la ADH y del enzima catalasa. Por otra parte, tanto la velocidad de oxidación del etanol, como la dependencia existente entre dicha velocidad y la concentración de etanol, fueron mayores en hepatocitos de ratas administradas crónicamente con etanol que en ratas control. La dependencia de la concentración de etanol en su velocidad de oxidación fue similar a la hallada por Grunnet y col. (Grunnet y col., 1973); asimismo, los resultados correspondientes al incremento en la oxidación del etanol tras un consumo crónico del mismo, estuvieron de acuerdo con los obtenidos en el hombre (Karter y col., 1969; Misra y col., 1971; Mezey y Tobon, 1971), en ratas "in vivo" (Hawkins y col., 1966; Lieber y De Carli, 1972; Videla y col., 1973) y en ensayos "in vitro" llevados a cabo con hepatocitos de rata (Videla e Israel, 1970; Thurman y col., 1972).

Según Matsuzaki y col. (Matsuzaki y col., 1981), la ADH, "per se", no es responsable del efecto que tiene una elevada concentración de etanol sobre el incremento de su velocidad de oxidación, debido a que dicho enzima posee un valor de K_m bajo frente al etanol y por lo tanto se encuentra ya saturado a la concentración de alcohol utilizada en dichas experiencias (10 mM). Además, se observó que las diferencias entre la velocidad de oxidación del etanol a concentraciones bajas y elevadas persistían en presencia de pirazol, siendo, en estas condiciones, la actividad de la ADH prácticamente nula y lo mismo ocurría en presencia de azida, un inhibidor del enzima catalasa. Ello corroboraba, pues, la participación del SMOE en la oxidación del etanol, puesto que, además, el valor de K_m aparente frente al etanol de la vía de oxidación que no tiene lugar a través de la ADH, determinado en hepatocitos aislados de rata (13-14 mM), está de acuerdo con el valor de K_m correspondiente al SMOE, es decir, de 8-9 mM (Lieber y De Carli, 1970) en ausencia de pirazol. Efectivamente, todas estas experiencias demostraban la implicación del SMOE en el metabolismo del etanol tras el consumo crónico del mismo.

Se ha discutido mucho acerca del papel del enzima catalasa en la oxidación del etanol (Thurman y col., 1976a, 1976b; Thurman y Brentzel, 1977). Se ha visto que dicha vía de oxidación está limitada por la velocidad de formación de H_2O_2 , habiéndose obtenido valores de ésta de 49-82 nmol/min/g de hígado (peso húmedo) (30 °C) "in vitro" (Oshino y col., 1973, 1975) y de 3.6 μ mol/h/g hígado (peso húmedo) "in vivo" (Boveris y col., 1972). Este último valor representa sólo un 2 % de la velocidad de oxidación del etanol "in vivo" (178 μ mol/h/g de hígado) (Lieber y De Carli, 1972). Por lo tanto, la catalasa explicaría menos de un 10 % de la velocidad de oxidación del etanol por la vía que no transcurre a través de la ADH y, de hecho, ello está de acuerdo con el efecto inhibitorio de la azida sobre la actividad de dicha vía, observado por Matsuzaki y col. (Matsuzaki y col., 1981) (<10%).

Por el contrario, Handler y col. (Handler y Thurman, 1987a) vieron que los ácidos grasos, y en especial el palmítico, estimulaban tanto la formación de

Introducción

H_2O_2 como la captación de etanol, sugiriendo que la catalasa podía participar en el metabolismo del etanol en condiciones fisiológicas. No obstante, este fenómeno únicamente se dio en presencia de 4-metilpirazol, mientras que en ausencia del mismo la formación de H_2O_2 fue pequeña para todos los ácidos grasos ensayados en hígado perfundido intacto, siendo nula para el palmitato (Foerster y col., 1981). Además, se observó que si no se incorporaba 4-metilpirazol al medio de ensayo, la velocidad metabólica del etanol se reducía en presencia de ácidos grasos (Berry y col., 1983) y la β -oxidación de éstos era inhibida cuando, tanto el etanol (Williamson y col., 1969) como el butanol (Handler y Thurman, 1987b) eran metabolizados vía ADH. Así pues, en condiciones fisiológicas y de no inhibición de la ADH, es improbable que la β -oxidación de ácidos grasos estimule la formación de H_2O_2 y que la vía de los peroxisomas contribuya de forma significativa en la oxidación del etanol. Por otra parte, experiencias efectuadas en ausencia de ADH, pusieron también en evidencia la escasa contribución del enzima catalasa en la oxidación de etanol que no transcurre vía ADH. Así, Kato y col. (Kato y col., 1987), trabajando con ratones (deermice) de una cepa carente de actividad ADH (ADH^-), observaron la existencia de inhibición de la peroxidación del etanol, mediada por el enzima catalasa, en homogeneizados de hígado de ratones de dicha cepa, administrados con 3-amino-1,2,4-triazol (aminotriazol), en presencia de un sistema generador de H_2O_2 ($80 \mu\text{mol/l/min}$), con respecto al grupo control. Concretamente, la inhibición fue de más de un 85 % cuando el aminotriazol se administró 3 horas antes del sacrificio de los animales, de un 80 % cuando la administración se efectuó 6 horas antes y de un 40 % cuando se hizo 24 horas antes. La velocidad de oxidación del etanol en hepatocitos procedentes de animales pretratados con aminotriazol 6 horas antes de su sacrificio fue ligeramente mas baja, aunque sin observarse diferencias estadísticamente significativas, que la de los controles. La adición de azida, potente inhibidor de la catalasa, al medio de incubación no supuso ningún cambio significativo en la velocidad de oxidación del etanol con respecto a los controles, ni con respecto a los animales pretratados con aminotriazol. Por lo tanto, ni el aminotriazol ni la azida afectaron de forma significativa al metabolismo del etanol en hepatocitos de ratones deermice. Tras

estimular la producción intracelular de H_2O_2 , con la adición de urato al medio de incubación, la peroxidación del etanol se cuadruplicó en los hepatocitos de los animales control; ello está de acuerdo con el hecho de que es el H_2O_2 y no la catalasa el factor limitante de la peroxidación del etanol. No obstante, el aminotriazol anuló en más de un 90 % el incremento provocado por el urato, lo cual corroboró que el aminotriazol es un inhibidor de la peroxidación del etanol mediada por el enzima catalasa, sin interferir en la formación de H_2O_2 . De hecho, esto fue comprobado por los autores, que observaron que en presencia de urato-oxidasa en el medio de incubación no existían diferencias entre los homogeneizados de ratones ADH control y pretratados con aminotriazol; tampoco el incremento del consumo de oxígeno (50 %) tras incubación con urato en hepatocitos ADH de ratones control fue significativamente distinto del de los ratones pretratados con aminotriazol.

Por otra parte, el hecho de que los mismos autores (Kato y col., 1967) hubieran observado, en estudios previos, que los sistemas enzimáticos del metabolismo microsomal de fármacos eran parcialmente inhibidos por aminotriazol, llevó a determinar la actividad del SMOE en microsomas hepáticos de ratones deermice administrados "in vivo" con aminotriazol, a distintos tiempos después de la administración, siendo el resultado obtenido la existencia de inhibición. El grado de inhibición observado 6 horas después de la administración de aminotriazol (de un 20%, aproximadamente) fue comparable a la reducción metabólica del etanol hallada en hepatocitos de ratones deermice sacrificados también 6 horas después de la administración de aminotriazol (aproximadamente un 15 %), lo cual hizo suponer que era el efecto del aminotriazol sobre el SMOE el que explicaba dicha reducción metabólica "in vivo" y en hepatocitos. Tal como ya se ha mencionado, la azida, potente inhibidor de la catalasa "in vitro", no presentó en estos ensayos efecto significativo sobre el metabolismo del etanol en hepatocitos de deermice. Además, se demostró que el 1-butanol, inhibidor competitivo de la oxidación del etanol por el SMOE, sin ser sustrato de la catalasa (Teschke y col., 1974b, 1975), reducía la velocidad de oxidación del etanol en hepatocitos de ratones deermice de forma dosis dependiente y

Introducción

también la actividad del SMOE en los microsomas, sin afectar a la peroxidación del etanol; estos resultados sugerían que el SMOE era el principal responsable del metabolismo del etanol en ratones ADH, siendo el papel del enzima catalasa prácticamente nulo, hecho que estaba de acuerdo con los resultados obtenidos en experiencias efectuadas con 4-metilpirazol y aminotriazol, ya mencionados anteriormente.

En la primera etapa del metabolismo del etanol se rompe enzimáticamente el enlace 1(R)H-C. Si se reemplaza el 1(R)H por Deuterio, de mayor peso molecular, la etapa de rotura de dicho enlace se enlentece, fenómeno conocido como efecto isotópico intrínseco, que puede alterar los parámetros cinéticos de la reacción enzimática.

Puesto que cada una de las vías metabólicas del etanol presenta un efecto isotópico intrínseco característico, dicho fenómeno se utilizó para el cálculo del flujo a través de cada una de ellas, permitiendo diferenciarlas entre sí, es decir la vía de la ADH, la de la catalasa y la del SMOE (Tagaki y col., 1985; Alderman y col., 1987).

La velocidad de transformación de la primera etapa es más lenta que la siguiente, resultando ser el paso limitante de la velocidad del proceso de oxidación global del etanol a ácido acético.

Aunque el equilibrio de la reacción catalizada por la alcoholdehidrogenasa, se encuentra desplazado hacia la izquierda, la oxidación etanólica ocurre debido a la rápida desaparición del acetaldehído, mediante un proceso irreversible catalizado por una aldehído-deshidrogenasa.

1.5. Aldehído-deshidrogenasa

La aldehído-deshidrogenasa es un enzima que cataliza la oxidación de diversos aldehídos a sus correspondientes metabolitos ácidos. La ALDH de

mayor actividad se encuentra en el hígado, pero se ha demostrado su presencia en la mayor parte de órganos y tejidos examinados (Harada y col., 1980). Dicho enzima se encuentra también en sangre, debiéndose, en este caso, casi toda su actividad a los eritrocitos, aunque la actividad metabolizadora de aldehídos también se ha hallado en leucocitos y plaquetas (Helander y Tottmar, 1986, 1987).

Se han realizado diversos estudios sobre las aldehído-deshidrogenasas de mamíferos, con el fin de aislar, purificar y caracterizar dichos enzimas. Así, Feldman y Weiner (Feldman y Weiner, 1972) purificaron una aldehído-deshidrogenasa de hígado de caballo. Posteriormente, Eckfeldt y col. (Eckfeldt y col., 1976), trabajando con la misma especie animal, lograron purificar y caracterizar dos isoenzimas, uno de elevada afinidad ($K_m=0.2$ M) y otro de baja afinidad ($K_m=70$ μ M) frente al acetaldehído, respectivamente. Kraemer y Deitrich (Kraemer y Deitrich, 1968) aislaron y purificaron parcialmente un enzima hepático humano, pero no hallaron evidencias de la existencia de isoenzimas adicionales.

En la mayor parte de especies ensayadas (rata, cordero, caballo y hombre), se han descrito dos clases principales de ALDH hepática que se distinguen de acuerdo con su valor de K_m frente a aldehídos alifáticos de cadena corta y también por su localización subcelular (Pietruszko, 1983). Así por ejemplo, los distintos isoenzimas de hígado humano presentan valores de K_m desde 1 μ M a 1mM . Los isoenzimas de elevada K_m , ALDH₁, ALDH₃ y ALDH₄ se localizan principalmente en la fracción subcelular citosólica del hígado, mientras que el isoenzima de baja K_m , ALDH₂ es mitocondrial. Puesto que los niveles de acetaldehído en el hígado no exceden de 100 μ M después de la administración de alcohol, el isoenzima mitocondrial de baja K_m es probablemente el responsable de la mayor parte de la oxidación del acetaldehído "in vivo".

Introducción

Estudios de electroforesis, efectuados con extractos de hígado humano en gel de almidón (Harada y col., 1980), han demostrado que la ALDH₂, o también denominada E₂ por algunos autores, es la forma más anódica, con un punto isoeléctrico de aproximadamente 4.9 y un valor de K_m de aproximadamente 1 μM a pH 9.5; para la ALDH₁, E₁ o bien ALDHIII, dicho valor es de 0.1 mM, siendo ésta la siguiente forma con mayor movilidad anódica (pI=5.3), mientras que para la ALDH₃ y para la ALDH₄ es de 1 mM, por lo que se asume que los dos últimos no contribuyen de forma significativa a la oxidación del acetaldehído "in vivo". Los isoenzimas de la ALDH₃ (pI=6.4) migran catódicamente hacia la ALDH₁, mientras que los de la ALDH₄ (pI=7.0-7.5) migran catódicamente hacia la ALDH₃.

La ALDH₁ y la ALDH₂ han sido purificadas, de forma que se han podido determinar sus propiedades moleculares, especificidad de sustrato y mecanismo cinético (Pietruszko, 1983) y también se ha estudiado su secuencia aminoacídica en hígado humano (Hempel y col., 1984, 1985).

El estudio del comportamiento electroforético ha permitido hallar diferencias entre los isoenzimas de la ALDH de caucásicos y orientales, hecho que sugiere la existencia de polimorfismo genético. Concretamente, ello se ha observado con el isoenzima de baja K_m (ALDH₂), para el cual existe una variante mutante que carece de actividad. Por este motivo, Goedde y col. (Goedde y col., 1979) propusieron que la elevada incidencia de taquicardia, ruborización y vasodilatación entre la población japonesa estaba relacionada con dicho polimorfismo, ya que aproximadamente un 50 % de dicha población carece de la forma activa de la ALDH₂. Mizoi y col. (Mizoi y col., 1983) demostraron que los individuos con la ALDH carente de actividad presentan niveles de acetaldehído sanguíneo muy elevados tras la ingesta de alcohol y por ello sufren reacciones aversivas, análogas a las provocadas por los inhibidores de la ALDH, cuando ingieren alcohol. Sin embargo, la velocidad metabólica del alcohol en los individuos con dicho fenotipo no es significativamente distinta de la que presentan los sujetos con fenotipo de la ALDH₂ normal. Luego, parece

que el contenido de ALDH activa en el hígado no es el factor limitante de la eliminación del etanol en dichos individuos.

Cabe destacar que la incidencia de alcoholismo es significativamente menor entre los japoneses con fenotipo deficiente en ALDH₂ que en los de fenotipo normal. Ello demuestra que la reacción aversiva parecería positiva en lo que hace referencia a la menor incidencia de alcoholismo en los deficientes en ALDH₂.

También Harada y col. (Harada y col., 1980) hablan de cuatro tipos distintos de isoenzimas de la ALDH (ALDH I, II, III y IV) presentes en hígado humano. La ALDH I se caracteriza por un valor de K_m bajo ($3.5 \mu M$) frente al acetaldehído, la ALDH II presenta un valor de K_m elevado ($94 \mu M$), mientras que para la ALDH III y para la ALDH IV el valor de K_m es muy elevado ($>1000 \mu M$). De hecho, la determinación de la actividad de los distintos isoenzimas de la ALDH depende del sistema de ensayo utilizado y, como consecuencia, pueden obtenerse resultados muy variables de unos autores a otros. Sugata y col. (Sugata y col., 1988) determinaron la actividad del isoenzima de la ALDH, presente en eritrocitos humanos, que calificaron como de elevada K_m ($> 300 \mu M$).

1.6. Farmacocinética de la eliminación del etanol

El estudio de la farmacocinética del etanol es importante desde un punto de vista clínico, puesto que permite conocer las dosis ingeridas del mismo a partir de sus datos de concentración plasmática frente al tiempo.

Diversos autores han estudiado la naturaleza saturable del proceso de disposición del etanol en el organismo (Wilkinson, 1980; Holford, 1987). Según parece, el proceso de eliminación del etanol del organismo se describe con mayor probabilidad mediante una cinética de Michaelis-Menten y no por un proceso de orden cero, tal como se había considerado clásicamente (Widmark,

Introducción

1933) y se sigue haciendo en la práctica por motivos de simplicidad. En la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1.1), la velocidad de eliminación (dc/dt) depende de la velocidad máxima de eliminación (V_{max}), de la constante de Michaelis (K_m) y de la concentración (C). Sin embargo, dicha cinética, de orden mixto, puede convertirse en un proceso de primer orden ($C \ll K_m$) (Ecuación 1.2), ó bien en un proceso de orden cero ($C \gg K_m$) (Ecuación 1.3), dependiendo de la concentración de alcohol presente en el organismo.

$$\frac{dC}{dt} = - \frac{V_{max} \cdot C}{(K_m + C)} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

$$\frac{dC}{dt} = - \frac{V_{max}}{K_m} \cdot C \quad \text{Ecuación 1.2}$$

$$\frac{dC}{dt} = - V_{max} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

Wagner y col. (Wagner y col., 1976) y también Wilkinson (Wilkinson, 1980) ajustaron los datos de concentración plasmática frente al tiempo a un modelo abierto de un compartimiento para determinar los parámetros de Michaelis-Menten. Por el contrario, Rangno y col. (Rangno y col., 1981;) y Shimada y col. (Shimada y col., 1987) utilizaron un modelo abierto de dos compartimientos, con una cinética de eliminación, también, de Michaelis-Menten. Sin embargo, estudios más específicos sobre la eliminación del etanol han demostrado que su desaparición del organismo se acelera cuando se halla a concentraciones elevadas (Salaspuro y Lieber, 1978; Wendell y Thurman, 1979; Mizoi y col., 1983; Keiding y col., 1983). En consecuencia, puesto que a concentraciones elevadas el comportamiento farmacocinético del etanol no podía ser explicado mediante un modelo abierto de dos compartimientos con una única vía de eliminación, de acuerdo con una cinética de Michaelis-Menten, se sugirió la existencia de vías de eliminación alternativas (Rangno y col., 1981) a la de la ADH, concretamente el sistema microsomal de oxidación del etanol y la

oxidación por el enzima catalasa, las cuales han sido ampliamente tratadas en párrafos anteriores. Todo ello llevó a la realización de un estudio farmacocinético riguroso de estas vías de eliminación, considerando un amplio intervalo de concentraciones de etanol. Efectivamente, Fujimiya y col. (Fujimiya y col., 1989), evaluaron estadísticamente distintos modelos farmacocinéticos mediante ajustados multilineales simultáneos (Yamaoka y col., 1982; Yamaoka y col., 1983) varias curvas de concentración plasmática de etanol frente al tiempo, correspondientes a distintas dosis intravenosas de etanol en conejo (3.0, 2.0, 1.0, 0.5 y 0.25 g/kg). Dichos autores también aplicaron la teoría de los momentos estadísticos (Yamaoka y col., 1978).

1.7. Hepatotoxicidad del alcohol

Lieber (Lieber, 1992) distingue como efectos tóxicos debidos al etanol, los mediados a través de la alcohol-deshidrogenasa, los relacionados con el sistema microsomal de oxidación del etanol (SMOE), los efectos adversos debidos al acetaldehído y las alteraciones del metabolismo del colágeno.

1.7.1. Efectos mediados a través de la alcohol-deshidrogenasa

El exceso de la forma reducida del adenin-nicotinamida-nucleótido (NADH) resultante de la oxidación de etanol por la alcohol-deshidrogenasa (ADH) y subsiguiente transformación del acetaldehído en ácido acético, se cree es el responsable de diversas alteraciones hepáticas y metabólicas, entre las cuales destacan:

- a) **Hiperlactacidemia, hiperuricemia y acidosis.** La primera de ellas, es consecuencia de una reducción de la utilización de ácido láctico y un aumento de su producción por el hígado, dando lugar, a su vez, a acidosis y también a una reducción de la capacidad del riñón para excretar ácido úrico (Lieber y col., 1962).

Introducción

- b) **Depresión de la oxidación lipídica y lipogénesis.** Efectivamente, el aumento de la relación NADH/NAD da lugar a un aumento de los niveles de α -glicerofosfato, favoreciendo la acumulación hepática de triglicéridos y la síntesis de ácidos grasos. La mitocondria utiliza preferentemente los equivalentes reductores, derivados del metabolismo del etanol, antes que los procedentes de la oxidación de ácidos grasos, que sería la fuente utilizada en condiciones normales, dando lugar a una acumulación de la grasa de la dieta en el hígado (Lieber y col., 1966).

- c) **Hipoglicemia e hiperglicemia.** Se desconoce el mecanismo por el cual se observa hiperglicemia; sin embargo, se sabe que la hipoglucemia, complicación que por otra parte no se da con mucha frecuencia en el abuso agudo de alcohol, puede también atribuirse parcialmente a un efecto del incremento de la relación NADH/NAD, conocido como bloqueo hepático de la gluconeogénesis.

- d) **Incremento de la producción de lipoproteínas, hiperlipemia y cetosis.** En los estadios tempranos de la enfermedad hepática alcohólica, es frecuente observar hiperlipemia en la que se hallan implicadas todas las clases de lipoproteínas, siendo ello un mecanismo de disposición del exceso de lípidos. Sin embargo, puesto que ello requiere integridad del hepatocito, dicho mecanismo se ve alterado en estadios posteriores, desarrollándose hígado graso (Borowsky y col., 1980). Un mecanismo hepático adicional de la disposición de lípidos es la cetogénesis, que da lugar a una cetosis de gravedad ligera (Lefevre y col., 1970).

- e) **Reducción de la actividad de la ADH gástrica.** Los niveles de alcohol alcanzados en sangre no activan la ADH extrahepática de la mayor parte de tejidos; sin embargo, tanto la ADH gástrica de baja como de elevada afinidad presentan actividad tras la ingesta de alcohol; como consecuencia de ello, se reduce su biodisponibilidad actuando a modo de barrera protectora frente a los efectos de pequeñas cantidades de

alcohol. Dicho efecto podría verse disminuido en alcohólicos debido a una reducción de los niveles gástricos de ADH, o también por fármacos como la aspirina (Roine y col., 1990), la ranitidina (Dipadova y col., 1992) y la cimetidina (Caballeria y col., 1989). La presencia de niveles de la ADH gástrica menores en la mujer que en el hombre contribuye a niveles más elevados de alcohol en sangre en la mujer tras la ingesta de la misma cantidad de alcohol que el hombre.

1.7.2. Efectos tóxicos relacionados con el sistema microsomal de oxidación del etanol

La inducción de la actividad del sistema microsomal de oxidación hepático tras un consumo crónico de alcohol se extiende a otros sistemas del metabolismo microsomal de fármacos; así, por ejemplo, se observa un incremento significativo, desde un punto de vista clínico, del metabolismo de sustancias como tolbutamida, warfarina, propanolol, diazepam y rifampicina. El etanol afecta "per se" la capacidad metabolizadora hepática de fármacos, como lo demuestra, por ejemplo, el incremento del metabolismo del meprobamato observado en preparaciones de hígado procedentes de ratas administradas con etanol (Misra y col., 1971). Cabe señalar que dicho efecto persiste durante varios días, e incluso semanas, después del cese de la ingesta de alcohol.

1.7.3. Incremento de la toxicidad debida a xenobióticos. Carcinogénesis. Interacción con las vitaminas liposolubles

Desde un punto de vista clínico, la importancia del SMOE y del sistema P450IIE1 inducible por el etanol, radica en la capacidad de dicho enzima de convertir muchos xenobióticos en metabolitos tóxicos. Efectivamente, algunos disolventes industriales, como el tetracloruro de carbono son susceptibles de ello. La administración previa de alcohol estimula substancialmente la toxicidad del CCl_4 , cuyos metabolitos se unen, además, de forma covalente a las membranas microsomales de rata y que ello se supone contribuye a aumentar la susceptibilidad de los alcohólicos a la hepatotoxicidad debida a dicha sustancia (Guild y col., 1958).

Introducción

También se ha observado una hepatotoxicidad aumentada después del consumo de alcohol con otros compuestos orgánicos, como anestésicos por inhalación (Tsutsumi y col., 1990) y con fármacos tales como isoniacida, fenilbutazona y paracetamol.

La mayor incidencia de cáncer observada entre sujetos alcohólicos se ha atribuído, en parte, al efecto del etanol sobre los sistemas enzimáticos implicados en la activación de carcinógenos, como, por ejemplo, la N-nitrosodimetilamina (NDMA), dependiente del citocromo P450, en una gran variedad de tejidos (Garro y col., 1981). Así, por ejemplo, se ha observado que un consumo de alcohol a largo plazo potencia la mutagénesis debida a sustancias derivadas del tabaco.

Por otra parte, también se ha observado que, incluso en estadios tempranos de hígado graso, los alcohólicos crónicos poseen a menudo niveles hepáticos de vitamina A deprimidos, a pesar de ser normales los niveles circulantes de dicha vitamina y en ausencia de una dieta deficitaria en ella (Leo y Lieber, 1982). Los efectos de una dosis aguda de alcohol en la rata sugieren como posible mecanismo, un desplazamiento de la vitamina A desde el hígado a otros órganos por medio de ésteres de retinilo unidos a lipoproteínas (Leo y col., 1986). Aparte de la movilización, también podría contribuir a dicha deplección de la vitamina A un aumento de su catabolismo, puesto que se han hallado vías de metabolismo hepático microsomal del retinal inducibles por etanol o bien por la administración de fármacos (Leo y col., 1987). Por otra parte, se ha visto que tanto el retinol (Leo y col., 1984) como el ácido retinoico (Leo y Lieber, 1985) son substratos de oxidación del P450 en microsomas hepáticos humanos. Del mismo modo que una deficiencia de vitamina A puede afectar al hígado, también puede hacerlo un exceso de ella. El consumo crónico de etanol potencia la sensibilidad hepática frente a un exceso de vitamina A, dando lugar a alteraciones morfológicas y funcionales de la mitocondria, así como necrosis y fibrosis hepáticas. En consecuencia, los alcohólicos empedernidos presentan un estrecho margen terapéutico para la vitamina A.

El etanol también favorece la rotura de otras vitaminas liposolubles como α -tocoferol, esteroides endógenos y exógenos y compuestos relacionados con los esteroides, como la vitamina D.

1.7.4. Efectos adversos del acetaldehído

El consumo crónico de etanol reduce la capacidad mitocondrial de oxidación del acetaldehído; tal efecto, junto con una producción ya sea inalterada o bien incrementada de acetaldehído, puede desembocar en un desequilibrio entre la formación y la disposición del mismo.

1.7.4.1. Formación de aductos y alteraciones microtubulares

El acetaldehído forma un aducto estable "in vivo" en microsomas de hígado de rata, por unión covalente al P450IIE1, de tal forma que se han podido detectar anticuerpos contra dicho aducto (producido "in vitro"), en el suero de la mayor parte de alcohólicos.

El acetaldehído también se une a la tubulina hepática, proteína constituyente de los microtúbulos. La alteración de la polimerización de la tubulina podría contribuir al desarrollo de hepatomegalia, vía inhibición de la secreción proteica mediada por los microtúbulos. Así, la administración de etanol a largo plazo da lugar a un sustancial retraso en la secreción de proteínas al plasma y a la correspondiente retención en el hígado (Baraona y col., 1977).

Sin embargo, la mayor contribución del incremento de proteína citosólica hepática inducido por el etanol es la de la proteína fijadora de ácidos grasos, que explica una tercera a una sexta parte, del incremento observado durante la ingesta de etanol.

1.7.4.2. Promoción de la peroxidación lipídica e interacción con cisteína, glutatión y S-adenosil-L-metionina

Un posible mecanismo para explicar la depresión del glutatión hepático (GSH) tras la ingesta de alcohol podría ser la unión del acetaldehído a la cisteína o al propio glutatión, que se ha visto es consistente en primates (Lieber y col., 1990a). El GSH está implicado en el proceso de protección celular frente a la lesión electrofílica debida a radicales libres, especialmente las especies reactivas de oxígeno. La deplección de GSH podría favorecer la peroxidación lipídica producida por diversos mecanismos. Experimentalmente, dicha deplección puede corregirse mediante la adición de S-adenosil-metionina (SAME) (Lieber y col., 1990a), forma activa de la metionina y precursor selectivo de la GSH, agente metilante que juega un papel primordial en diversas reacciones de transmetilación, en el metabolismo de fosfolípidos y en el mantenimiento de la estructura y función de la membrana. En consecuencia, la deplección del GSH y la correspondiente interferencia de la transmetilación, pueden promover la lesión de la membrana relacionada con la lesión hepática inducida por etanol.

Se ha observado que el consumo de alcohol a largo plazo da lugar a una deplección significativa del SAME hepático en primates (Lieber y col., 1990a), debida, en parte, a un aumento de la utilización de GSH secundario al aumento, también, de radicales libres y a la formación de acetaldehído, tanto por el SMOE como por la ausencia de GSH. Bajo estas condiciones, el incremento del recambio de GSH puede seguirse a través del aumento de ácido Ó-amino-n-butírico. Sin embargo, la actividad de la SAME-sintetasa (enzima que cataliza la transformación de metionina a S-adenosil-L-metionina) puede convertirse en la etapa limitante de la velocidad de reacción, especialmente desde el momento en que se ha visto que se halla disminuida en la cirrosis. En consecuencia la administración suplementaria de metionina podría ser ineficaz en la enfermedad hepática alcohólica. Sin embargo, se ha podido observar que la administración oral de SAME permite recuperar de forma efectiva los niveles de SAME

hepáticos en mandriles tratados con etanol. En este mismo modelo, la SAME atenuó la lesión hepática inducida por etanol, como lo demuestra una reducción de la deplección del glutatión y un menor incremento de la aspartato-transaminasa y de la glutámico-deshidrogenasa (Lieber y col., 1990a).

1.7.5. Alteraciones del metabolismo del colágeno

Además de la necrosis y la inflamación inducidas por el alcohol, efectos directos sobre el metabolismo del colágeno podrían también contribuir al cuadro que se presenta en la cirrosis alcohólica. La administración crónica de alcohol en mandriles da lugar a proliferación de miofibroblastos, acompañada de vez en cuando de abundante deposición de haces de colágeno y substitución de aproximadamente un 50 % de lipocitos por células con características de fibroblastos y depósito de colágeno. El acetaldehído estimula la acumulación de colágeno en adipocitos "in vitro". Estudios llevados a cabo "in vivo" indican que la acumulación de colágeno durante el desarrollo de cirrosis podría deberse tanto a una síntesis potenciada del mismo, como a una reducción de su degradación, subsiguiente a una disminución de la actividad colagenolítica observada en la lesión hepática alcohólica temprana. En experiencias "in vitro" e "in vivo", se ha podido observar que la lecitina poliinsaturada estimula la degradación de colágeno y por lo tanto atenua la acumulación del mismo (Lieber y col., 1990b).

1.8. Tratamiento de los problemas relacionados con el alcohol: fármacos tradicionales y nuevas tendencias

Se han desarrollado varios programas dedicados a la investigación de nuevas sustancias para el tratamiento de los trastornos producidos como consecuencia del abuso de alcohol (Holloway M., 1991; Naranjo y col., 1981).

En la Tabla 1.2 se resumen las alternativas de tratamiento farmacológico de distintos tipos de trastornos alcohólicos (Naranjo y Bremmer, 1991), la mayoría de ellas en fase de investigación.

Introducción

Tabla 1.2. Clasificación de los distintos tipos de trastornos alcohólicos y posibilidades de tratamiento.

Tipo de trastorno	Tratamiento
Intoxicación alcohólica	Ro 15-4513
Síndrome de abstinencia	Técnica de dosis de carga de diazepam Antagonistas del calcio Anticonvulsivantes no sedantes (carbamazepina, ácido valproico)
Etilismo crónico (fármacos reductores del consumo de alcohol)	Inhibidores de la ALDH (cianamida, disulfiram) Inhibidores de la recaptación de serotonina (citalopram, fluoxetina) Inhibidores del ECA (enalapril)
Síndrome cerebral orgánico crónico	fluvoxamina
Enfermedad hepática alcohólica	propiltiouracilo colchicina

1.8.1. Intoxicación alcohólica

Estudios recientes han demostrado que la imidazobenzodiazepina Ro 15-4513, un agonista parcial inverso de los receptores benzodiazepínicos, bloquea los efectos de comportamiento observados en ratas intoxicadas con alcohol (Suzdak y col., 1986). Sin embargo, este fármaco no puede utilizarse en clínica por tratarse de un proconvulsivante a dosis elevadas y, además, en individuos sometidos a abstinencia pueden precipitarse las crisis convulsivas.

1.8.2. Síndrome de abstinencia

La valoración del síndrome de abstinencia ha sido estandarizada mediante la utilización de una escala conocida como "the clinical institute withdrawal assessment for alcohol (CIWA-A)" (Sullivan y col., 1989). A pesar de que se ha podido comprobar la eficacia de intervenciones no farmacológicas, como son la monitorización de los síntomas, una atención personal y cuidado general, los pacientes con síndrome moderado o grave deben tomar fármacos. Una de las técnicas utilizadas ha consistido en administrar una dosis de carga de

diazepam, fármaco que presenta la ventaja de una rápida y completa absorción, así como de una larga semivida, tanto por parte del diazepam como de su metabolito N-desmetildiazepam. En general, los pacientes con síndrome grave son tratados con dosis de 20 mg de diazepam por vía oral cada hora hasta que presentan una mejoría clínica, o bien hasta que permanecen medio sedados. Un estudio controlado con placebo, randomizado y a doble ciego demostró que el 50 % de los pacientes respondía frente a la dosis de 60 mg (dosis de carga mínima) en un tiempo medio de 7.6 horas, sin complicaciones tales como convulsiones, alucinaciones o arritmias.

Los tratamientos farmacológicos no sedantes que se proponen son consecuencia de los resultados obtenidos en animales de experimentación. Así, por ejemplo, se ha visto que los canales del calcio, pueden mediar los efectos agudos del etanol. Los antagonistas del calcio del tipo dihidropiridinas atenúan los síntomas del síndrome de abstinencia en ratas, incluidas las convulsiones (Little y col., 1986). Se ha demostrado que dichos compuestos retrasan el desarrollo de tolerancia y atenúan el consumo de alcohol; sin embargo, su uso debe ser limitado, debido a sus efectos cardiovasculares.

También se ha podido comprobar que los efectos agudos y crónicos del etanol pueden ser mediados por un receptor aminoacídico excitatorio, conocido como N-metil-D-acetato (NMDA), de forma que sustancias antagonistas de dicho receptor (MK-801) atenúan el síndrome de abstinencia.

1.8.3. Fármacos que reducen el consumo de alcohol

Hasta el momento, los únicos fármacos de amplio uso que reducen el consumo de alcohol son los conocidos como aversivos del alcoholismo, concretamente el disulfiram y la cianamida, siendo el último de ellos objeto de estudio en la presente Memoria.

Introducción

El desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos depende del conocimiento de los mecanismos biológicos que regulan la ingesta de etanol. Estudios recientes han demostrado la importancia de los inhibidores de la recaptación de la serotonina en el inicio, mantenimiento y cese del consumo de alcohol. Dichas sustancias (citalopram, fluoxetina, zimelidina, viqualina), que en principio se desarrollaron como antidepresivos, reducen la ingesta de alcohol en ratas. Por este motivo, Naranjo y col. (Naranjo y col., 1984, 1987, 1989 y 1990) desarrollaron un programa para evaluar, desde un punto de vista clínico, este tipo de sustancias, observando que, efectivamente, reducían la ingesta de alcohol aproximadamente en un 20 % (del mismo modo que también reducen el apetito) en alcohólicos con dependencia ligera y moderada, de acuerdo con los criterios de diagnóstico de la DSM-III-R. Además, se observó un incremento de los días de abstinencia para la zimelidina (200 mg/día) y el citalopram (40 mg/día), siendo ello indicativo de que quizás estos fármacos ejercen su principal efecto antes del inicio del consumo de bebida. Por estos motivos, los inhibidores de la recaptación de serotonina constituyen uno de los tratamientos más prometedores para el tratamiento del alcoholismo.

Por otra parte, ni los inhibidores del ECA (enalapril), ni los antagonistas de los receptores 5-HT₃ (ondansetron), ni tampoco los agonistas dopaminérgicos (bromocriptina) han demostrado presentar efectos importantes sobre el consumo de alcohol.

1.8.4. Otras complicaciones clínicas

Aproximadamente un 10 % de los individuos alcohólicos presentan lo que se conoce como síndrome cerebral orgánico crónico alcohólico (COBS), caracterizado por componentes amnésicos, mientras que de un 50 a un 70 % de alcohólicos con síndrome de abstinencia pueden sufrir alteraciones de la funcionalidad cerebral. En un estudio cruzado a doble ciego, controlado con placebo, llevado a cabo en 10 alcohólicos, se observó que la fluvoxamina, un inhibidor relativamente selectivo de la recaptación de serotonina, incrementó la

puntuación de la escala de memoria de Wechsler. Dichos resultados sugieren que la alteración de la neurotransmisión serotoninérgica podría mediar, al menos de forma parcial, los componentes amnésicos de este síndrome y que un aumento de la neurotransmisión podría mejorar la memoria.

El consumo crónico de alcohol provoca necrosis celular en muchos tejidos, incluido el hígado. La administración del fármaco antitiroideo propiltiouracilo (PTU), mejoró varios parámetros indicativos de funcionalidad hepática en individuos alcohólicos con enfermedad hepática alcohólica (Orrego y col. 1979). Los efectos a largo plazo del PTU se determinaron en un estudio randomizado a doble ciego, controlado con placebo (Orrego y col., 1987).

Otro fármaco que se ha visto mejora la cirrosis hepática y aumenta la supervivencia, en aproximadamente un 50 %, es la colchicina (Kershenobich y col., 1988). Finalmente, destacar que numerosos estudios se están llevando a cabo con ambos fármacos.

1.9. Inhibidores de la aldehído-deshidrogenasa

El disulfiram y la cianamida cálcica en su forma citratada fueron introducidos en medicina en 1948 (Hald y col., 1948) y en 1956 (Ferguson, 1956), respectivamente, como coadyuvantes farmacológicos en el tratamiento del alcoholismo. Ambos fármacos se utilizan en Europa y Canadá, mientras que en Estados Unidos únicamente se usa en clínica el disulfiram. Aunque se trata de dos sustancias de estructura química muy diferente, ambos interfieren en la biotransformación hepática del alcohol a través de la inhibición de la aldehído-deshidrogenasa. Ello supone un incremento de la concentración de acetaldehído en sangre, cuya magnitud depende de su velocidad de formación a partir del etanol y de la magnitud de la inhibición de la aldehído-deshidrogenasa. En el hombre, dicho aumento del acetaldehído sanguíneo supone una serie de cambios fisiológicos, tales como vasodilatación cutánea periférica, manifestada mediante

Introducción

ruborización y también taquicardia, hipotensión, debida principalmente a un descenso de la presión diastólica, taquipnea, dolores de cabeza, náuseas y vómitos.

Existe un apreciable interés en el estudio farmacocinético de los dos fármacos, puesto que permite establecer el mecanismo de sus efectos, tanto terapéuticos como adversos, optimizar su farmacoterapia y minimizar su toxicidad.

1.9.1. Cianamida

Loomis y Brien (Loomis y Brien, 1983a, 1983b) estudiaron la inhibición de la ALDH de mitocondria hepática de rata por la cianamida. Dichos autores vieron que la administración de una dosis oral de 7 mg/kg de cianamida cálcica a la rata 2 horas antes de su sacrificio daba lugar a una inhibición completa de las ALDHs citosólica y mitocondrial de baja K_m ($< 1 \mu\text{M}$ acetaldehído) a los 30 minutos, recuperándose la actividad control al cabo de 96 horas y que inhibía de forma significativa, aunque en menor grado y durante un período de tiempo más corto, los isoenzimas microsomal, citosólico y mitocondrial de la ALDH de elevada K_m (1 mM acetaldehído). Por otra parte, se observó que la cianamida cálcica no afectaba las actividades de otros enzimas hepáticos como glutamato-deshidrogenasa, monoamina-oxidasa, alcohol-deshidrogenasa citosólica, citocromo-c-reductasa microsomal dependiente del NADPH, benzo(a)pireno-hidroxilasa y aminopirina- N-desmetilasa, ni tampoco modificaba el contenido del citocromo P-450 microsomal. En este sentido, Loomis y Brien concluyeron que la cianamida era un inhibidor de la ALDH hepática mucho más específico que el disulfiram.

Por otra parte, la concentración plasmática máxima de cianamida tras la administración de la dosis oral de 7 mg/kg fue de 102 ng/ml y se alcanzó en 1 hora, siendo la semivida aparente de eliminación de 1.5 horas. No se detectó cianamida en hígado durante las 6.5 horas posteriores a la administración,

mientras permanecía el fármaco en el plasma. No se hallaron correlaciones lineales entre los niveles plasmáticos de fármaco y las actividades de la ALDH microsomal de elevada K_m y mitocondrial y hepática de baja K_m . Estudios "in vitro" demostraron que la cianamida a las concentraciones alcanzadas en plasma después de su administración oral, únicamente inhibe en un 19 % el enzima mitocondrial de baja K_m sin afectar a la actividad de la ALDH citosólica de baja K_m y de la ALDH microsomal de elevada K_m , siendo ello indicativo de que dicho fármaco debe metabolizarse "in vivo" para poder inhibir la aldehído-deshidrogenasa, viniendo ello corroborado por el hecho de que no se detecta cianamida en hígado cuando la inhibición de la actividad de la ALDH, después de la administración oral del fármaco, es máxima.

Efectivamente, el hecho de que la cianamida carezca de actividad en preparaciones purificadas de ALDH "in vitro" (Deitrich y col., 1976; Kitson y Crow, 1979), a pesar de la demostrada inhibición de un amplio espectro de isoenzimas de la ALDH "in vivo" (Deitrich y col., 1976; Marchner y Tottmar, 1978; Shirota y col., 1982; Loomis y Brien, 1983a, 1983b) sugiere que se metaboliza a una forma activa frente a la inhibición de la ALDH. DeMaster y col. (DeMaster y col., 1979) demostraron que la formación de dicho inhibidor activo está catalizada por un sistema activador de la cianamida presente en mitocondria de rata.

Kitson y Crow (Kitson y Crow, 1979) estudiaron "in vitro" la posibilidad de que los inhibidores activos de la ALDH fueran productos de adición de la cianamida con aminas ó bien tioles. Tanto la dicianidamida como el ión aminoetilisotiuronio (AET), así como dos posibles productos secundarios de la reacción de la cianamida con tioles, la tiourea y el bisulfito de formamidina resultaron ser inactivos cuando se ensayaron "in vitro" con una preparación purificada de ALDH de hígado de cordero.

También Shirota y col. (Shirota y col., 1982) estudiaron el efecto inhibidor de la dimetilcianamida sobre la ALDH "in vivo". Su administración a

Introducción

la rata dio lugar a un incremento de los niveles de acetaldehído, al tiempo que inhibió la actividad de la ALDH mitocondrial de baja K_m en un 90% 12-24 horas después de la administración, coincidiendo ello con una deplección de los niveles hepáticos de glutation. De hecho, la actividad de la dimetilcianamida fue 5 veces inferior a la de la cianamida cuando se compararon los niveles de acetaldehído observados entre la primera y segunda hora después de la administración del fármaco, pero probablemente se hubieran hallado valores más similares si la comparación se hubiera efectuado a los tiempos óptimos para la dimetilcianamida (de 12 a 24 horas). En cualquier caso, lo que sí es cierto es que la dimetilcianamida no inhibe el isoenzima de baja K_m de la ALDH de mitocondria intacta de hígado de rata "in vitro". Puesto que resulta difícil disponer de N-metilcianamida (producto monodesmetilado de la dimetilcianamida), debido a su inestabilidad, se ensayó la N-propilcianamida para averiguar si se trataba de un buen inhibidor del enzima mitocondrial "in vitro". Los resultados obtenidos indicaron que la actividad de la dimetilcianamida se debe a su correspondiente producto monodesmetilado, proceso que ocurre en el sistema microsomal hepático; sin embargo, dicho metabolito requiere todavía una posterior activación en la que quizás juegan un papel importante las mitocondrias.

Experiencias llevadas a cabo en la rata con N-acilderivados de la cianamida, demuestran que mecanísticamente se comportan igual que la cianamida, puesto que se supone una liberación de la misma "in vivo"; no obstante, la duración de la acción es más prolongada (Nagasawa y col., 1986).

1.9.1.1. Estudios farmacocinéticos

Pocos son los estudios farmacocinéticos en el hombre que existen hasta el momento sobre la cianamida, ya que la mayoría de ellos se han llevado a cabo en animales de experimentación.

Deitrich y col. (Deitrich y col., 1976) estudiaron la disposición de la ^{14}C -cianamida tras su administración intraperitoneal a la rata, detectando únicamente radiactividad en el hígado una hora después de la administración. La radiactividad se excretó principalmente en orina y en una pequeña proporción en forma de $^{14}\text{CO}_2$ en el aliento, siendo los niveles hallados 6 horas después de la administración del fármaco del 94 y 1.5 % respectivamente. La radiactividad hallada en orina no se atribuyó al fármaco inalterado ni a su dímero (cianoguanidina), ni a la presencia de urea marcada, sino que se relacionó con la presencia de un metabolito conteniendo un grupo ciano y de carácter ácido ($\text{pK}_a=3.9$). Dicho metabolito no inhibió la aldehído-deshidrogenasa "in vitro".

Shirota y col. (Shirota y col., 1984) establecieron la estructura del metabolito mayoritario presente en orina tras la administración de cianamida a la rata (1.0 mmol/kg i.p.), conejo (1.75 mmol/kg, i.v.), perro (0.04 mmol/kg, p.o.; 0.04 mmol/kg i.v.) y en orina humana como N-acetilcianamida. Dicha identificación se efectuó por comparación con N-acetilcianamida sintetizada y además, por el hecho de que tanto el metabolito como el producto de síntesis dieron lugar a los mismos fragmentos iónicos en el análisis por espectrometría de masas.

La transformación de cianamida a N-acetilcianamida "in vivo" está catalizada por una N-acetil-transferasa dependiente del acetyl-S-CoA. La incubación de N-acetilcianamida con mitocondria de hígado de rata no inhibió la ALDH de baja K_m "in vitro", estando ello de acuerdo con observaciones previas de Deitrich y col. (Deitrich y col., 1976). En consecuencia, la N-acetilación representa una vía de eliminación del fármaco, de modo que la formación del metabolito activo inhibidor de la ALDH tiene lugar a través de otra vía metabólica distinta, en la que únicamente participa una pequeña fracción de la dosis administrada.

Introducción

Los mismos autores (Shirota y col., 1984) sugieren que el hecho de que la dosis de cianamida recomendada en Japón sea unas 8 veces superior a la recomendada en Europa y Canadá hace pensar que dicho fármaco, igual que la isoniacida y las sulfonamidas, podría presentar polimorfismo de acetilación genético, cuyas implicaciones clínicas serían importantes en el momento de valorar el efecto óptimo del fármaco y de prevenir sus efectos tóxicos. Por otra parte, las diferencias de sensibilidad frente a dicho fármaco, observadas de una especie a otra, también apoyan las diferencias relativas existentes en la acetilación de la cianamida. Así, por ejemplo, la rata y el conejo pueden tolerar dosis más elevadas (1.0 y 1.75 mmol/kg) que el perro, en el que las mismas dosis resultan ser tóxicas. Concretamente, se ha visto que la N-acetil-transferasa procedente de hígado de perro cataliza la acetilación de cianamida por acetyl-S-CoA "in vitro", a una velocidad dos veces más pequeña que la observada con enzima de conejo, siendo ello indicativo de que la capacidad de acetilación en el perro puede ser limitada. Parece ser que la N-acetil-transferasa hepática de perro presenta una especificidad de sustrato mayor que la de otras especies, como lo demuestra el hecho de que sea incapaz de acetilar el grupo N-amino aromático de la sulfanilamida y, sin embargo, es capaz de acetilar el grupo sulfonamido de esta misma molécula, que es isoeléctrico con el grupo ciano directamente unido al nitrógeno del grupo amino de la cianamida. También es interesante señalar que, en el perro, el principal lugar de acetilación del fármaco es el hígado, de tal forma que las cantidades de radiactividad urinaria excretadas como N-acetilcianamida son las mismas, independientemente de que el fármaco se administre por vía intravenosa o bien por vía oral. Además, la preparación de N-acetil-transferasa procedente de mucosa intestinal de perro es incapaz de catalizar la acetilación de la cianamida "in vitro".

Los hallazgos previos de Shirota y col. (Shirota y col., 1984) fueron confirmados en un estudio realizado por Mertschenk y col. (Mertschenk y col., 1991), tras la administración oral de una dosis de 10 mg/kg de cianamida a la rata y de 0.25 mg/kg a voluntarios sanos. Dichos voluntarios también participaron en un estudio de absorción percutánea del fármaco, siendo en este

caso la dosis administrada de 2.3 mg durante 6 horas. Ambas especies mostraron un elevado grado de excreción urinaria de N-acetilcianamida (45.6 % en la rata, y 40 % en el hombre), aunque dichos porcentajes fueron inferiores a los descritos por Shirota y col. en el perro (87%).

La cianamida se absorbe a través de la piel humana; sin embargo, la absorción percutánea es mucho más lenta que la oral (Mertschenk y col., 1991). La recuperación media de la máxima cantidad de cianamida susceptible de absorberse por vía percutánea, en forma de N-acetilcianamida fue de un 7.7%, permaneciendo la cianamida residual del parche inalterada durante todo el estudio. El estudio del metabolismo de la cianamida a cianuro, descrito en ensayos previos "in vitro" (Shirota y col., 1987a, 1987b; DeMaster y col., 1988) demostró que dicha vía metabólica es irrelevante en el hombre, en las condiciones experimentales del ensayo de Mertschenk y col. (Mertschenk y col., 1991), puesto que no se observó un incremento significativo de las concentraciones de cianuro en sangre ni tampoco de tiocianato (metabolito del cianuro) en la orina de los voluntarios que recibieron cianamida por vía oral, respecto a la de los controles.

DeMaster y col. (DeMaster y col., 1984) propusieron una segunda vía metabólica de la cianamida, catalizada por el enzima catalasa, suponiendo que uno de los productos de dicha reacción es un potente inhibidor de la ALDH. Tras estos resultados, los esfuerzos se dirigieron a la identificación de dichos productos. Dado que la cianamida sólo puede experimentar reactividad en el grupo ciano y en el grupo amino y, puesto que el primero de ellos es resistente al metabolismo "in vivo", se postuló como primer compuesto de oxidación por parte de la catalasa a la N-hidroxicianamida, compuesto que, por otra parte, resultó inestable, descomponiéndose en cianuro y nitroxilo. Los mismos autores (Shirota y col., 1987a) demostraron que, efectivamente, el cianuro era uno de los productos formados como consecuencia de la oxidación de la cianamida, trabajando con catalasa de hígado bovino y en presencia del sistema glucosa/glucosa-oxidasa como fuente de peróxido de hidrógeno. Ello fue

Introducción

corroborado por el hecho de que el etanol, substrato de la catalasa, dio lugar a una disminución de la formación de cianuro en este sistema, mientras que el aumento de la concentración de cianamida redujo el efecto inhibitor del etanol en el sistema de oxidación mediado por la catalasa. Además, Cederbaum y Dicker (Cederbaum y Dicker, 1985) demostraron que la cianamida inhibe la oxidación del etanol mediada por la catalasa. Todo ello sugiere la existencia de una competencia entre cianamida y etanol por el enzima catalasa. DeMaster y col. (DeMaster y col., 1986) estudiaron la sensibilidad del enzima catalasa, procedente de distintos tipos de tejidos de rata, frente a la inhibición por cianamida, administrada vía intraperitoneal, observando que la catalasa hepática era la más afectada, seguida de las de riñón, corazón y cerebro, siendo la eritrocitaria la menos sensible de todas.

La identificación del cianuro como metabolito de la cianamida podría tener implicaciones toxicológicas en situaciones en las que la vía de N-acetilación, vía que por otra parte parece ser la mayoritaria, esté restringida, en cuyo caso se hallaría potenciada la vía de la catalasa. Ello podría explicar que el perro, que como ya se ha indicado presenta una capacidad de acetilación inferior a la de otras especies, sea altamente susceptible a los efectos tóxicos de la cianamida a dosis perfectamente bien toleradas por el conejo y la rata (Shirota y col, 1984).

En otro trabajo posterior de los mismos autores (DeMaster y col., 1988) se demostró de nuevo la oxidación de la cianamida vía catalasa, en un ensayo "in vitro", en presencia de hidróperóxido de cumeno en lugar de peróxido de hidrógeno, catalasa de hígado bovino y glucosa-oxidasa. Los productos de dicha reacción fueron de nuevo cianuro y un inhibidor de la ALDH. Dicha inhibición se determinó a través de la pérdida de actividad de la ALDH de levadura a lo largo del tiempo. El hidróperóxido de cumeno inhibió la actividad ALDH incluso en ausencia de catalasa, aunque en menor grado que en su presencia. Según dichos autores, estos resultados confirman de nuevo el hecho de que la oxidación de la cianamida vía catalasa, ya sea en presencia de peróxido de hidrógeno o

bien de hidroperóxido de cumeno, transcurre con la formación de N-hidroxicianamida que se descompone en cianuro, compuesto identificado, y en un inhibidor de la ALDH no identificado, que se postula podría tratarse de nitroxilo.

Por otra parte, Pruñonosa y col. (Pruñonosa y col., 1989, 1991) estudiaron "in vitro" el mecanismo de inactivación de la ALDH de baja K_m de mitocondria de hígado de rata por la cianamida. El motivo por el cual dichos autores seleccionaron la ALDH de baja K_m se basa en el hecho de que, en la rata, el metabolismo del acetaldehído se da principalmente en la mitocondria hepática (Marjanen, 1972) y, además de que la ALDH de baja K_m es mucho más sensible a la inactivación por cianamida que otras ALDHs (Loomis y Brien, 1983a). Dicho enzima fue purificado por cromatografía de afinidad, con objeto de conseguir una preparación totalmente libre de catalasa y también de ALDH de elevada K_m y así poder establecer los mínimos requerimientos y condiciones para conseguir la inactivación del enzima por la cianamida. De hecho, la cinética de inactivación de dicho enzima por la cianamida ya había sido estudiada "in vitro" por Marchner y Tottmar (Marchner y Tottmar, 1983). Pruñonosa y col. (Pruñonosa y col., 1989) incubaron cantidades constantes de ALDH de baja K_m , con distintas concentraciones de cianamida ($0.05-0.20 \mu M^{-1}$), a distintos períodos de tiempo y en presencia de NAD^+ $50 \mu M$ y $900 U/ml$ de catalasa. La cinética de inactivación observada fue dependiente del tiempo y la representación del logaritmo de la fracción de actividad remanente (A) frente al tiempo dio lugar a una recta, siendo ello indicativo de la existencia de un proceso de saturación; la constante de velocidad de pseudo-primer orden (K_{obs}) se calculó a partir de la Ecuación 1.4.

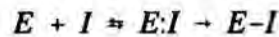
$$A = A_o \cdot \exp (- K_{obs} \cdot t)$$

Ecuación 1.4

Los resultados obtenidos indicaron que la inactivación del enzima de baja K_m requería la co-incubación del mismo con NAD^+ y catalasa, en presencia

Introducción

de cianamida. Ello podría sugerir la participación tanto de la catalasa como del NAD^+ en un complejo holoenzima-inhibidor (E-I), tal como a continuación se indica,



siendo E:I y E-I los complejos reversible y covalente holoenzima-inhibidor, respectivamente, y las constantes de velocidad de pseudo-primer orden (K_{obs}) y de afinidad (K_I), las dadas por las Ecuaciones 1.5 y 1.6, respectivamente:

$$K_{obs} = \frac{K_{+2} \cdot (I)}{K_I + (I)} \quad \text{Ecuación 1.5}$$

$$K_I = K_{-1} + \frac{K_{+2}}{K_{+1}} \quad \text{Ecuación 1.6}$$

Tras incubación en ausencia de ALDH, no se generó ninguna forma activa de la cianamida; según dichos autores, es posible que dicho complejo esté constituido por ALDH, NAD, catalasa y cianamida y, además, no descartan la posibilidad de que la propia cianamida sea el inhibidor. El centro activo de la catalasa podría estar relacionado con esta unión, puesto que no se observó efecto inhibidor tras el bloqueo del centro activo con azida sódica. La cianamida del complejo holoenzima-inhibidor podría interaccionar con el centro de la ALDH para aldehídos y dar lugar a una inactivación irreversible. Ello está de acuerdo con los resultados obtenidos en hígado con metabolismo activo del etanol (Marchner y Tottmar, 1978), en el que la ALDH no se halla inactivada, sugiriendo ello que el acetaldehído formado a partir del metabolismo del etanol ejerce un efecto protector del enzima. La hipótesis planteada por los autores puede correlacionarse con el efecto protector frente a la inactivación por cianamida conseguido por el inhibidor competitivo del aldehído, el hidrato de

cloral. El hecho de que el etanol no muestre efecto protector de la inactivación del enzima por cianamida "in vitro" y, sin embargo, éste se haga presente "in vivo" (Marchner y Tottmar, 1978) podría confirmar que el acetaldehído derivado del metabolismo del etanol "in vivo" es el responsable del efecto protector de la ALDH.

Según Kirkman y Gaetani (Kirkman y Gaetani, 1984), la catalasa posee afinidad por los adenín-dinucleótidos. Cada molécula tetramérica de catalasa bovina o bien humana contiene cuatro moléculas de NADPH ligado, de forma que los locus de unión presentan una mayor afinidad por el NADPH, seguido del NADH, NADP⁺ y NAD⁺. Así, la influencia del NAD⁺ o bien del NADH en la inactivación de la ALDH de baja K_m puede explicarse por la existencia del equilibrio:



El complejo catalasa-NAD⁺ puede competir con el NAD⁺ libre por el locus de unión de dicho coenzima a la ALDH. Dichos autores no observaron la cinética de saturación del NAD⁺ descrita en trabajos previos (Marchner y Tottmar, 1983), siendo ello atribuido a las diferentes preparaciones enzimáticas utilizadas en ambos casos.

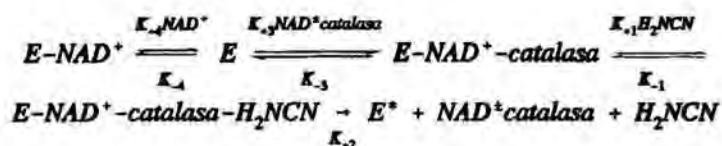
Mientras que DeMaster y col. (DeMaster y col., 1985) estimaron la velocidad relativa de formación del metabolito reactivo de la cianamida, catalizada por catalasa de hígado bovino purificada y utilizando ALDH de levadura purificada, y en presencia de ascorbato y una fuente de peróxido de hidrógeno, Pruñonosa y col. (Pruñonosa y col., 1989) no utilizaron fuente alguna de peróxido de hidrógeno. Éstos observaron que la concentración de cianamida en el medio de incubación, en el que la ALDH de baja K_m estaba inhibida, permaneció constante durante 24 horas, corroborando ello la hipótesis de que la catalasa no ejerce ningún efecto catalítico sobre la cianamida. Estos resultados

Introducción

están de acuerdo con los obtenidos tras la incubación de NAD^+ , con catalasa y cianamida, en los que no se observó la formación de ningún metabolito activo y, además, apoyan el hecho de que la cianamida, en presencia de NAD^+ y catalasa, podría ser el verdadero inhibidor de la ALDH. El valor de la constante de afinidad entre holoenzima e inhibidor, hallado en este trabajo, del orden de $10.9 \mu\text{M}$ fue similar al obtenido previamente por otros autores, $3 \mu\text{M}$ (Marchner y Tottmar, 1983) y $17 \mu\text{M}$ (Svanas y Weiner, 1985). Sin embargo, Svanas y Weiner hallaron un valor de $250 \mu\text{M}$ para dicha constante, trabajando con membranas mitocondriales intactas y en presencia de malonato 0.1M . La adición de malonato dio lugar a la inhibición de la actividad de la catalasa en un 75% y el incremento del valor de la constante de afinidad K_i se interpretó como una reducción de la afinidad de la ALDH por el inhibidor. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que los valores de K_i varían de forma inversamente proporcional a la concentración de catalasa, observado por los autores. Por otra parte, el valor de la constante de velocidad de transformación del complejo reversible holoenzima-inhibidor en un complejo covalente (K_{+2}), obtenido por Pruñonosa y col. es distinto al obtenido en trabajos previos (Marchner y Tottmar, 1983; Svanas y Weiner, 1985), sugiriendo ello que en la etapa limitante de la velocidad pueden estar implicados distintos complejos holoenzima-inhibidor. Concretamente, Pruñonosa y col. (Pruñonosa y col., 1989) proponen un complejo holoenzima-inhibidor constituido por ALDH de baja K_m , NAD^+ , catalasa y cianamida, que podría ser una explicación alternativa al mecanismo de inhibición de la ALDH por cianamida "in vitro". Además, apuntan que la inactivación de la ALDH de baja K_m por cianamida podría deberse a una reacción mediada por la catalasa, actuando dicho enzima como transportador de la cianamida al centro activo de la ALDH, más que a un efecto catalítico de la cianamida inducido por la catalasa.

En un trabajo posterior, los mismos autores (Pruñonosa y col., 1991) describen el posible mecanismo de inactivación de la ALDH mitocondrial de hígado de rata de baja K_m por cianamida "in vitro", en presencia de catalasa y de NAD^+ . De acuerdo con los resultados obtenidos, el efecto de la

concentración de NAD^+ en presencia de distintas concentraciones del enzima catalasa sobre la inactivación de la ALDH por cianamida (20 y 200 μM) "in vitro" apunta hacia la formación de un complejo ALDH- NAD^+ -catalasa antes de la unión de la cianamida para dar lugar al complejo holoenzima-inhibidor. El proceso de inactivación de la ALDH de baja K_m propuesto en dicho trabajo es el que a continuación se indica:



siendo E la ALDH de baja K_m y E^* el mismo enzima inactivado de forma irreversible. La unión hipotética de la cianamida al complejo holoenzima ($E - \text{NAD}^+ - \text{catalasa}$) para dar lugar al complejo reversible holoenzima-inhibidor, antes de la inactivación irreversible de la ALDH, está de acuerdo con el efecto de saturación observado cuando se consideran los valores de la constante de velocidad aparente de primer orden (K_{obs}), frente a distintas concentraciones de cianamida (Pruñonosa y col., 1989; Marchner y Tottmar, 1983). Además, si la cianamida reaccionara con el locus de unión de aldehídos de la ALDH, como se ha descrito previamente (Pruñonosa y col., 1989; Svanas y Weiner, 1985), debería esperarse una unión secuencial, como ocurre con otras ALDH de mamíferos (Takahashi y Weiner, 1981a). En el mecanismo propuesto por dichos autores, se obtiene al final la forma libre, tanto de la ALDH (inactivada de forma irreversible) como de la cianamida; de hecho, no se observa desaparición de cianamida durante el proceso de inactivación, siendo destacable que en la técnica analítica utilizada existe un proceso de desproteización que daría lugar a la desaparición de cianamida en caso de que ésta formara parte de un complejo final inactivado irreversiblemente con la ALDH.

Introducción

En este trabajo, los autores hacen de nuevo incidencia en la dependencia del valor de la constante de afinidad (K_1) de la concentración del enzima catalasa, hecho que explica las amplias diferencias halladas en dicho valor de K_1 por distintos autores (Svanas y Weiner, 1985; Marchner y Tottmar, 1983).

En cuanto al efecto del pH sobre la velocidad de inactivación de la ALDH por cianamida, se observó un importante descenso del valor de la K_{obs} a pH inferior a 7.0, siendo su valor mínimo a pH 6.8. Ello sugiere la existencia de un grupo de pKa 6.8 en el locus activo, que podría participar en la reacción de inactivación; presumiblemente, podría tratarse de histidina, por correlación con la postulada presencia de dicho aminoácido en el centro activo de la ALDH de caballo (Takahashi y col., 1981b; Tu y Weiner, 1988).

Otro de los estudios farmacocinéticos de la cianamida en animales de experimentación fue el realizado por Loomis y Brien (Loomis y Brien, 1981), que determinaron el decurso de sus concentraciones plasmáticas tras la administración oral de 7.0 mg/kg de cianamida cálcica a la rata. Los resultados obtenidos indicaron una rápida absorción del fármaco a través del tracto gastrointestinal, previa hidrólisis y transformación en cianamida. Ensayos "in vitro" demostraron que la cianamida cálcica se hidrolizaba, dando aproximadamente un 60 % de cianamida en una hora y siendo la reacción cuantitativa al cabo de 10 horas. La concentración plasmática máxima se alcanzó a los 60 minutos de la administración del fármaco y se observó una caída monoexponencial de los niveles plasmáticos, de acuerdo con un proceso cinético de primer orden. La semivida aparente de eliminación del fármaco fue de 92.4 minutos. Tras 6 horas de seguimiento, no se detectó, en este caso, cianamida en el hígado.

Obach y col. (Obach y col., 1980), trabajando también con la rata como animal de experimentación, determinaron las concentraciones de fármaco en sangre total mediante la técnica analítica descrita por Buyske y col. (Buyske y col., 1960), así como los niveles de excreción biliar tras la administración de

dosis intravenosas de 17.5, 35 y 70 mg/kg de cianamida. Los resultados obtenidos por dichos autores, ponen de manifiesto una cinética bicompartimental, así como un comportamiento dosis-dependiente para la cianamida en el ámbito de dosis ensayadas (17.5 - 70 mg/kg), puesto que los parámetros farmacocinéticos obtenidos no permanecen constantes al variar la dosis, a excepción de la constante de velocidad de la fase lenta de disposición β . La excreción biliar, por el contrario, ocurre a velocidad constante e independiente de la dosis, siendo las cantidades totales excretadas en bilis proporcionales a las dosis administradas, al tiempo que su magnitud es irrelevante respecto a la dosis administrada. Luego, el paralelismo hallado entre la velocidad de eliminación y la linealidad en la excreción biliar, junto al hecho de que la concentración de cianamida en bilis no sea superior a la concentración hemática a un mismo tiempo, hace pensar que dicha excreción biliar transcurre de acuerdo con una cinética de primer orden. Por lo tanto, se asume la existencia de una cinética de eliminación de primer orden que no es la responsable de la no linealidad cinética observada en dicha especie.

La cianamida presenta una especial afinidad por los hematíes. Los mismos autores (Obach y col., 1979) demostraron que los niveles intraeritrocitarios de cianamida en la rata son elevados y su semivida de desaparición muy superior a la semivida plasmática. Ensayando en conejos, se obtuvieron resultados similares, que apuntaban a que los niveles intraeritrocitarios de cianamida perduraban más que los niveles plasmáticos (Obach y col., 1981).

Helander y Tottmar (Helander y Tottmar, 1988) efectuaron un estudio comparativo "in vitro" sobre la inhibición de la ALDH presente en leucocitos y eritrocitos humanos, por parte de cianamida, disulfiram y 1-aminociclopropanol (ACP). Dicho estudio demostró que tanto la cianamida como el ACP son potentes inactivadores de la actividad ALDH leucocitaria, dando lugar a una inhibición del 50 % a concentraciones de 10 y 50 μ M, respectivamente; sin embargo, la actividad eritrocitaria se ve mucho menos afectada. Por el contrario,

Introducción

en el caso del disulfiram, la actividad ALDH eritrocitaria fue mucho más sensible y sólo fueron necesarias concentraciones de aproximadamente $0.5 \mu\text{M}$ para lograr una inhibición del 50 % de la actividad. Dichos resultados indican que la actividad de la ALDH en eritrocitos y en leucocitos humanos constituye un marcador "in vivo" bastante accesible para evaluar las respuestas tipo-disulfiram de distintos tipos de tratamiento. Sin embargo, puesto que los eritrocitos maduros, en contraste con los leucocitos, carecen de la capacidad de sintetizar nuevo enzima, la ALDH eritrocitaria no es un buen marcador de la duración de la inhibición debida a inhibidores irreversibles de la ALDH.

La localización intraeritrocitaria de la ALDH y el hecho de que los niveles plasmáticos de cianamida no se correlacionen con su efecto farmacológico, tal y como ya se ha mencionado anteriormente, permiten la hipótesis de que los eritrocitos pudieran jugar un papel importante en el comportamiento farmacocinético y en la acción farmacológica de dicho fármaco (Obach y col., 1984).

1.9.1.2. Reacción cianamida-etanol

Se han llevado a cabo diversos estudios con objeto de determinar la interacción cianamida-etanol. La intensidad de dicha interacción, que de hecho se debe al acetaldehído, depende de muchos factores, entre ellos la dosis de fármaco administrado, el tiempo transcurrido entre su administración y la ingesta de alcohol y también la variabilidad interindividual en la respuesta. A diferencia del disulfiram, parece que la cianamida inicia su acción de forma más rápida (aproximadamente en una hora, frente a un tiempo de latencia de 12 horas para el disulfiram) (Collins y Brown, 1960) y, además, presenta una duración de acción de aproximadamente 24 horas (Brien y col., 1978), en contraposición con el disulfiram, en el que la duración de su efecto es de 3 a 10 días. En un estudio a doble ciego, controlado con placebo, efectuado en 5 voluntarios alcohólicos (Brien y col., 1979), la administración oral de 0.7 mg/kg de cianamida cálcica,

12 horas antes de la ingesta de alcohol, a las dosis de 0.125, 0.25 y 0.5 g/kg dio lugar a aumento de los niveles sanguíneos de acetaldehído, taquicardia y descenso de la presión diastólica. La intensidad de dicha reacción fue tanto mayor cuanto mayor fue la dosis de etanol ingerida, siendo los resultados obtenidos, tras la dosis más elevada de alcohol, concordantes con los hallados en estudios previos (Brien y col., 1978). Los voluntarios únicamente fueron conscientes de experimentar la reacción aversiva tras las dos dosis más elevadas de alcohol (0.25 y 0.5 g/kg), con las que la frecuencia cardíaca superó los 100 latidos por minuto y con niveles de acetaldehído sanguíneo superiores a 90 μM . Teniendo en cuenta únicamente dicho parámetro, el inicio de la reacción se dio a las 0.25 horas tras 0.5 g/kg de etanol y a las 0.38 horas tras 0.25 g/kg de etanol y la duración de los síntomas fue de 1 y 0.38 horas, respectivamente. Se observó una correlación lineal positiva entre los niveles de acetaldehído y la frecuencia cardíaca. Ello está de acuerdo con la taquicardia observada tras la infusión intravenosa de acetaldehído en animales de experimentación, así como con la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas, inducida también por acetaldehído. Además, estudios de perfusión en preparación aislada de corazón (Schreiber y col., 1972) han demostrado que el propranolol, fármaco β -bloqueante, puede inhibir el efecto cronotrópico positivo del acetaldehído, indicando que éste actúa indirectamente a través de las catecolaminas. Cabe señalar que los niveles de acetaldehído, determinados y considerados como aversivos en dicho estudio, fueron bastante más elevados que los de un estudio con voluntarios sanos, en los que niveles de 40-60 μM ya dieron lugar a reacciones aversivas (Johnsen y col., 1992); ello se cree se debe a un problema de tipo metodológico en la determinación analítica del acetaldehído en el primer estudio (Brien y col., 1979).

También se observó una correlación positiva entre los niveles de acetaldehído y presión de pulso. El cambio observado en la presión de pulso se debe al descenso de la presión diastólica. Por otra parte, el acetaldehído induce un aumento en la presión sanguínea; sin embargo, el bloqueo previo de los

Introducción

receptores α -adrenérgicos con fentolamina o bien la deplección de los depósitos de catecolaminas con reserpina da lugar a una respuesta depresora de la presión sanguínea.

En la reacción etanol-disulfiram se ha postulado que la hipotensión también observada podría deberse a una inhibición de la dopamina- β -hidroxilasa por parte del fármaco, dando lugar a una menor disponibilidad de noradrenalina y, por lo tanto, a una menor liberación de la misma por parte del acetaldehído. Se sugiere también que, en este caso, el acetaldehído actúa directamente sobre el músculo liso de las paredes vasculares, dando lugar a hipotensión. Sin embargo, este mecanismo no parece factible en el caso de la cianamida, puesto que dicho fármaco no inhibe la dopamina- β -hidroxilasa. Sin embargo, en caso de que así fuera, se pondría en duda si la deplección de la noradrenalina, observada en una hora, es suficiente para explicar la hipotensión inducida tras la reacción cianamida-etanol, con un intervalo de tiempo entre administración del fármaco e ingesta de alcohol de 12 horas. Tampoco la presencia de niveles elevados de acetaldehído en sangre es suficiente para inducir la hipotensión observada en este tipo de reacciones. Por lo tanto, el mecanismo por el cual tanto la cianamida como el disulfiram alteran la respuesta vascular frente al acetaldehído no está del todo claro.

En este mismo estudio (Brien y col., 1979) también se observó que tras la dosis más alta de etanol (0.5 g/kg) el tratamiento previo con cianamida redujo la velocidad metabólica del etanol, de forma que tras una dosis dada de alcohol, sus concentraciones sanguíneas son superiores en presencia de dicho fármaco que en ausencia del mismo, siendo ello consecuencia de la inhibición del proceso irreversible catalizado por la aldehído-deshidrogenasa, puesto que al estar inhibida dicha etapa, el proceso reversible correspondiente al equilibrio de concentraciones entre alcohol y acetaldehído se desplaza hacia la formación de alcohol.

Otro estudio clínico a doble ciego, controlado con placebo, efectuado en voluntarios no alcohólicos, con objeto de comparar los efectos aversivos de la cianamida y del disulfiram (Peachey y col., 1983), puso de manifiesto que las concentraciones de acetaldehído alcanzadas en sangre eran significativamente mayores tras la administración de cianamida (0.7 mg/kg, dos veces al día) que tras la administración de disulfiram (3.5 mg/kg, una vez al día). Los demás síntomas de la reacción fueron similares para ambos fármacos, excepto palpitations y disnea, que fueron más graves en el caso de la cianamida. Por otra parte, la ingesta de dosis repetidas de alcohol dio lugar a una reducción del 85 % del nivel del acetaldehído sanguíneo en el caso de la cianamida cálcica y del 35 % en el caso del disulfiram; ello sugiere que la inhibición de la ALDH inducida por cianamida puede revertir en mayor extensión que la del disulfiram. El mecanismo no está del todo claro, pero parece que el acetaldehído ejerce un efecto protector sobre el enzima frente a la inhibición por parte de la cianamida, a través de su interacción con el inhibidor y con la ALDH mitocondrial de baja K_m (Marchner y Tottmar, 1978).

Además de los síntomas característicos de la reacción cianamida-acetaldehído, un hecho importante a destacar es que dicho fármaco induce una lesión celular hepática consistente en cuerpos de inclusión citoplasmáticos estructuralmente similares a los de Lafora. En un estudio prospectivo, llevado a cabo por Vázquez y col. (Vázquez y col., 1983), se vio que tras la biopsia en 10 pacientes alcohólicos que habían sido tratados con cianamida, todos ellos presentaban cuerpos de inclusión, excepto uno. Siete de ellos estaban todavía bajo tratamiento y otros dos llevaban de 3 a 7 años sin tomar cianamida, mientras que el último, que no presentaba cuerpos de inclusión, sólo había sido tratado con una dosis baja y durante un período corto de tiempo, unos tres años antes de practicarse la biopsia. Ante estos resultados, se consideró que este tipo de lesión podía ser predecible y que la ausencia de inclusiones en un paciente podía explicarse por su desaparición una vez cesado el tratamiento.

Introducción

Posteriormente, se han llevado a cabo otros estudios que apoyan este hecho. Así, por ejemplo, Bruguera y col. (Bruguera y col., 1987) observaron la presencia de hepatocitos con aspecto de vidrio esmerilado, en hígado de nueve pacientes alcohólicos tratados con cianamida; sin embargo, dicha alteración celular únicamente se observó en sólo uno de los cuatro individuos que habían recibido el fármaco varios meses antes de haberse practicado la biopsia. Por el contrario, ninguno de los 15 pacientes tratados con disulfiram presentó esta patología.

1.10. Bibliografía

Adesnik M., Bar-Nun S., Maschio F., Zunich M., Lippmann A., Bard E. Mechanism of induction of cytochrome P-450 by phenobarbital. *J. Biol. Chem.* **256**, 10340-10345 (1981).

Adinolfi A., Adinolfi M., Hopkinson D.A. Immunological and biochemical characterization of the human alcohol dehydrogenase chi-ADH isozyme. *Ann. Hum. Genet.* **48**, 1-10 (1984).

Alderman J., Tagaki T., Lieber C.S. Ethanol metabolizing pathways in deermice. Estimation of flux calculated from isotope effects. *J. Biol. Chem.* **262**, 7497-7503 (1987).

Alvarez F.J., Queipo D., Del Rio M.C., Garcia M.C. Alcohol consumption in young adults in the rural communities of Spain. *Alcohol Alcohol.* **26(1)**, 93-101 (1991).

A.P.A. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. 3ª Edición Revisada. Edit. Masson. Barcelona.

Baraona E., Leo M.A., Borowsky S.A. et al. Pathogenesis of alcohol-induced accumulation of protein in the liver. *J. Clin. Invest.* **60**, 546-5543 (1977).

Berry M.N., Clark D.G., Grivell A.R. Wallace P.G. The calorogenic nature of hepatic ketogenesis: an explanation for the stimulation of respiration induced by fatty acid substrates. *Eur. J. Biochem.* **131**, 205-214 (1983).

Borowsky S.A., Perlow W., Rarsona E. et al. Relationship of alcoholic hypertriglyceridemia to stage of liver disease and dietary lipid. *Dig. Dis. Sci.* **25**, 22-27 (1980).

Bosron W.F., Li T-K. Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism. *Hepatology* **6 (3)**, 502-510 (1986).

Boveris A., Oshino N., Chance C. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **128**, 617-630 (1972).

Brien J.F., Peachey J.E., Rogers B.J., Loomis C.W. A study of the calcium carbimide ethanol interaction in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **14**, 133-141 (1978).

Introducción

Brien J.F., Peachey J.E., Rogers B.J., Loomis C.W. A study of the calcium carbimide ethanol interaction in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* **25** (4), 454-463 (1979).

Bruguera M., Parés A., Heredia D., Rodés J. Cyanamide hepatotoxicity. Incidence and clinico-pathological features. *Liver* **7**, 216-222 (1987).

Buyske D.A., Downing V. Spectrophotometric determination of cyanamide. *Anal. Chem.* **32** (13), 1798-1800 (1960).

Caballería J., Baraona E., Rodamilans M. et al. Effects of cimetidine on gastric alcohol dehydrogenase activity and blood ethanol levels. *Gastroenterology* **96**, 388-392 (1989).

Calderini G., Morselli P.L., Garattini S. Effect of amphetamine and fenfluramine on brain noradrenaline and MOPEG-SO₄. *Eur. J. Pharmacol.* **34**, 345-350 (1975).

Cederbaum A.I., Dicker E. Inhibition of the peroxidatic activity of catalase toward alcohols by the aldehyde dehydrogenase inhibitor cyanamide. *Toxicol. Lett.* **29**, 107-114 (1985).

Collins J.M., Brown L.M. Calcium carbimide, a new protective drug in alcoholism. *Med. J. Aust.* **1**, 835-838 (1960).

Conde V., Pacheco L., Pérez C. Descripción de los pacientes diagnosticados de "síndrome de dependencia del alcohol" y "abuso del alcohol" según criterios C.I.E.-9^a de la O.M.S., en un servicio de hospitalización psiquiátrica. *Actas Luso-Esp. Neurol. Psiquiatr. Cienc. Afines* **18** (3), 193-204 (1990).

Coon M.J., Koop D.R. Role of alcohol P-450 oxygenase (APO) in microsomal ethanol oxidation. *Alcohol* **2**, 23-36 (1985).

Coon M.J., Koop D.R. Alcohol-inducible cytochrome P-450 (P-450_{ALC}). *Arch. Toxicol.* **60**, 16-21 (1987).

Deitrich R.A., Troxell P.A., Worth W., Erwin G.V. Inhibition of aldehyde dehydrogenase in brain and liver by cyanamide. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 2733-2737 (1976).

Del Rio M., Alvarez F.J., Queipo D. Patterns of alcohol use among University Students in Spain. *Alcohol Alcohol.* **24**, 465-471 (1989).

DeMaster E.G., Kaplan E., Shirota F.N., Nagasawa H.T. Metabolic activation of cyanamide by liver mitochondria, a requirement for the inhibition of aldehyde dehydrogenase enzymes. *Biochem. Biophys. Pharmacol.* **28**, 2551-2556 (1979).

DeMaster E.G., Nagasawa H.T., Shirota F.N. Metabolic activation of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase in vitro. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **18**, 273-277 (1983).

DeMaster E.G., Shirota F.N., Nagasawa H.T. The metabolic activation of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase is catalyzed by catalase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 358-365 (1984).

DeMaster E.G., Shirota F.N., Nagasawa H.T. Catalase mediated conversion of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase. *Alcohol* **2**, 117-121 (1985).

DeMaster E.G., Redfern B., Shirota F.N., Nagasawa H.T. Differential inhibition of rat tissue catalase by cyanamide. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 2081-2085 (1986).

DeMaster E.G., Shirota F.N., Nagasawa H.T. Oxidation of cyanamide by a cumene hydroperoxide-supported catalase reaction yields cyanide and an inhibitor of aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Arch.* **4**, 203-207 (1988).

DiPadova C., Roine R., Frezza M., Gentry R.T., Baraona E., et al. Effects of ranitidine on blood alcohol levels after ethanol ingestion: comparison with other H₂-antagonists. *JAMA* **267**, 83-86 (1992).

DiPalma J.R. The nitrites and nitrates. *Am. Fam. Physician* **25**, 216-218 (1982).

Eckfeldt J., Mope L., Takio K., Yonetani T. Horse liver aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of two isozymes. *J. Biol. Chem.* **25** (1), 236-240 (1976).

Espinás J., Salla R.M., Alonso L., Pomar A.J., Llor J.L., Custodi J., Garcia G., Vilaseca J., Farrus M., Zaera L. y col. Estudio de la prevalencia del consumo de alcohol en la comarca del Baix Ebre (Tarragona). *Aten. Primaria* **6** (7), 488-492 (1989).

Introducción

Feldman R.I., Weiner H. Horse liver aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **247** (1), 260-266 (1972).

Ferguson J.W.K. A new drug for alcoholism treatment. *Can. Med. Assoc. J.* **74**, 793-795 (1956).

Fitzgerald M.G., Gaddie R., Malins J.M., O'Sullivan D.T. Alcohol sensitivity in diabetics receiving chlorpropamide. *Diabetes* **11**, 40-42 (1962).

Foerster E.C., Fahrenkemper T., Rabe U., Graf P., Sies H. Peroxisomal fatty acid oxidation as detected by H₂O₂ production in intact perfused rat liver. *Biochem. J.* **196**, 705-712 (1981).

Fujimiya T., Yamaoka K., Fukui Y. Parallel first-order and Michaelis-Menten elimination kinetics of ethanol. Respective role of alcohol dehydrogenase (ADH), non-ADH and first-order pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **249** (1), 311-317 (1989).

Garro A.J., Seitz H.K., Lieber C.S. Enhancement of dimethylnitrosamine metabolism and activation to a mutagen following chronic ethanol consumption. *Cancer Res.* **41**, 120-124 (1981).

Gili M., Giner J., Lacalle J.R., Franco D., Velasco A. Detección de problemas relacionados con el alcohol en la atención primaria. *Gac. Sanit.* **4** (19), 135-139 (1990).

Goedde H.W., Harada S., Agarwal D.P. Racial differences in alcohol sensitivity: a new hypothesis. *Hum. Genet.* **51**, 331-334 (1979).

Grunnet N., Quistorff B., Thieden H.L.D. Rate limiting factors in ethanol oxidation by isolated rat liver parenchyma cells. Effect of concentration fructose, pyruvate and pyrazole. *Eur. J. Biochem.* **40**, 275-282 (1973).

Guild W.R., Young I.V., Merrill J.P. Anuria due to carbon tetrachloride intoxication. *Ann. Intern. Med.* **48**, 1221-1227 (1958).

Hald J., Jacobsen E. The formation of acetaldehyde in the organism after ingestion of antabuse (tetraethylthiuram-disulphide) and alcohol. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **4**, 305-309 (1948).

Handler J.A., Thurman R.G. Rates of H₂O₂ generation from peroxisomal beta-oxidation are sufficient to account for fatty acid-stimulated ethanol metabolism in perfused rat liver. *Alcohol* **4**, 131-134 (1987a).

Handler J.A., Thurman R.G. Metabolism of butanol by alcohol dehydrogenase ADH inhibits methanol oxidation via catalase-hydrogen peroxidase in perfused rat liver. *Fed. Proc.* **46** (3), 539 (1987b).

Harada S., Agarwal D.P., Goedde H.W. Electrophoretic and biochemical studies of human aldehyde dehydrogenase isozymes in various tissues. *Life Sci.* **26**, 1773-1780 (1980).

Hawkins R.P., Kalant H. The metabolism of ethanol and its metabolic effects. *Pharmacol. Rev.* **24**, 67-157 (1972).

Hawkins R.D., Kalant H., Khanna J.M. Effects of chronic intake of ethanol on rate of ethanol metabolism. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **44**, 241-257 (1966).

Helander A., Tottmar O. Cellular distribution and properties of human blood aldehyde dehydrogenase. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **10**, 71-76 (1986).

Helander A., Tottmar O. Metabolism of biogenic aldehydes in human isolated blood cells, platelets and in plasma. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 1077-1082 (1987).

Helander A., Tottmar O. Effects of disulfiram, cyanamide and 1-aminocyclopropanol on the aldehyde dehydrogenase activity in human erythrocytes and leukocytes. *Pharmacol. Toxicol.* **63**, 262-265 (1988).

Hempel J., von Bahr-Lindstrom H., Jörnvall H. Aldehyde dehydrogenase from human liver. Primary structure of the cytoplasmic isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **141**, 21-35 (1985).

Hempel J., Kaiser R., Jörnvallo H. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase from human liver. Primary structure, differences in relation to the cytosolic enzyme, and functional correlations. *Eur. J. Biochem.* **153**, 13-28 (1985).

Hempel J., Holmquist B., Fleetword L., Kaiser R., Barros-Söderling J., Buhler R., Vallee B.L., Jörnvall H. *Biochemistry* **24**, 5303-5307 (1985).

Holford N.H.G. Clinical pharmacokinetics of ethanol. *Clin. Pharmacokinet.* **13**, 273-292 (1987).

Introducción

Holloway M. Treatment for addiction. *Sci. Am. March*, 95-103 (1991).

Ingelman-Sundberg M., Deitrich R.A., Troxell P.A. Worth W.S. Erwin V.G. Inhibition of aldehyde dehydrogenase in brain and liver by cyanamide. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 2733 (1976).

Johansson I., Ingelman-Sundberg M. Mechanism of hydroxyl radical formation and ethanol oxidation by ethanol-inducible and other forms of rabbit liver microsomal cytochromes P-450. *J. Biol. Chem.* **259** (10), 6447-6458 (1984).

Johnsen J., Stowell A., Morland J. Clinical responses in relation to blood acetaldehyde levels. *Pharmacol. Toxicol.* **70**, 41-45 (1992).

Karter R.M., Carulli N., Iber F.L. Differences in the rate of ethanol metabolism in recently drinking alcoholics and non-drinking subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **22**, 1608-1617 (1969).

Kato R. Effect of administration of 3-aminotriazole on the activity of microsomal drug-metabolizing enzyme systems of rat liver. *Jpn. J. Pharmacol.* **17**(1), 56-63 (1967).

Kato S., Alderman J., Lieber C.S. Respective roles of the microsomal ethanol oxidizing system and catalase in ethanol metabolism by deermice lacking alcohol dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **254**, 586-591 (1987).

Keiding S., Christensen N.J., Damgaard S.E. et al. Ethanol metabolism in heavy drinkers after massive and moderate alcohol intake. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 3097-3102 (1983).

Kershenobich D., Vargas F., Garcia-Tsao G., Tamayo R.P., et al. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. *N. Engl. J. Med.* **318**, 1709-1713 (1988).

Kirkman H.N., Gaetani G.F. Catalase: a tetrameric enzyme with four molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4343-4347 (1984).

Kitson T.M., Crow K.E. Studies on possible mechanisms for the interaction between cyanamide and aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **28**, 2551 (1979).

Koop D.R., Morgan E.T., Tarr G.E., Coon M.J. Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J. Biol. Chem.* **257**, 8472-8480 (1982).

Koop D.R., Coon M.J. Purification of liver microsomal cytochrome P-450 isozymes 3a and 6 from imidazole-treated rabbits. Evidence for the identity of isozyme 3a with the form obtained with ethanol treatment. *Mol. Pharmacol.* **254**, 94-501 (1984).

Koop D.R., Casazza J.P. Identification of ethanol-inducible P450 isozyme 3a as the acetone and acetol monooxygenase of rabbit microsomes. *J. Biol. Chem.* **260**, 13607-13612 (1985).

Koop D.R., Crump B.L., Nordblom G.D., Coon M.J. Immunochemical evidence for induction of the alcohol-oxidizing cytochrome P-450 in liver microsomal ethanol, imidazole, trichloroethylene, acetone, pyrazole and isoniazid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4065-4069 (1985).

Kraemer R.J., Deitrich R.A. Isolation and characterization of human liver aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **243**, 6402-6408 (1968).

Lasker J.M., Raucy J., Kubota S., Bloswick B.P., Black M., Lieber C.S. Purification and characterization of human liver cytochrome P-450_{ALC}. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 232-238 (1987a).

Lasker J.M., Tsutsumi M., Bloswick B.P., Lieber C.S. *Hepatology* **7**, 432 (1987b).

Lefevre A., Adler H., Lieber C.S. Effect of ethanol on ketone metabolism. *J. Clin. Invest.* **49**, 1775-1782 (1970).

Leo M.A., Kim C.L., Lieber C.S. Increased vitamin A in esophagus and other extrahepatic tissues after chronic ethanol consumption in the rat. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **10**, 487-492 (1986).

Leo M.A., Kim C.L., Lieber C.S. NAD-dependent retinol dehydrogenase in liver microsomes. *Arch. Biochem.* **259**, 241-249 (1987).

Leo M.A., Lida S., Lieber C.S. Retinoic acid metabolism by a system reconstituted with cytochrome P-450. *Arch. Biochem.* **234**, 305-312 (1984).

Introducción

Leo M.A., Lieber C.S. Hepatic vitamin A depletion in alcoholic liver injury. *N. Engl. J. Med.* **307**, 597-601 (1982).

Leo M.A., Lieber C.S. New pathway for retinol metabolism in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **260**, 5228-5231 (1985).

Lieber C.S., Jones D.P., Losowsky M.S. et al. Interrelation of uric acid and ethanol metabolism in man. *J. Clin. Invest.* **41**, 1863-1870 (1962).

Lieber C.S., Spritz N., De Carli L.M. Role of dietary, adipose and endogenously synthesized fatty acids in the pathogenesis of the alcoholic fatty liver. *J. Clin. Invest.* **45**, 51-62 (1966).

Lieber C.S., De Carli L.M. Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptative increase after ethanol feeding. *Sciencesvanas* **162**, 917-918 (1968).

Lieber C.S., De Carli L.M. Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system. In vitro characteristics and adaptative properties in vivo. *J. Biol. Chem.* **245**, 2505-2512 (1970).

Lieber C.S., DeCarli L.M. The role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **181**, 279-287 (1972).

Lieber C.S., Casini A., DeCarli L.M. et al. S-adenosyl-L-methionine attenuates alcohol-induced liver injury in the baboon. *Hepatology* **11**, 165-172 (1990a).

Lieber C.S., De Carli L.M., Mak K.M. et al. Attenuation of alcohol induced hepatic fibrosis by polyunsaturated lecithin. *Hepathology* **12**, 1390-1398 (1990b)

Lieber C.S. Hepatotoxicity of alcohol. Implications for the therapy of alcoholic liver disease. *Drug Invest.* **4** (4), 1-7 (1992).

Lindenbaum J., Lieber C.S. Hematologic effects of alcohol in man in the absence of nutritional deficiency. *N. Engl. J. Med.* **281**, 333 (1969).

Little H.J., Dolin S.J., Halsey M.J. Calcium channel antagonists decrease the ethanol withdrawal syndrome. *Life Sci.* **34**, 2059-2065 (1986).

Loomis C.W., Brien J.F. Determination of carbimide by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **222**, 421 (1981).

Loomis C.W., Brien J.F. Specificity of hepatic aldehyde dehydrogenase inhibition by calcium carbimide (calcium cyanamide) in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **61**, 431-435 (1983a).

Loomis C.W., Brien J.F. Inhibition of hepatic aldehyde dehydrogenase in the rat by calcium carbimide (calcium cyanamide). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **61(9)**, 1025-1034 (1983b).

Marchner H., Tottmar O. A comparative study on the effects of disulfiram, cyanamide and 1-aminocyclopropanol on the acetaldehyde metabolism in rats. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **43**, 219-432 (1978).

Marchner H., Tottmar O. Studies in vitro on the inactivation of mitochondrial rat-liver aldehyde dehydrogenase by the alcohol sensitizing compounds cyanamide, 1-aminocyclopropanol and disulfiram. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 2181-2188 (1983).

Marjanen L. Intracellular localization of aldehyde dehydrogenase in rat liver. *Biochem. J.* **127**, 633-639 (1972).

Matsuzaki S., Gordon E., Lieber C.S. Increased alcohol dehydrogenase independent ethanol oxidation at high ethanol concentrations in isolated rat hepatocytes: The effect of chronic ethanol feeding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **217(1)**, 133-137 (1981).

Mertschenk B., Bornemann W., Filser J.G., Von Meyer L., et al. Urinary excretion of acetylcyanamide in rat and human after oral and dermal application of hydrogen cyanamide (H₂NCN). *Arch. Toxicol.* **65**, 268-272 (1991).

Mezey E., Tobon F. Rates of ethanol clearance and activation of ethanol oxidizing enzymes in chronic alcoholic patients. *Gastroenterology* **61**, 707-715 (1971).

Mezey E., Potter J.J., Maddrey W.C. Collagen turnover in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* **65**, 560 (1973)(Abstract)

Ministerio de Sanidad y Consumo. Estudio de los hábitos de consumo de alcohol de la población adulta española, Encuesta ICSA-Galup-1980, Dirección General de Salud pública. Madrid (1984).

Ministerio de Sanidad y Consumo. Plan Nacional sobre Drogas. Madrid (1985).

Introducción

Misra P.S., Lefevre A., Ishii H., Rubin E., Lieber C.S. Increase of ethanol meprobromate and pentobarbitol metabolism after chronic ethanol administration in man and in rats. *Am. J. Med.* **51**, 346-351 (1971).

Miwa G.T., Levin W., Thomas P.E., Lu A.Y.H. The direct oxidation of ethanol by a catalase and alcohol dehydrogenase free reconstituted system containing cytochrome P-4501. *Arch. Biochem. Biophys.* **187**, 464-475 (1978).

Mizoi Y., Tatsuno Y., Adachi J., Kogame M., Fukunaga T., Fujiwara S., Hishida S., Ijiri I. Alcohol sensitivity related to polymorphism of alcohol-metabolizing enzymes in Japanese. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **18**, 127-133 (1983).

Morgan E.T., Koop D.R., Coon M.J. Catalytic activity of cytochrome P-450 isozyme 3a isolated from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J. Biol. Chem.* **257**, 13951-13957 (1982).

Morgan E.T., Koop D.R., Coon M.J. Comparison of six rabbit liver cytochrome P-450 isozymes in formation of a reactive metabolite of acetaminophen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112** (1), 8-13 (1983).

Morville A.L., Thomas P., Levin W., Reik L., Ryan D.E., Raphael C., Adesnik M. The accumulation of distinct mRNAs for the immunochemically related cytochromes P-450c and P-450d in rat liver following 3-methylcholanthrene treatment. *J. Biol. Chem.* **258**, 3901-3906 (1983).

Muñoz J., Birules M., Llauger M.A., Gardello A., Sola M., Foz G. Utilización del cuestionario MALT en la detección del alcoholismo. *Aten. Primaria* **6** (8), 609 (1989).

Nagasawa H.T., Kwon C.H., DeMaster E.G., Shirota F.N. Prodrugs of cyanamide as (long-acting) alcohol deterrent agents. *Biochem. Pharmacol.* **35** (2), 129-132 (1986).

Naranjo C.A., Bremmer E. Recent trends in the pharmacotherapy of drug dependence. *Drugs of today* **27** (8), 479-495 (1991).

Naranjo C.A., Cappell H., Sellers E.M. Pharmacological control of alcohol consumption: Tactics for the identification and testing of new drugs. *Addict. Behav.* **6**, 261-269 (1981).

Naranjo C.A., Kadlec K.E., Sanhueza P., Woodley-Remus D.V., Sellers E.M. Fluoxetine differentially alters alcohol intake and other consummatory behaviours in problem drinkers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **47**, 490-498 (1990).

Naranjo C.A., Sellers E.M., Roach C.A., Woodley D.V., Sanchez-Craig M., Sykora K. Zimelidine induced variations in alcohol intake by non-depressed heavy drinkers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **36**, 374-381 (1984).

Naranjo C.A., Sellers E. M., Sullivan J.T., Woodley D.V., Kadlec K., Sykora K. The serotonin uptake inhibitor citalopram attenuates ethanol intake. *Clin. Pharmacol. Ther.* **41**, 266-274 (1987).

Naranjo C.A., Sullivan J.T., Kadlec K.E., Woodley-Remus D.V., Kennedy G., Sellers E.M. Differential effects of viqualine on alcohol intake and other consummatory behaviors. *Clin. Pharmacol. Ther.* **46**,301-309 (1989).

Nebert D.W., Adesnik M., Coon M.J. et al. The P-450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* **6**(1), 1-11 (1987).

Obach R., Domenech J., Moreno J., Pla-Delfina J.M. Estudio preliminar de la farmacocinética de la cianamida en la rata. *Actas del 1^{er} Congreso Hispano-Francés de Biofarmacia y Farmacocinética*. Barcelona **3**, 415-434 (1979).

Obach R., Moreno J., Domenech J., Plá-Delfina J.M. Etude pharmacocinetique de la cyanamide chez le lapin. *Actas del 1^{er} Congreso Europeo de Biofarmacia y Farmacocinética*. Clermont Ferrand **2**, 367-375 (1981).

Obach R., Vallés J., Domenech J. Estudio cinético preliminar de la cianamida en la rata. *Annals de Medicina* **66**(1), 45-57 (1980).

Obach R., Vallés J., Pruñonosa J., Arso J., Vallés J.M. Papel de los hematíes en la farmacocinética de la cianamida. Drogodependencias, un reto multidisciplinar. *Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco*. Vitoria **1**, 29-35 (1984).

Ohnishi K., Lieber C.S. Reconstitution of the microsomal ethanol oxidizing system. Qualitative and quantitative changes of cytochrome P-450 after chronic ethanol consumption. *J. Biol. Chem.* **252** (20), 7124-7131 (1977).

O.M.S. Clasificación internacional de enfermedades. 9^a Revisión. Pub. Científica 353. Edit. O.M.S. Washington.

Introducción

Orme-Johnson W.H., Ziegler D.M. Alcohol mixed function. Oxidase activity of mammalian liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**,78-82 (1965).

Orrego H., Blake J.E., Blendis L.M., Compton K.V., Israel Y. Long term propylthiouracil treatment reduces mortality in alcoholic liver disease. *N. Engl. J. Med.* **317**, 1421-1427 (1987).

Orrego H., Kalant H., Israel Y. et al. Effect of short-term therapy with propylthiouracil treatment reduces mortality in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* **76**, 105-115 (1979).

Oshino N., Chance B., Seiss H., Bucher T. The role of H₂O₂ generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen. *Arch. Biochem. Biophys.* **154**, 1117-1131 (1973).

Oshino R.G., Jamieson D., Chance B. The properties of hydrogen peroxide production under hyperoxic and hypoxic induction of perfused rat liver. *Biochem. J.* **146**, 53-65 (1975).

Pares X., Vallee B.L. New human liver alcohol dehydrogenase forms with unique kinetic characteristics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**, 122-130 (1981).

Pietruszko R. Aldehyde dehydrogenase isozymes. In: Rattazzi M.C., Scandolios J.G., Whitt G.S., eds. *Isozymes: current topics in biological and medical research. Cellular localization, metabolism, and physiology*, Vol. 8. New York, Alan R. Liss, Inc., 195-217 (1985).

Pruñonosa J., Obach R., Vallés J.M. Determination of cyanamide in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatograph.* **377**, 253-260 (1986).

Pruñonosa J., Sagristá M.L., Bozal J. Inactivation of low-K_m rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by cyanamide in vitro. A catalase-mediated reaction. *Biochem. Pharmacol.* **38** (13), 2099-2105 (1989).

Pruñonosa J., Sagristá M.L., Bozal J. Inactivation mechanism of low-K_m rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by cyanamide in vitro. *Drug Metab. Dispos.* **19** (4), 787-792 (1991).

Pyörala E. Trends in alcohol consumption in Spain, Portugal, France and Italy from the 1950s until the 1980s. *Br. J. Addict.* **85**, 469-477 (1990).

Queipo D. Alvarez F.J., Velasco A. Alcohol consumption among university students in Spain. *Drug Alcohol Depend.* **18**, 41-49 (1986).

Rangno R.E., Kreeft J.H., Sitar D.S. Ethanol "dose-dependent" elimination: Michaelis-Menten v classical analysis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **12**, 667-673 (1981).

Rodríguez M.E., Cami J. Alcoholism among inpatients in a General Hospital in Barcelona, Spain. *Int. J. Addict.* **23**, 29-49 (1988).

Rodríguez-Martos A., Suárez R.M., Vecino C. y col. MALT (Munchner alkoholismus test) para el diagnóstico del alcoholismo: adaptación y validación en España. *Sociodrogalcohol, IX Jornadas Nacionales*. Vigo (1981).

Roine R., Gentry R.T., Hernández-Muñoz R. et al. Aspirin increases blood alcohol concentrations in humans after ingestion of ethanol. *JAMA* **264**, 2406-2408 (1990).

Ryan D.E., Ramathan L., Iida S., Thomas P.E., Haniu M., Shively J.E., Lieber C.S., Levin W. Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 induced by isoniazid. *J. Biol. Chem.* **260** (10), 6385-6393 (1985).

Ryan D.E., Koop D.R., Thomas P.E., Coon M.J., Levin W. Evidence that isoniazid and ethanol induce the same microsomal cytochrome P-450 in rat liver, an isozyme homologous to rabbit liver cytochrome P-450 isozyme 3a. *Arch. Biochem. Biophys.* **246** (2), 633-644 (1986).

Salaspuro M.P., Lieber C.S. Non-uniformity of blood ethanol elimination: Its exaggeration after chronic ethanol consumption. *Ann. Clin. Res.* **10**, 294-297 (1978).

Schreiber S.S., Briden K., Oratz M., Rothschild M.A. Ethanol acetaldehyde and myocardial protein synthesis. *J. Clin. Invest.* **51**, 2820-2826 (1972).

Shimada J., Miyahara T., Otsubo S., Yoshimatsu N., Oguma T., Matsubara T. Effects of alcohol-metabolizing enzyme inhibitors and betalactam antibiotics on ethanol elimination in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **45**, 533-544 (1987).

Introducción

Shirota F.N., DeMaster E., Nagasawa H.T. Studies on the cyanamide-ethanol interaction. Dimethylcyanamide as an inhibitor of aldehyde dehydrogenase in vivo. *Biochem. Pharmacol.* **31** (11), 1999-2004 (1982).

Shirota F.N., Nagasawa H.T., Kwon C.H., DeMaster E.G. N-acetylcyanamide, the major urinary metabolite of cyanamide in rat, rabbit, dog and man. *Drug Metab. Dispos.* **12** (3), 337-344 (1984).

Shirota F.N., DeMaster E., Nagasawa H.T. Cyanide is a product of the catalase-mediated oxidation of the alcohol deterrent agent, cyanamide. *Toxicol. Lett.* **37**, 7-12 (1987a).

Shirota F.N., DeMaster E., Kwon C.H., Nagasawa H.T. Metabolism of cyanamide to cyanide and an inhibitor of aldehyde dehydrogenase (ALDH) by rat liver microsomes. *Alcohol Alcohol suppl.* **1**, 219-223 (1987b).

Skinner H.A., Holt S., Sheu W.J. Clinical versus laboratory detection of alcohol abuse: the alcohol clinical index. *Br. Med. J.* **292**, 1703-1708 (1986).

Song B.J., Gelboin H.V., Park S.S., Yang C.S., Gonzales F.J. Complementary DNA protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the rat enzyme. *J. Biol. Chem.* **261**, 16689-16697 (1986).

Sugata K., Takada A., Takase S., Tsutsumi M. Determination of aldehyde dehydrogenase isozyme activity in human liver. *Alcohol* **5**, 39-43 (1988).

Sullivan J.T., Sykora K., Schneiderman J., Naranjo C.A., Sellers E.M. Assessment of alcohol withdrawal: the revised clinical institute withdrawal assessment for alcohol scale (CIWA)-Ar. *Br. J. Addict.* **84**, 1353-1357 (1989).

Suzdak P.D., Glowa J.R., Crawley J.N., Schwartz R.D. et al. A selective imidabenzodiazepine antagonist of ethanol in the rat. *Science* **234**, 1243-1247 (1986).

Svanas G.W., Weiner H. Enzymatic requirement for cyanamide inactivation of rat liver aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 1197-1204 (1985).

Tagaki T., Alderman J., Lieber C.S. In vivo roles of alcohol dehydrogenase (ADH), catalase and the microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) in deermice. *Alcohol* **2** (1), 9-12 (1985).

Takahashi K., Weiner H. Nicotinamide adenine dinucleotide activation of the esterase reaction of horse liver aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **20**, 2720-2726 (1981a).

Takahashi K., Weiner H., Filmer D.L. Effects of pH on horse liver aldehyde dehydrogenase alterations in metal ion activation number of functioning active sites and hydrolysis of the acyl intermediate. *Biochemistry* **20**, 6225-6230 (1981b).

Teschke R. Microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): purification and properties of a rat liver system free of catalase and alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 1187-1193 (1972).

Teschke R., Hasumura Y., Lieber C.S. Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: solubilization, isolation and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **163** (1), 404-415 (1974a).

Teschke R., Hasumura Y., Lieber C.S. NADPH dependent oxidation of methanol, ethanol, propanol and butanol by hepatic microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60** (2), 851-857 (1974b).

Teschke R., Hasumura Y., Lieber C.S. Hepatic microsomal oxidizing system. Affinity for methanol, ethanol, propanol and butanol. *J. Biol. Chem.* **250** (18), 7397-7404 (1975).

Thurman R.G., Ley H.G., Scholz R. Hepatic microsomal ethanol oxidation hydrogen peroxide formation and the role of catalase. *Eur. J. Biochem.* **25**, 420-430 (1972).

Thurman R.G., McKenna W.R., Brentzei H.K., Hesse S. Significant pathways of ethanol metabolism. *Fed. Proc.* **34**, 2075-2081 (1976a).

Thurman R.G., McKenna W.R., McCaffrey T.B. Pathway responsible for the adaptative increase in ethanol utilization following chronic treatment with ethanol. Inhibition studies with hemoglobin free perfused rat liver. *Mol. Pharmacol.* **12**, 165-166 (1976b).

Thurman R.G., Brentzel H.J. The role of alcohol dehydrogenase in microsomal ethanol oxidation and the adaptative increase in ethanol metabolism due to chronic treatment with ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **1**, 33-38 (1977).

Introducción

Towell J.F., Roerig D.L., Kotrly K.J., Wang R.I.H. Erythrocyte aldehyde dehydrogenase, antianginal drugs, and "disulfiram-like" responses to ethanol. *Abstract. Alcohol. Clin. Exp. Res.* **8**, 124 (1984).

Towell J.F., Townsend W.F., Kalbfleisch J.H., Wang R.I.H. Erythrocyte aldehyde dehydrogenase and clinical chemical markers of alcohol abuse and alcoholism. *Alcohol Drug Res.* **6**, 15-21 (1985a).

Towell J.F., Wang R.I.H. Erythrocyte aldehyde dehydrogenase, and "disulfiram-like" side effects of hypoglycemics and antianginals. *Abstract. Alcohol. Clin. Exp. Res.* **9** (5), 438-442 (1985b).

Tsutsumi R., Leo M.A., Kim C. et al. Interaction of ethanol with enflurane metabolism and toxicity role of P-450IIE1. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **14**, 174-179 (1990).

Tu G.C., Weiner H. Evidence for two distinct active sites on aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **263**, 1218-1222 (1988).

Valkonen K.H., Goldman D. Purification and characterization of three forms of class III alcohol dehydrogenase. *Electrophoresis* **9**, 132-135 (1988).

Vázquez J.J., Guillén F.J., Zozaya J., Lahoz M. Cyanamide-induced liver injury. A predictable lesion. *Liver* **3**, 225-230 (1983).

Videla L., Israel Y. Factors that modify the metabolism of ethanol in rat liver and adaptative changes produced by its chronic administration. *Biochem. J.* **118**, 275-281 (1970).

Videla L., Bernstein J., Israel Y. Metabolic alterations produced in the liver by chronic ethanol administration. Increased oxidative capacity. *Biochem. J.* **134**, 507-514 (1973).

Wagner J.G., Wilkinson P.K., Sedman A.J., Kay D.R., Eidler D.J. Elimination of alcohol from human blood. *J. Pharm. Sci.* **65**, 152-154 (1976).

Wagner F.W., Pares X., Holmquist B., Vallee B.L. Physical and enzymatic properties of a class III isozyme of human liver alcohol dehydrogenase: chi-ADH. *Biochemistry* **23**, 2193-2199 (1984).

Wendell G.D., Thurman R.G. Effect of ethanol concentration on rates of ethanol elimination in normal and alcohol-treated rats in vivo. *Biochem. Pharmacol.* **28**, 273-279 (1979).

Whitehead T.P., Clarke C.A., Whitfield A.G.W. Biochemical and haematological markers of alcohol intake. *Lancet* **May 6**, 978-981 (1978).

Widmark E.M.P. Verteilung und undwandlung des ethyl alkohols in organismus des hundes. *Biochem. Z.* **267**,128-134 (1933).

Williamson J.R., Scholz R., Browning E.T., Thurman R.G., Fukami M.H. Metabolic effects of ethanol in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **244** (18), 5044-5054 (1969).

Wilkinson P.K. Pharmacokinetics of ethanol: A review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **4**, 6-21 (1980).

Wright S.G., Ree G.H. Hazards with monoamine oxidase inhibitors: A persistent problem. *Lancet* **1** (8058), 284-285 (1978).

Wrighton S.A., Thomas P.E., Molowa D.T., Haniu M., Shively J.E., Maines S.L., Watkins P.B., Parker G., Mendez-Picon G., Levin W., Guzelian P.S. Characterization of ethanol inducible human liver N-nitrosodimethylamine demethylase. *Biochemistry* **25** (22), 6731-6735 (1986).

Wu A., Chanarin I., Levi A.J. Macrocytosis of chronic alcoholism. *Lancet* **1** (862), 829-831 (1974).

Yamaoka K., Tanigawara T., Nakagawa T., Uno T. Capacity-limited elimination of cefmetazole in rat. *Int. J. Pharmacol.* **10**, 291-300 (1982).

Yamaoka K., Nakagawa T., Uno T. A non-linear least squares program based on differential equations, MULTI (RUNGE), for microcomputers. *J. Pharm. Dyn.* **6**, 595-606 (1983).

Yamaoka K., Nakagawa T., Uno T. Statistical moments in pharmacokinetics. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **6**, 547-558 (1978).

Yang C.S., Tu Y.Y., Koop D.R., Coon M.J. Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P-450 isozymes. *Cancer Res.* **45**, 1140-1145 (1985).

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El hecho de no disponer, hasta hace relativamente poco tiempo, de una técnica analítica suficientemente sensible y específica, había obligado a estudiar el comportamiento farmacocinético de la cianamida tras la administración de dosis superiores a las que normalmente se utilizan en terapéutica. Por dicho motivo, no se conocían todavía las características farmacocinéticas de este fármaco a las dosis terapéuticas usadas en clínica.

Pero, disponiendo de datos farmacocinéticos previos y de un método analítico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), sensible y específico para la cianamida (Pruñonosa y col., 1986), nuestro interés se centró en su aplicación a la detección de los niveles plasmáticos del fármaco, utilizando la rata y el perro como animales de experimentación, tras su administración a las dosis normales en clínica, para luego poder llevar a cabo estudios en voluntarios sanos. La determinación de los distintos parámetros farmacocinéticos de la cianamida en estas dos especies permitió abordar con mayor seguridad los posteriores estudios en el hombre, con la finalidad de establecer regímenes de dosificación más adecuados y evitar al máximo sus efectos tóxicos en el tratamiento aversivo del alcoholismo crónico.

El plan de trabajo a seguir fue el que se resume a continuación:

1. Puesta a punto de las técnicas analíticas utilizadas, comprobando la linealidad, exactitud y precisión, límite de cuantificación, sensibilidad, límite de detección y porcentaje de recuperación del método, en nuestras condiciones experimentales, para cada una de las tres especies estudiadas: rata, perro y hombre.
2. Estudio farmacocinético de la cianamida en la rata tras sus administración intravenosa y oral a la dosis de 2 mg/kg, abordándose

Objetivos

de acuerdo con un tratamiento de los datos experimentales no compartimental y también mediante uno compartimental.

3. Estudio farmacocinético de la cianamida en el perro tras su administración en forma de:

a) Bolus intravenoso, a las dosis de 1, 2 y 4 mg/kg

b) Solución oral a la dosis de 4 mg/kg

en ambos casos mediante:

- Tratamiento no compartimental de los datos experimentales.
- Ajustado de los modelos farmacocinéticos a los datos experimentales y elección del modelo estadísticamente más probable.
- Estudio de la linealidad cinética para el ámbito de dosis ensayadas.

Y específicamente, tras la administración oral:

- Estimación de la biodisponibilidad en magnitud y velocidad.

4. Estudio farmacocinético de la cianamida en voluntarios sanos tras su administración en forma de:

a) Infusión intravenosa a las dosis de 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 0.6 y 1.0 mg/kg, mediante:

- Tratamiento no compartimental de los datos experimentales.
 - Ajustado de los modelos farmacocinéticos a los datos experimentales y elección del modelo más probable.
 - Estudio de la linealidad cinética en el ámbito de dosis ensayadas.
- b) Solución oral a las dosis de 0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg, mediante:
- Tratamiento no compartimental de los datos experimentales.
 - Determinación del grado de absorción mediante el método de Loo-Riegelmann.
 - Ajustado de modelos farmacocinéticos, que intenten explicar la desaparición del fármaco del lugar de absorción, a los datos experimentales y elección del modelo más probable, así como determinación de los parámetros asociados a dicho modelo.
 - Estimación de la biodisponibilidad en magnitud y velocidad.
5. Estudio de la actividad de la ALDH en sangre de voluntarios sanos tras la dosis orales de 0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg de cianamida.
6. Intento de establecer correlaciones entre los niveles plasmáticos de cianamida y actividad de la ALDH en sangre, tras la dosis oral de 1 mg/kg, haciendo uso de modelos cinético-dinámicos.
7. Discusión de los resultados y conclusiones.

MATERIAL Y METODOS

III. MATERIAL Y METODOS

3.1. MEDICAMENTO SELECCIONADO

El fármaco utilizado ha sido la cianamida, un inhibidor de la aldehído-deshidrogenasa, empleado como coadyuvante en el tratamiento aversivo del alcoholismo crónico y cuyas propiedades se exponen a continuación.

3.1.1. Estructura y propiedades físico-químicas

La cianamida, también conocida químicamente como carbimida, carbo-diimida, cianogenamida o amidocianógeno, es una sustancia sólida y delicuescente que se presenta en forma de cristales ortorrómbicos y alargados de color blanco.

Posee un peso molecular de 42.04 y una densidad de 1282 kg/m³ siendo su fórmula empírica CH₂N₂.

La estructura molecular de dicho compuesto, que pertenece al grupo de simetría C_s, ha podido ser elucidada mediante espectroscopía Infrarroja y Raman. Estas técnicas demuestran que la estructura del grupo N-C≡N es lineal, hallándose fuera del plano del grupo NH₂.

En la Figura 3.1 se detallan los principales parámetros estructurales de la cianamida, indicándose las distancias y los ángulos de enlace correspondientes.

Su espectro de absorción UV, presenta un pico de absorbancia débil por debajo de 230 nm, mientras que la aparición del máximo depende del pH de sus soluciones acuosas, o bien del disolvente utilizado.

Material y Métodos

Su hidrosolubilidad a temperatura ambiente es elevada, aunque dicha propiedad experimenta una considerable variación frente a la temperatura, tal como se muestra en la Figura 3.2.

Por otra parte, también es muy soluble en éteres, alcoholes, fenoles, aminas y ésteres; es ligeramente soluble en benceno, sulfuro de carbono e hidrocarburos halogenados de cadena corta y prácticamente insoluble en n-hexano y ciclohexano.

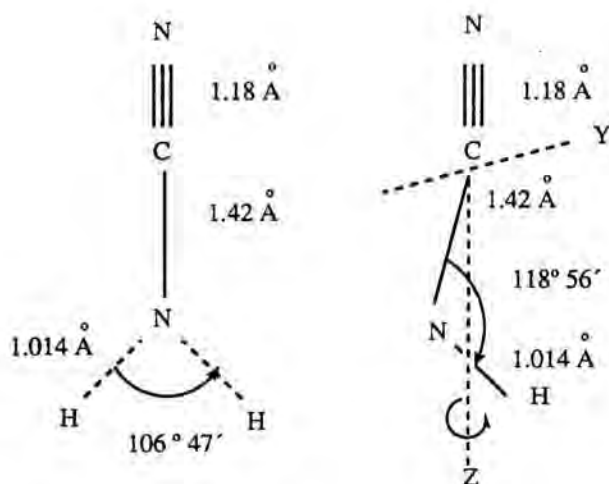


Figura 3.1. Principales parámetros estructurales de la cianamida.

Su punto de fusión oscila entre 45 y 46 °C y posee un índice de refracción de 1.4418 (a 48 °C).

Para su correcta conservación debe mantenerse en recipientes de cierre hermético, en lugar fresco y preservada de la luz y la humedad.

Es muy irritante y caústica y ataca a varios metales, entre ellos, al hierro, cobre, plomo y también al acero inoxidable; no afecta al vidrio, ni utensilios de hierro esmaltado.

En soluciones acuosas, la cianamida es relativamente estable a valores de pH comprendidos entre 4 y 6; sin embargo, se polimeriza, dando dicianidamida, en soluciones alcalinas, mientras que a valores de pH inferiores a 2 se transforma en urea.

La cianamida utilizada ha sido suministrada por la firma Fluka y corresponde al lote 1-8777.

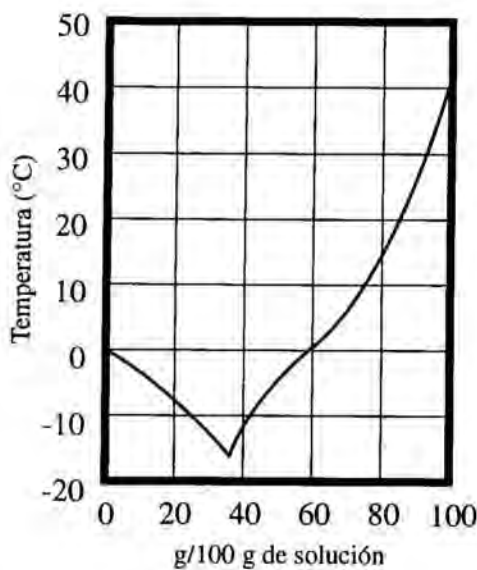


Figura 3.2. Solubilidad de la cianamida en agua en función de la temperatura.

3.2. ESTUDIOS FARMACOCINETICOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION

En las experiencias realizadas, se han utilizado dos especies animales, preliminarmente una especie roedora, la rata albina de la raza Sprague-Dawley y luego una especie no roedora, el perro Beagle.

3.2.1. Estudio en la rata

En los estudios efectuados en la rata, se han utilizado ratas macho Sprague Dawley suministradas por Charles River (Francia), de pesos

Material y Métodos

comprendidos entre 200 y 220 g, mantenidas en condiciones controladas de humedad relativa ($50 \pm 10 \%$) y temperatura ($21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) y sometidas a un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas.

Dos grupos de 48 animales cada uno correspondientes a la administración intravenosa y oral respectivamente, se alojaron en sendas jaulas disponiendo de alimento estandarizado, (UAR A04, PANLAB SL España) y agua "ad libitum". Durante el proceso se controló la ausencia de contaminación en la dieta por cianamida.

Los animales se mantuvieron en ayunas desde las 18 horas previas a la administración del fármaco, hasta la extracción de la última muestra. Durante este período de tiempo se les suministró agua "ad libitum".

Dado que en la rata no pueden seguirse cinéticas individuales completas, puesto que por necesidades analíticas se precisan 2 ml de sangre por muestra, el comportamiento farmacocinético de la cianamida en dicha especie se determina mediante las curvas de niveles plasmáticos medios de 4 animales por tiempo experimental.

Además del estudio farmacocinético, se ha utilizado también dicha especie animal, para la extracción de hígados, empleados a su vez en la obtención de 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAC), necesario para la determinación de la actividad de la aldehídoeshidrogenasa en sangre humana, tal y como se describe en el apartado 3.5.2.2 (g).

3.2.2. Estudio en el perro

La elección del perro como animal de experimentación presenta frente a la rata la ventaja de poder estimar cinéticas individuales completas y disponer así de una información adicional acerca del comportamiento farmacocinético de la cianamida respecto a la variabilidad interanimal, a

pesar de que esta parece ser mayor en el perro que en los roedores (Tse y Jaffe, 1991). Por otra parte, permite que el mismo animal pueda someterse al tratamiento por ambas vías de administración, siendo ello importante para estudios posteriores de biodisponibilidad del fármaco. Es conocido además que el perro es la especie animal más sensible a los efectos tóxicos de la cianamida (Shirota y col., 1984).

Se han empleado 5 animales por dosis, tanto en la administración intravenosa como en la oral, dejando transcurrir un tiempo prudencial de una semana entre ambos tratamientos, período superior a 10 veces la semivida biológica del principio activo en esta especie animal.

3.3. ESTUDIOS FARMACOCINETICOS Y FARMACODINAMICOS EN EL HOMBRE

El estudio farmacocinético de la cianamida se ha completado en el hombre con la participación de voluntarios sanos. También en voluntarios sanos, se ha llevado a cabo el estudio de la actividad de la aldehídoeshidrogenasa eritrocitaria basal y tras la administración de cianamida.

Se han seleccionado para este estudio 14 voluntarios varones sanos cumpliendo los siguientes requisitos:

Criterios de inclusión

1. Edad entre 20 y 35 años.
2. Peso corporal promedio de 77.5 kg (pesos comprendidos entre 70 y 89 kg).
3. Anamnesis y exploración física de los distintos aparatos anatomofisiológicos, dentro de la normalidad.

Material y Métodos

4. Registro electrocardiográfico de 12 derivaciones dentro de la normalidad.
5. Tensión arterial no superior a 140/90 mm Hg, tomada en condiciones basales y de reposo físico de 15 minutos y en tendido supino.
6. Exploración analítica (hematológica y bioquímica) dentro de la normalidad, de acuerdo con las tablas de valores normales de referencia del Laboratorio de Bioquímica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
7. Voluntarios no bebedores de alcohol y no fumadores.

Criterios de exclusión

1. Historia de drogodependencia.
2. Bebedores importantes de bebidas estimulantes (más de 5 tazas de té, café, cola...).
3. Antecedentes de alergia, hipersensibilidad o historia de reacción adversa grave a fármacos.
4. Presentar historia o evidencia clínica de patología cardiovascular respiratoria, renal, hepática, gastrointestinal, hematológica, neurológica u otras enfermedades crónicas. Haber sido intervenido quirúrgicamente durante los seis meses anteriores.
5. Donación de sangre en el último mes antes del inicio del estudio.
6. Participación en otro ensayo clínico, al menos desde las cuatro semanas precedentes al inicio del estudio.

Previamente al inicio del ensayo, un médico investigador de la Unidad de Farmacología Clínica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, informó a los voluntarios de la naturaleza, propósito y riesgos del mismo. Todos los voluntarios dieron su consentimiento por escrito. El protocolo fue aprobado por el Comité Ético del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona y el estudio se llevó a cabo de acuerdo con las normas

propuestas por la actual legislación española en materia de investigación y de ensayos clínicos en humanos (B.O.E., Agosto 1982) y con lo establecido en la Declaración de Helsinki (Recommendations Guiding Medical Doctors in Biomedical Research Involving Human Subjects) y revisado en las Asambleas 18ª, 29ª y 35ª (Hong Kong 1989) de la Asamblea Médica Mundial.

3.4. TECNICAS BIOLOGICAS

3.4.1. MATERIALES

3.4.1.1. Material

- Tablero de operaciones.
- Pinzas grandes y pequeñas en diente de ratón y también de punta lisa.
- Tijeras grandes y pequeñas.
- Bisturí para diseccionar.
- Campana para la anestesia de los animales (ratas).
- Cepos para la colocación y sujeción de la rata, con objeto de poder administrar el fármaco al animal no anestesiado, a través de la vena caudal del mismo.
- Sonda metálica acoplada a jeringa desechable de 5 ml de capacidad (Ico-Steril) para la administración oral a la rata.
- Jeringa hipodérmica de 10 ml de capacidad con aguja 0.7 x 30 mm cono record (Ico-medical), para la administración del fármaco vía intravenosa, al perro.
- Jeringuillas de insulina (Ico-steril) para la administración intravenosa a la rata (en este caso provista de aguja de 0.5 x 16 mm) y para la administración oral en perro.
- Jeringas desechables de 5, 10 y 20 ml de capacidad con aguja 0.8 x 40 mm cono luer (Ico-steril) para la toma de muestras en rata y perro.

Material y Métodos

- Algodón hidrófilo enrollado.
- Bolas de vidrio Trennmittel Merck (Art.10 103), para la centrifugación de las muestras de sangre.
- Cronómetro digital comprobado para el control del tiempo durante la toma de muestras (Smiths).
- Tubos de centrífuga de 10 ml de capacidad (VITROLAB).
- Tubos de 10 ml de capacidad pyrex (VIDRAFOC Ref. 813/2) provistos de tapón de rosca y septum de teflón, para la extracción de las muestras con acetato de etilo.
- Tubos de fondo cónico de 5 ml de capacidad (AFORA V-39955) provistos de tapón de rosca y septum de teflón, para la evaporación de las muestras y reacción de dansilación.
- Viales para WISP de 4 ml de capacidad (Waters, Ref. 72710), provistos de tapón de rosca y septum de teflón.
- Viales de 300 μ l de capacidad (Waters, Ref. 72704).
- Muelles para sostener los viales de 300 μ l de capacidad en el interior de los tubos de 4 ml de capacidad, hecho que permite la inyección de volúmenes de 50 a 10 μ l en el análisis cromatográfico de las muestras.
- Holders de teflón para AUTOSAMPLER, (SUPELCO, Ref. SV-S1) para sostener viales de 300 μ l de capacidad.
- Viales de 300 μ l de capacidad, provistos de cápsula de aluminio y septum de teflón (SUPELCO, Ref. X-8ACT).
- Capsuladora para sellar viales de 8 mm de diámetro (SUPELCO Ref. 3-3180).
- Matraces aforados de 10, 50, 100, 500 y 1000 ml, para la preparación de las distintas soluciones utilizadas.
- Tubos de ensayo de 25 ml para la preparación de las soluciones patrón.
- Probetas de 100, 500 y 1000 ml de capacidad.
- Pipeta automática de 1-5 ml de capacidad (Finpipette, JOVALSA).
- Micropipeta automática de 25-100 μ l de capacidad (JUSTOR).

- Micropipeta automática de 200-1000 μ l de capacidad (JUSTOR).
- Puntas desechables de pipeta y micropipetas automáticas.
- Filtros Millipore FH de 0.50 μ m de tamaño de poro y 47 mm de diámetro.
- Filtros Millipore MF de 0.45 μ m de tamaño de poro y 47 mm de diámetro.
- Hielo sintético para la conservación de las muestras de plasma y sangre y también los hígados de rata, a -78 °C.

Adicionalmente, para los ensayos efectuados en humanos se han utilizado:

- Pipetas de vidrio de 20 ml de capacidad.
- Filtros estériles no pirogénicos de 25 mm de diámetro y 0.22 μ m de tamaño de poro (Millex-GS, Millipore Iberica Ref. SLGS 025 BS).
- Filtros estériles no pirogénicos de 25 mm de diámetro y 0.45 μ m de tamaño de poro (Millex-HA, Millipore Iberica Ref. SLHA 025 BS).
- Viales monodosis de 100 y 20 ml de capacidad.
- Solución alcohólica de povidona iodada (Braunoderm, Art. 964.304 Braun).
- Cánula de permanencia temporal en la vena, Vasocan (1.0 mm/20G x 33 mm) (Art. 425810, BRAUN).
- Mandril Vasocan (1.0 G-20) adaptable a la cánula (Art. 045075, BRAUN).
- Tubo de silicona adaptable a la salida de la bomba de infusión con palomita para insertar en una vena (Vacutainer 21G 3/4 19 mm 8/10) (Ref. 607261).
- Jeringas desechables de 50 ml de capacidad para la infusión endovenosa del fármaco (Ico-Steril).
- Jeringas desechables de 20 y 10 ml de capacidad cono luer (Ico-Steril) para la toma de muestras blanco y después de la

Material y Métodos

administración del fármaco, respectivamente, por acoplación directa al sistema Vasocan.

- Tubos desechables de plástico de 10, 5 y 3 ml de capacidad provistos de tapón.
- Solución comercial estéril isotónica de cloruro sódico al 0.9 %, para la preparación de la solución endovenosa de cianamida a administrar a voluntarios sanos (BRAUN).

3.4.1.2. Aparatos auxiliares

Se han utilizado como aparatos auxiliares:

- Básculas de capacidad suficiente para pesar los animales, ya se trate de rata o perro, y con ello conocer el volumen de solución de fármaco a administrar.
- Máquina rasuradora Oster Modelo A-500 para visualizar las venas cefálicas de las extremidades del perro.
- Centrífuga HERAEUS LABOFUGE 6000 para la separación del plasma de las muestras de sangre extraídas.
- Centrífuga SORVALL RC-5B con rotor SA-600 ($R_{max} = 12.96$, $R_{av} = 9.24$ y $R_{min} = 5.52$ cm) y refrigerada (DUPONT Instruments), para la obtención de los extractos de membrana mitocondrial hepática.
- Balanza de precisión monoplato METTLER Modelo H-54.
- Baño de ultrasonidos SELECTA, para la desgasificación de disolventes y disolución del residuo de los extractos plasmáticos.
- Potter homogeneizador, Potter-Elvehjem (B. Braun Melsungen) para la homogeneización de hígados.
- Agitator HEIDOLPH.
- Agitador HERON para la extracción de fármaco del plasma.

- Placa de evaporación con termostato, provista de un dispositivo de aplicación de corriente de gas inerte de forma individual para cada muestra, para la evaporación a sequedad de los extractos plasmáticos.
- pHmetro RADIOMETER M-27 para determinar y controlar el pH de las soluciones tampón requeridas.
- Equipo Milli-Q para la obtención de agua bidestilada y purificada
- Bomba de infusión LABOTRON L-007, para infusión endovenosa de cianamida en voluntarios sanos, que permite la preselección mediante mando digital, de velocidades comprendidas entre 0.01 ml/h y 199.8 ml/h, estando provista de un conmutador-amplificador de escala, que permite dosificar con gran precisión y de jeringa desechable de 50 ml de capacidad.

- Equipo de Cromatografía líquida de alta resolución de la firma WATERS ASSOC. (Mildford, MA, U.S.A.) provisto de los siguientes elementos:
 - Dos bombas Modelo M-510 y M-45.
 - Un inyector automático WISP 710B.
 - Un sistema controlador compuesto por un ordenador Digital Profesional 380 y un System Interface Module.
 - Un Detector fluorimétrico Modelo M-420 AC provisto de una lámpara tipo F4T5/BL, un filtro de longitud de onda de emisión (bandpass) de 360 nm, y un filtro de longitud de onda de excitación (longpass) de 495 nm.

Dicho equipo cromatográfico se ha utilizado para la determinación de cianamida en plasma de rata y de perro.

- Equipo de Cromatografía líquida de alta resolución de la firma KONTRON INSTRUMENTS provisto de los siguientes elementos:

Material y Métodos

- Dos bombas Modelo 420.
- Un inyector automático AUTOSAMPLER Modelo 460.
- Un sistema controlador compuesto por un ordenador Digital Profesional Data System 450.
- Un Detector fluorimétrico Modelo SFM 25 de longitud de onda variable.

Este sistema se ha utilizado para la valoración de cianamida en plasma humano, así como para la determinación de la actividad de la aldehíodeshidrogenasa en hematíes, también de voluntarios sanos. En este último caso se ha acoplado al equipo un detector electroquímico de la firma WATERS ASSOC. Modelo 460.

- El tipo de columnas utilizado indistintamente en ambos equipos ha sido:
 - Columna μ Bondapak C₁₈ Radial-Pak (10 x 0.8 cm I.D., diámetro de partícula 10 μ m) (Ref. 85721), con módulo de compresión radial y precolumna Guard-Pak (Ref. 858-24) con módulo Guard Pak (Ref. 80040), para la valoración del fármaco en plasma.
 - Columna μ Bondapak C₁₈ de acero inoxidable (300 x 3.9 mm I.D., diámetro de partícula 10 μ m) (Ref. P/N 27324) y precolumna μ Bondapak C₁₈ corasil (30 x 3.9 mm I.D., diámetro de partícula 37-50 μ m), para la determinación de la actividad de la aldehíodeshidrogenasa en hematíes.

3.4.1.3. Reactivos

- Carbonato sódico (Art. 6392 Merck)
- Bicarbonato sódico (Art. 6392 Merck)

- Fosfato bipotásico (Art. 5101 Merck)
- Fosfato monopotásico (Art. 4871 Merck)
- Pirofosfato sódico.10 H₂O (Art. 6591 Merck)
- Citrato sódico dibásico 1.5-hidrato para análisis (Art. 131654 PANREAC)
- Citrato trisódico.2 H₂O (Art. 6448 Merck)
- Heparina sódica (5000 u.i./ml ó 50 mg/ml) (Ref. 768218, ROVI S.A.)
- NAD⁺ (Art. 24542 Merck)
- DOPAC (3,4-dihidroxifenilacético) (No. D-9128 SIGMA)
- Dopamina (3-hidroxitiramina) (No. H-8502 SIGMA)
- Sacarosa (Art. 7651 Merck)
- Acido perclórico al 60 % (p/v) (Art. 131054 PANREAC)
- Disulfito sódico (Art. 131698 PANREAC)
- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Art.131026 PANREAC)
- Octilhidrógenosulfato sódico (Art. 12268 Merck)
- Acido sulfúrico del 96 % para análisis (Art. 131058 PANREAC)
- Acido clorhídrico del 35 % para análisis (Art. 131090 PANREAC)
- Acetato de etilo (Art. 868 Merck)
- Acetonitrilo para HPLC (Art. AC0329 Scharlau)
- Metanol para HPLC (Art. ME0306 Scharlau)
- Acetona para análisis (Art. AC0315 Scharlau)
- Cloruro de dansilo (Art 3094 Merck)
- Eter etílico anestésico (Art. 191313, PANREAC)

3.4.1.4. Soluciones para el ensayo

3.4.1.4.1. Estudios en animales de experimentación

En los ensayos con animales de experimentación se utilizó una solución acuosa de citrato trisódico.2H₂O al 20 % como anticoagulante, empleándose 50 μ l de la misma por cada 4 ml de muestra de sangre extraída.

La elevada hidrosolubilidad de la cianamida permitió que el fármaco pudiera administrarse en forma de solución acuosa que se preparó el mismo día del ensayo.

El agua utilizada como vehículo en todas las disoluciones preparadas era bidestilada y purificada a través del sistema Milli-Q (Millipore Iberica S.A.)

3.4.1.4.1.1. Ensayos en la rata

a) Administración intravenosa

Se preparó una solución de cianamida de concentración 2 mg/ml; para ello se dispusieron 100 mg del fármaco, exactamente pesados, en un matraz aforado de 50 ml, enrasando hasta el volumen final con agua.

La dosis administrada fue de 2 mg/kg, es decir 1 ml/kg de la solución anteriormente preparada.

b) Administración oral

Se preparó una solución de cianamida de concentración 0.2 mg/ml, disponiendo 10 mg del fármaco, exactamente pesados, en un matraz aforado de 50 ml y enrasando hasta el volumen final con agua. La solución así preparada se administró oralmente a la dosis de 2 mg/kg, de forma que los animales recibieron 10 ml/kg de la misma.

3.4.1.4.1.2. Ensayos en el perro

a) Administración intravenosa

Se prepararon tres soluciones de fármaco de concentraciones 8, 4 y 2 mg/ml; para ello se pesaron analíticamente 400, 200 y 100 mg de cianamida, respectivamente, y se disolvieron en agua enrasando hasta 50 ml en matraz aforado.

Las dosis de principio activo administradas por vía intravenosa fueron de 4, 2 y 1 mg/kg, lo que equivale a inyectar 0.5 ml/kg de cada una de las soluciones medicamentosas anteriormente descritas.

b) Administración oral

Se administró una dosis oral de 4 mg/kg. Los animales recibieron 0.5 ml de la solución medicamentosa preparada pesando analíticamente las correspondientes cantidades de cianamida, en función del peso del animal, para ser disueltas en 1 ml de agua.

3.4.1.4.2. Estudios en el hombre

Para las muestras de sangre obtenidas de voluntarios sanos, se eligió como anticoagulante una solución acuosa de heparina sódica (5000 u.i./ml), siendo necesarios en este caso 15 μ l por ml de muestra de sangre extraída.

a) Administración intravenosa

El mismo día del ensayo y trabajando siempre en condiciones estériles, es decir con material previamente esterilizado y en cabina de flujo

Material y Métodos

laminar, se pesaron exactamente las cantidades de cianamida correspondientes a las dosis de 0.03, 0.1, 0.3, 0.6 ó bien 1 mg/kg, de acuerdo con el peso de cada individuo, necesarias para ser disueltas en 50 ml de solución salina estéril (en matraz aforado). 2 ml de la solución anterior se dispusieron, previa filtración a través de filtro estéril de 0.22 μm acoplado a una jeringa de 2 ml de capacidad, en un matraz aforado de 100 ml de capacidad, enrasando hasta el volumen final con solución salina estéril. La solución así preparada, se dispuso en un vial, herméticamente cerrado, previa filtración de nuevo a través de filtro estéril de 0.22 μm . En el momento de la administración, se llenó la jeringa de infusión con sólo 50 μl de la solución anterior, que fueron los inyectados. Así por ejemplo, para un individuo de 70 kg de peso corporal y teniendo en cuenta la dosis de 1 mg/kg, la cantidad de cianamida a administrar es de 70 mg en 50 ml de solución salina estéril. Para ello se pesan, exactamente, 3500 mg de cianamida, se disponen en un matraz aforado de 50 ml y se enrasa hasta el volumen final con solución salina estéril (solución de 70 mg/ml); seguidamente se toman 2 ml de la solución anterior, es decir 140 mg de cianamida y se disponen en otro matraz aforado de 100 ml enrasando también hasta el volumen final y obteniéndose una concentración final de 1.4 mg/ml, la administración de 50 ml de dicha solución equivale a administrar la dosis de 70 mg de cianamida o bien de 1 mg/kg para un individuo de 70 kg.

Esta operación se repitió para cada uno de los individuos que recibieron cada una de las dosis ensayadas por esta vía de administración, tal y como se especifica más adelante en la Tabla 3.1 y en el orden establecido en las Tablas 3.2 y 3.4, de tal forma que para un individuo de 70 kg de peso corporal las cantidades de fármaco a pesar serían de 105, 350, 1050 y 2100 mg para las dosis de 0.03, 0.1, 0.3, y 0.6 mg/kg, respectivamente.

Asimismo, para la administración del placebo, se prepararon viales con 50 ml de solución salina estéril.

b) Administración oral

De igual modo, el mismo día del ensayo, se pesaron analíticamente, las cantidades de cianamida necesarias en función del peso corporal de cada voluntario, para ser disueltas en 50 ml de agua bidestilada estéril (en matraz aforado). La solución así preparada se filtró a través de filtro estéril de 0.45 μm de diámetro de poro, acoplado a jeringa estéril. 20 ml de dicha solución, exactamente medidos, se dispusieron en viales monodosis herméticamente cerrados, para ser administrados en su momento. Dicho procedimiento se efectuó para cada uno de los individuos participantes (8 voluntarios) y para cada una de las dosis administradas via oral, es decir 0.3 , 1 y 1.5 mg/kg (Tabla 3.1), siguiendo el orden de administración especificado en las Tablas 3.3 y 3.4. Concretamente, para un individuo de 70 kg de peso corporal, las cantidades de cianamida a pesar serían, en este caso, de 52.5, 175 y 262.5 mg para las dosis de 0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg, respectivamente.

3.4.2. METODOS

Seguidamente se expone la metodología empleada en la administración del fármaco, previa preparación del animal o individuo, y en la toma de muestras.

3.4.2.1. Estudios en animales de experimentación

3.4.2.1.1. Ensayos en la rata

a) Preparación del animal

Previamente a cualquier manipulación de los animales, estos se pesan, para así conocer el volumen exacto de solución de fármaco a administrar.

Material y Métodos

En este caso, puesto que no se siguen cinéticas individuales completas, las muestras de sangre blanco o control se obtienen de un grupo de cuatro ratas no administradas con cianamida. La extracción de muestras se realiza por punción cardíaca, previa anestesia de los animales con eter etílico anestésico bajo campana.

b) Administración de las soluciones

b.1. Administración intravenosa

La administración intravenosa del fármaco se efectúa a través de cualquiera de las dos venas ventro-laterales de la cola de la rata, no anestesiada, a razón de 1 ml/kg. Para asegurar una buena administración y evitar movimientos bruscos del animal, este se mantiene en un cepo dispuesto en posición vertical mediante un soporte. Previamente a la administración con jeringa de insulina, provista de aguja de 0.5 x 16 mm, la cola debe sumergirse aproximadamente unos dos minutos en agua caliente (40 °C), o bien recibir calor de una lámpara para dilatar las venas. Así, se consigue, de inmediato, una buena visualización de las venas debajo de la piel y la aguja puede introducirse en un ángulo no muy profundo mediante la mano derecha, mientras se sujeta la cola con la mano izquierda. Una vez insertada la aguja, se extrae un pequeño volumen de sangre para confirmar que la aguja está en vena y luego se inyecta. Agotada la solución de fármaco, se pone en marcha el cronómetro y antes de retirar la aguja de la vena, se presiona ligeramente con el dedo sobre el lugar de inyección para evitar cualquier posible pérdida de fármaco.

b.2. Administración oral

La solución oral de fármaco se administra también al animal despierto, mediante jeringa de 5 ml de capacidad con sonda metálica acoplada, a razón de 10 ml/kg. Sujetando, con la mano izquierda, la piel de

la parte dorsal del cuello de la rata, se consigue mantenerla fija con la cabeza inmóvil y la boca abierta. De este modo, puede introducirse la sonda a través del paladar y esófago, hasta alcanzar el estómago del animal, siendo administrada la solución medicamentosa, con la mano derecha.

c) Toma de muestras

Puesto que en el presente estudio, no se siguen cinéticas individuales completas en la rata, se extraerá la máxima cantidad de sangre posible (10 ml), por punción cardíaca, con jeringa de 10 ml provista de aguja de 0.8 x 40 mm y conteniendo 125 μ l de solución anticoagulante (citrato trisódico.2H₂O al 20%).

En ambos casos, es decir, tanto tras la administración intravenosa como oral, 1 minuto antes del tiempo de extracción, se anestesia el animal bajo campana con eter etílico, para luego colocarlo sobre el tablero de operaciones en tendido supino. Seguidamente, se localiza el punto de máxima palpación del corazón colocando el dedo índice sobre el cuarto espacio intercostal. Se inserta la aguja (sin jeringa) a través de la piel en los músculos intercostales junto al dedo índice y con un ángulo de 45°. Con un pequeño empuje se introduce la aguja en el corazón de modo que la sangre fluye inmediatamente. Seguidamente se acopla la jeringa a la aguja sin moverla y se extrae la muestra de sangre. Se anotan siempre los tiempos exactos de toma de muestra.

Los tiempos teóricos de toma de muestra son 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después de la administración intravenosa del fármaco, y 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después de la administración oral.

3.4.2.1.2. Ensayos en el perro

a) Preparación del animal

El animal, una vez pesado, se coloca en una habitación aislada y con todo el material disponible para la administración y toma de muestras; luego se procede a rasurar sus extremidades anteriores con el fin de visualizar sendas venas cefálicas.

De una de ellas se toma una muestra de sangre de 20 ml que proporciona el plasma suficiente para tener un blanco, así como para la confección de los patrones de la recta de calibración.

b) Administración de las soluciones

b.1. Administración intravenosa

Una vez preparado cada animal se procede a la administración de la solución de medicamento por una de las venas cefálicas, con jeringa de vidrio provista de aguja de 0.8 x 40 mm.

Para ello se presiona la vena en su parte proximal con el fin de que se dilate; después de insertar la aguja se extrae un pequeño volumen de sangre para confirmar que la aguja está en vena y entonces se inyecta la solución de fármaco dejando de presionar al mismo tiempo.

La inyección intravenosa se ejecuta con rapidez (bolus intravenoso) y hacia la mitad de la misma se pone en funcionamiento el cronómetro, considerando este instante como tiempo cero de la experiencia. Finalmente se saca la aguja, y se presiona ligeramente en el lugar de la inyección para minimizar la hemorragia.

b.2. Administración oral

La administración oral se realiza mediante jeringuilla de insulina desprovista de aguja. Esta, conteniendo 0.5 ml de la solución de medicamento, se introduce en la cavidad bucal y hasta el fondo de la misma; inmediatamente después, se le cierra la boca al animal para evitar cualquier posible expulsión del fármaco.

c) Toma de muestras

La toma de muestras se efectúa por la vena cefálica de la extremidad contralateral a la que se inyectó la solución del fármaco, siendo indiferente en el caso de la administración oral. Si se presentan dificultades con dicha extremidad es aconsejable no utilizar la correspondiente a la administración antes de los 60 minutos posteriores a la misma.

Las extracciones se realizan con jeringas de 5 ml de capacidad con aguja de 0.8 x 40, conteniendo 62.5 μ l de solución anticoagulante. Se inician quince segundos antes del tiempo previsto y se prolongan hasta quince segundos después de dicho instante. Se anotan los tiempos exactos de toma de muestras. La extracción de muestras se efectúa hasta 6 horas después de la administración del fármaco.

Para facilitar la operación conviene antes conocer la dirección de la vena y presionar por la parte proximal de la misma, sujetando bien la extremidad, evitando así que se produzcan lesiones en las paredes vasculares internas, que pueden dificultar extracciones posteriores, ante cualquier posible movimiento del animal.

Inmediatamente después de sacar la aguja, se presiona la vena en el lugar de inyección durante unos instantes, para que no sangre ni se formen hematomas.

Los tiempos teóricos de toma de muestra son 1, 3, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 y 360 minutos después de la administración intravenosa, y 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 y 360 minutos después de la administración oral.

3.4.2.2. Estudios en el hombre

Previamente al inicio del ensayo farmacocinético, los voluntarios seleccionados de acuerdo con los criterios descritos en el apartado 3.3, se someten a un examen analítico y bioquímico, que se repite al finalizar el estudio. También se les practica un ECG con registro continuo en la derivación DII durante 60 segundos.

a) Parámetros de seguridad y seguimiento clínico

Los voluntarios incluidos en el estudio, se someten, para cada una de las dosis administradas, a los controles que a continuación se exponen:

- a.1. Safety farmacológico: antes y 24 horas después de la administración intravenosa u oral de la cianamida.
- a.2. Monitorización de la tensión arterial sistólica y diastólica y de la frecuencia cardíaca en decúbito supino, a los siguientes tiempos: basal y a los 20 minutos durante la infusión y a los 30, 60, 120, 240, 360, 480 y 1440 minutos después de la infusión; y basal y a los 5, 20, 30, 60, 120, 240, 360, 480, y 1440 minutos después de la administración oral del fármaco.
- a.3. Cuestionario de efectos secundarios a los siguientes tiempos: basal y a los 20 minutos durante la infusión y a los 30, 120, 480 y 1440 minutos después de la infusión intravenosa del fármaco; y basal y a

los 5, 20, 30, 120, 480 y 1440 minutos después de la administración oral del fármaco.

b) Preparación de los voluntarios

Tras desinfección del lugar de punción con una solución de povidona iodada, se inserta una bránula de teflón (Vasocan) en la vena antecubital de uno de los antebrazos del voluntario. El éxito de la punción es visible gracias al reflujo de sangre en la cánula. Este sistema se utiliza para la extracción de muestras de sangre. El lugar de punción debe protegerse con apósitos estériles. Previamente a la administración intravenosa, o bien durante interrupciones prolongadas de la extracción de muestras, se introduce un mandril estéril (fijador de teflón) a través de la cánula Vasocan, que previene el riesgo de salida de sangre y de coagulación de la misma en la cánula.

Una vez insertada la cánula y antes de la administración del fármaco, se toma una muestra de 20 ml de sangre (con jeringa de 20 ml conteniendo 300 μ l de heparina sódica), volumen suficiente para tener blancos de plasma y de sangre de cada voluntario, así como para poder preparar las rectas de calibración correspondientes tanto a la determinación

de cianamida en plasma y en sangre como a la determinación de la actividad de la ALDH en hematíes

c) Administración de las soluciones

Sea cual sea la vía de administración del fármaco, los voluntarios deben estar en condiciones de ayuno de 12 horas.

c.1. Administración intravenosa

A efectos de poder asegurar una infusión constante, la administración intravenosa de la cianamida se efectúa mediante una bomba de infusión, provista de una jeringa conteniendo 50 ml de la solución de fármaco ó de solución salina estéril en el caso del placebo, a la salida de la cual se conecta un tubo de silicona provisto en su extremo de una palomita con aguja (sistema Vacutainer) que se inserta directamente en la vena de uno de los antebrazos del voluntario, concretamente el contralateral al de la extracción de muestras de sangre. La administración del fármaco o del placebo, se efectúa a una velocidad de 150 ml/h durante 20 minutos.

c.2. Administración oral

La administración de los 20 ml de solución de cianamida, específicamente preparados para cada voluntario y contenidos en viales monodosis, irá acompañada por la ingestión de 200 ml de agua.

A las 6 horas después, ya sea de la administración intravenosa u oral del fármaco, los voluntarios recibirán un almuerzo estándar para este tipo de estudios farmacocinéticos.

c.3. Toma de muestras

Durante las 24 horas posteriores a la administración ya sea intravenosa u oral de cianamida, se toman muestras de 10 ml de sangre, con jeringa de 10 ml de capacidad conteniendo 150 μ l de heparina sódica, directamente acoplada a la cánula que en el caso de la infusión intravenosa será la contraria a la de la administración.

Los tiempos teóricos de toma de muestra son a 2, 5, 15 y 20 minutos durante la infusión del fármaco y a 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 480, y 1440 minutos después de finalizada la infusión.

Tras la administración oral del fármaco, las extracciones se realizan a 2, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 40, 60, 90, 120, 240, 360, 480 y 1440 minutos post-administración.

Por otra parte, en ambos casos, se siguen tomando muestras de 2 ml de sangre mediante jeringa de 2 ml conteniendo 30 μ l de heparina sódica, a las 48, 96, 144 y 192 horas después de la administración, con la finalidad de seguir el curso de la actividad inhibidora de la ALDH hemática por parte de la cianamida.

d) Diseño del estudio

El estudio farmacocinético de la cianamida en voluntario sano se ha llevado a cabo en tres fases distintas que se resumen en la Tabla 3.1.

Así, en una primera fase se estudia la seguridad y la tolerancia de la cianamida administrada en infusión por vía intravenosa, a cinco niveles de dosis crecientes. En dicha fase, el estudio presenta las características de un diseño en un bloque equilibrado incompleto, en condiciones de simple ciego, con placebo en 10 voluntarios sanos. Cada nivel de dosis se ensaya en cuatro voluntarios, a excepción de la dosis más baja (0.03 mg/kg) en que solo intervienen 2. Una vez comprobada la seguridad de una dosis se procede a estudiar la inmediatamente superior. En cada sujeto se ensayan, además del placebo, dos niveles de dosis, con un intervalo de blanqueo de una semana a excepción de los voluntarios n° 9 y 10 que sólo recibieron la dosis de 1 mg/kg. El hecho de que el número de formulaciones ensayadas sea par, hace que el bloque incompleto no esté equilibrado en relación a las semanas, es decir cada formulación no aparece el mismo número de veces por semana.

Por otra parte dicho diseño no está equilibrado en función del efecto "carry over". En la Tabla 3.2 se esquematiza el número de semana de administración de cada una de las dosis ensayadas para cada uno de los voluntarios sometidos a estudio.

Tabla 3.1. *Resumen del desarrollo de las fases realizadas en el trabajo. Los detalles se pormenorizan en el texto.*

Fase	Nº voluntarios	Niveles de dosis	
		Dosis (mg/kg)	Voluntarios
1	10	0.03 iv 0.1 iv 0.3 iv 0.6 iv 1.0 iv placebo iv	2 (1 y 2) 4 (1,2,3 y 4) 4 (3,4,5 y 6) 4 (5,6,7 y 8) 4 (7, 8, 9 y 10) 10 (1-10)
2	4	0.3 po 1.0 po 1.5 po	4 (7,8,9 y 10) 4 (7,8,9 y 10) 4 (7,8,9 y 10)
3	4	1.0 iv 0.3 po 1.0 po 1.5 po	4 (11,12,13 y 14) 4 (11,12,13 y 14) 4 (11,12,13 y 14) 4 (11,12,13 y 14)

En una segunda fase y puesto que se disponía ya de los resultados por vía intravenosa de la dosis de 1 mg/kg correspondientes a los voluntarios 7 a 10, se ha estudiado en los mismos la cinética de la cianamida por vía oral a las dosis de 0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg. El orden de administración se ha aleatorizado de acuerdo con el diseño que se presenta en la Tabla 3.3, diseño cruzado en el que cada dosis aparece el mismo número de veces cada semana y por otra parte, no está equilibrado con respecto al efecto "carry over".

En una tercera fase se ha completado el estudio con 4 voluntarios más siendo en este caso el diseño cruzado completo y equilibrado respecto a la semana o período de administración. Todos los individuos han recibido todas las formulaciones (1 mg/kg por infusión intravenosa y 0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg por vía oral) y cada semana de ensayo estas se administran el mismo número de veces. Para controlar el posible efecto "carry over" cada una de las dosis precede a las otras el mismo número de veces, ello se consigue con un diseño en cuadrado latino tal como se presenta en la Tabla 3.4.

Tabla 3.2. *Diseño en un bloque equilibrado incompleto del estudio de seguridad y tolerancia de la cianamida administrada en infusión intravenosa a dosis crecientes a los voluntarios n° 1-10.*

Voluntario n°	Semana n°		
	1	2	3
1	P	A	B
2	A	P	B
3	P	B	C
4	B	P	C
5	P	C	D
6	C	P	D
7	P	D	E
8	D	P	E
9	P	E	-
10	E	P	-

P=Placebo, A=0.03 mg/kg iv, B=0.1 mg/kg iv, C=0.3 mg/kg iv, D=0.6 mg/kg iv
E=1.0 mg/kg iv

Material y Métodos

Tabla 3.3. *Diseño cruzado tras administración oral de 0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg de cianamida a los voluntarios n° 7-10.*

Voluntario n°	Semana n°		
	1	2	3
7	F	G	H
8	G	H	F
9	H	F	G
10	F	G	H

F=0.3 mg/kg, G=1.0 mg/kg, H=1.5 mg/kg

Tabla 3.4. *Diseño en cuadrado latino con efecto "carry over" controlado tras la administración intravenosa (1 mg/kg) y oral (0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg) de cianamida a los voluntarios n° 11-14.*

Voluntario n°	Semana n°			
	1	2	3	4
11	F	H	E	G
12	E	F	G	H
13	G	E	H	F
14	H	G	F	E

E=1.0 mg/kg iv, F=0.3 mg/kg po, G=1.0 mg/kg po, H=1.5 mg/kg po

3.5. TECNICAS ANALITICAS

En este epígrafe se detalla el tratamiento de las muestras de plasma y el método de valoración de los niveles de cianamida en dicho fluido biológico. Asimismo, se expone el protocolo correspondiente a la determinación de la actividad de la aldehídoeshidrogenasa en hematíes de voluntarios sanos.

3.5.1. Determinación de cianamida en plasma

3.5.1.1. Preparación de las muestras

Debido a la degradación de la cianamida por el enzima catalasa eritrocitaria (DeMaster y col., 1984), es aconsejable que la preparación de muestras, ya sean de animales de experimentación o bien de voluntarios, se lleve a cabo siempre antes de transcurridos 15 minutos desde el tiempo de extracción de la muestra de sangre.

3.5.1.1.1. Estudios en animales de experimentación

A las muestras de sangre extraídas, ya sea de rata o de perro, se adicionan 0.25 g de medio de separación Trennmittel Merck (Art. 10 103), centrifugando luego a 2500 rpm durante 15 minutos. Se separan 0.5 ml de plasma de cada una de las muestras problema y se depositan en tubos de vidrio roscados adicionando seguidamente 0.1 ml de agua en cada uno. Puesto que por los volúmenes de sangre extraídos, es posible obtener más de 0.5 ml de plasma, se preparan varios replicados de una misma muestra problema. Finalmente se guardan a -78 °C hasta el día del análisis.

El plasma de la muestra blanco servirá para confeccionar los estándares de la recta de calibración tal como se indica en el apartado 3.5.1.2.

3.5.1.1.2. Estudios en el hombre

a) Tratamiento de las muestras basales

De los 20 ml de muestra blanco extraída se toman, exactamente medidos, 4 ml de sangre que se depositan en un tubo de 10 ml de capacidad, añadiendo a continuación 4 ml de agua bidestilada; se agita durante unos segundos y se mantiene durante 30 minutos en un baño hielo-agua (4 °C) con

Material y Métodos

objeto de provocar la hemólisis de los hematíes. Transcurrido este tiempo, el hemolizado se almacena a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la preparación de la recta de calibración correspondiente a la determinación de la actividad de la aldehíodeshidrogenasa en el momento oportuno tal como se describe en el apartado 3.5.2.4.

Los 16 ml de sangre restantes se reparten entre dos tubos de 10 ml de capacidad, se añaden 0.25 g de Trennmittel Merck a cada uno y se centrifugan a 2500 rpm durante 15 minutos. A continuación, se separa el plasma obtenido y se reparte en sendos tubos de vidrio de 10 ml de capacidad en cantidades de 0.5 ml, exactamente medidos, para la confección de los estándares de la recta de calibración correspondiente a la determinación de cianamida en plasma, de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.5.1.2.

b) Preparación de las muestras problema

2 ml, exactamente medidos, de cada una de las muestras de sangre extraídas de cada voluntario (10 ml), se separan y se depositan en sendos tubos de plástico de 5 ml de capacidad, se añaden a continuación 2 ml de agua bidestilada, y se deja transcurrir la hemólisis en baño de hielo-agua ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) tal y como se describe para las muestras basales. Las muestras de sangre hemolizada se reparten entre 4 tubos de plástico conteniendo 1 ml cada uno, para luego ser almacenadas a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la determinación de la actividad de la aldehíodeshidrogenasa en hematíes, tal como se describe en el apartado 3.5.2.4.

A los 8 ml de sangre restantes se les añaden 0.25 g de Trennmittel Merck y se centrifugan a 2500 g durante 15 minutos. Replicados de 0.5 ml del plasma obtenido para cada muestra, se depositan en sendos tubos de 10 ml de capacidad, se añade 0.1 ml de agua bidestilada a cada uno de ellos y se almacenan a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día del análisis de cianamida en plasma.

3.5.1.2. Preparación de las soluciones patrón

Se preparan soluciones estándar de cianamida cuya adición al plasma obtenido ya sea de animales o de voluntarios, antes de ser sometidos a tratamiento, permite confeccionar la recta de calibración.

Mediante interpolación en dicha recta de calibración, se podrán conocer los niveles de fármaco en las muestras extraídas a diferentes tiempos. Se procede del siguiente modo:

A partir de una solución madre de 100 mg/ml de cianamida y mediante sucesivas diluciones se preparan soluciones patrón de 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cianamida.

Se adicionan 0.1 ml de cada una de ellas así como 0.1 ml de agua en 7 tubos de vidrio, debidamente rotulados, conteniendo 0.5 ml de plasma cada uno. De este modo se obtienen los estándares de la recta de calibración de cianamida en plasma, de concentraciones de 500, 200, 100, 50, 25, 10 y 0 ng/ml, respectivamente.

Tanto las soluciones patrón como los estándares de las correspondientes rectas de calibración se preparan el mismo día del ensayo y estos últimos se conservan, junto con las muestras de plasma problema a valorar, a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta el día del análisis.

3.5.1.3. Soluciones para el ensayo

a) Solución reguladora de carbonato sódico-bicarbonato sódico 0.2 M (pH 9.0)

Se pesan analíticamente 2.12 g de carbonato sódico (A) y 1.68 g de bicarbonato sódico (B), anhidros. Se depositan ambas sustancias en sendos matraces aforados y se disuelven en agua enrasando hasta un volumen final de 100 ml. Se toman 10 ml de la solución correspondiente a A y el resto se completa con la solución correspondiente a B en un matraz aforado de 100 ml. Una vez finalizada la operación se comprueba el pH.

b) Solución reguladora de fosfato potásico 10 mM (pH 7.0)

Preparación de la solución stock de fosfato potásico 100 mM

En dos matraces aforados de 500 ml de capacidad se preparan sendas disoluciones de fosfato bipotásico (solución A) y fosfato monopotásico (solución B) anhidros, pesando 17.418 g y 13.609 g de cada una de las sustancias respectivamente. A continuación, se toman exactamente medidos 305 ml de la solución A y 195 ml de la solución B que se depositan en un matraz aforado enrasando hasta el volumen final de 1 litro, con agua bidestilada.

Preparación de la solución de fosfato potásico 10 mM

A partir de la solución stock de fosfato potásico 100 mM se hace una dilución 1/10 en agua bidestilada. Finalmente se comprueba el pH.

c) Solución de cloruro de dansilo

Se toman, exactamente pesados, alrededor de 10 mg de cloruro de dansilo, se depositan en un matraz aforado de 10 ml de capacidad y se disuelven en acetona hasta el volumen final. La solución así preparada se sonica en el baño de ultrasonidos, se filtra con filtro Millipore de 0.45 μm y se guarda en frasco de color topacio, preservado de la acción de la luz.

3.5.1.4. Descripción del método analítico

El procedimiento analítico empleado en este trabajo ha sido el descrito por Pruñonosa y col. (Pruñonosa y col., 1986), con alguna modificación en lo que respecta al tratamiento de las muestras y que a continuación se detalla.

a) Obtención de los extractos plasmáticos

A cada una de las muestras de plasma preparadas según el procedimiento descrito en los apartados 3.5.1.1 y 3.5.1.2 se añaden 2.5 ml de acetato de etilo con el fin de extraer la cianamida plasmática.

Se someten a agitación oscilante durante 30 minutos y luego se centrifugan a 4000 rpm durante un período de 10 minutos.

Se separan alícuotas de 1.5 ml del sobrenadante de cada una de las muestras y se depositan en sendos tubos de fondo cónico.

Se realiza una segunda extracción con 2 ml de acetato de etilo actuando del mismo modo que en la anterior. Después de la centrifugación, se separa una alícuota de 2 ml del sobrenadante, que se reúne con los extractos orgánicos anteriores y se evaporan a sequedad bajo corriente de nitrógeno y a temperatura ambiente.

b) Derivatización con cloruro de dansilo

El residuo obtenido se disuelve con 0.1 ml de solución reguladora de carbonato sódico-bicarbonato sódico 0.2 M (pH 9.0) en el baño de ultrasonidos. Seguidamente, se añaden 0.1 ml de solución de cloruro de dansilo. Se agita el contenido de los tubos herméticamente cerrados durante unos segundos y luego se depositan en la placa termostatizada a 40 °C para que transcurra la reacción de dansilación durante un período de 1 hora.

c) Valoración

Finalizada la derivatización, se dejan enfriar las muestras hasta temperatura ambiente. Luego mediante micropipeta se introducen en viales de 300 μ l, para su subsiguiente inyección en el que corresponda de los equipos de cromatografía líquida de alta resolución descritos en el párrafo 3.4.1.2.

El volumen de muestra inyectado es de 50 μ l salvo en aquellos casos en que las concentraciones de fármaco superan el valor de 500 ng/ml (en plasma de rata o perro), ó bien de 200 ng/ml (en plasma humano), en los que se inyectan 10 μ l. En el caso de hallarnos todavía a concentraciones superiores a los 500 ng/ml se diluye la muestra con la misma solución reguladora de carbonato sódico-bicarbonato sódico 0.2 M (pH 9.0), hasta conseguir la interpolación de la misma en la recta de calibración.

Las condiciones cromatográficas empleadas son las siguientes:

- Flujo 4.0 ml/min
- Detección fluorimétrica. excitación 360 nm, emisión 510 nm
- Presión 900.0 psi
- Velocidad del papel 5 cm/min
- Anchura de pico 10

- Supresión ruido de fondo 1000
- Fase móvil constituida por dos disolventes: una solución 10 mM de fosfato potásico (pH 7.0) (disolvente A) y una mezcla 55:45 de acetonitrilo y solución 10 mM de fosfato potásico (pH 7.0) (disolvente B), mediante un programa de gradientes que se especifica en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Programa de gradientes utilizado en el análisis cromatográfico.

Tiempo (min)	Velocidad de Flujo (ml/min)	Disolvente (%)		Tipo de curva
		A	B	
0	4	70	30	-
7	4	40	60	6
10	4	0	100	1
12	4	70	30	1

El método de cuantificación utilizado fue el del estándar externo, puesto que no fue posible hallar un estándar interno que cumpliera con los requisitos de ausencia de solapamiento entre picos y suficiente sensibilidad al mismo tiempo. Las sustancias ensayadas por los autores con esta finalidad fueron las siguientes: glicinonitrilo, etilamina, propilamina, isopropilamina, butilamina, β -aminopropionitrilo, tiourea, tioacetamida, α -fenilglicina, anilina, etanolamina, 4-nitroanilina e hidroxilamina.

Los eluyentes que han de pasar por la columna se filtran a través de los filtros de membrana adecuados y se desgasifican en un baño de ultrasonidos:

- Metanol, acetonitrilo: filtro de membrana tipo FH de 0.5 μm (Millipore).
- Agua destilada, solución 10 mM fosfato potásico (pH 7.0): filtro de membrana tipo MF de 0.45 μm (Millipore).

Las Figuras 3.3 y 3.4 presentan los cromatogramas correspondientes a una muestra blanco y a otra obtenida 3 minutos después de la administración oral de 2 mg/kg de cianamida a la rata (104 ng/ml).

En las Figuras 3.5 y 3.6 se reflejan los cromatogramas obtenidos para una muestra de plasma blanco de perro y otra conteniendo 238 ng/ml de cianamida, extraída 120 minutos después de la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg de fármaco, respectivamente.

Los cromatogramas correspondientes a una muestra de plasma blanco de voluntario sano y a otra conteniendo 117 ng/ml de cianamida, obtenida 12 minutos después de la administración oral de 0.3 mg/kg de fármaco, se presentan en las Figuras 3.7 y 3.8, respectivamente.

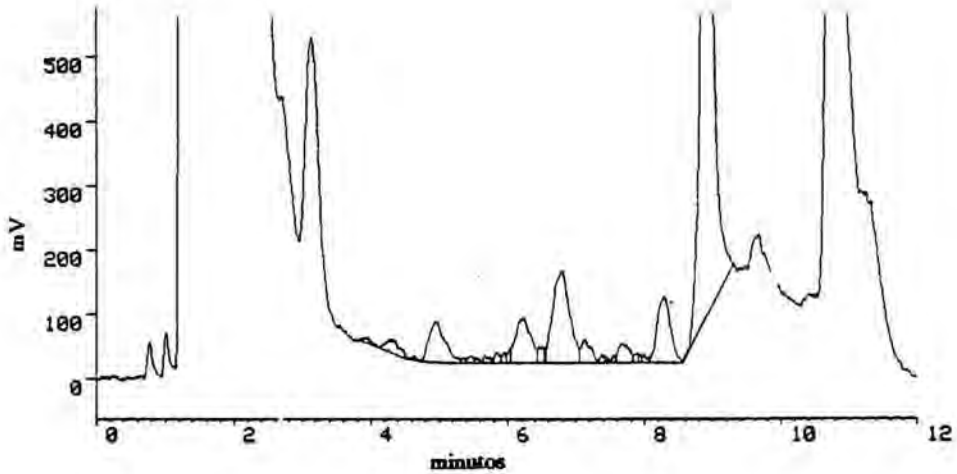


Figura 3.3. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma blanco de rata Sprague-Dawley.

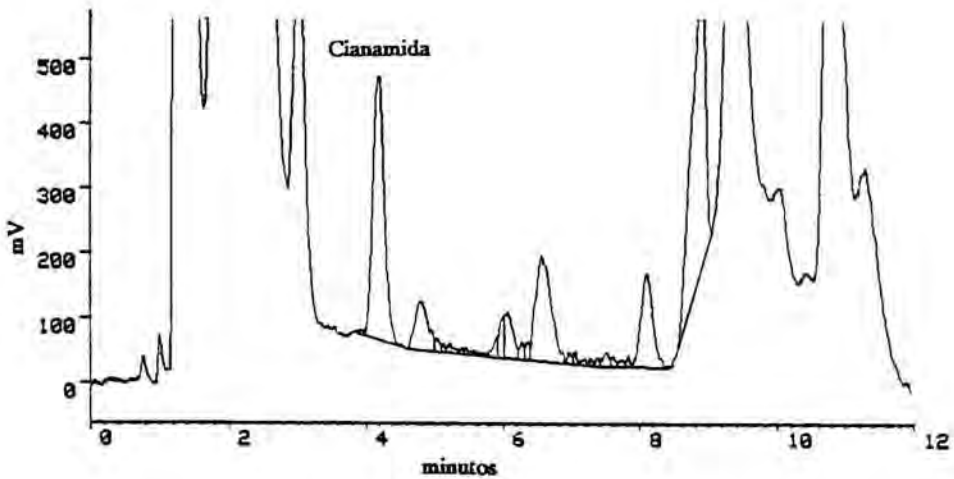


Figura 3.4. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma de rata conteniendo 104 ng/ml de cianamida, obtenida 3 minutos después de la administración oral de una dosis de 2 mg/kg de fármaco.

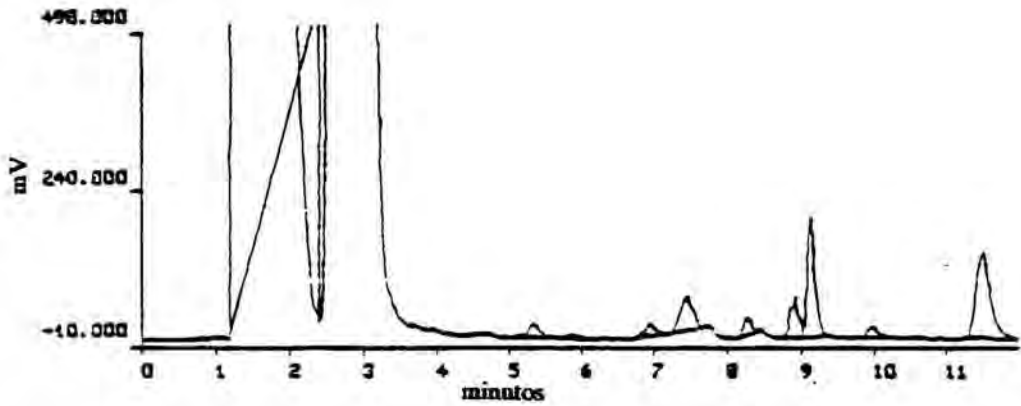


Figura 3.5. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma blanco de perro Beagle.

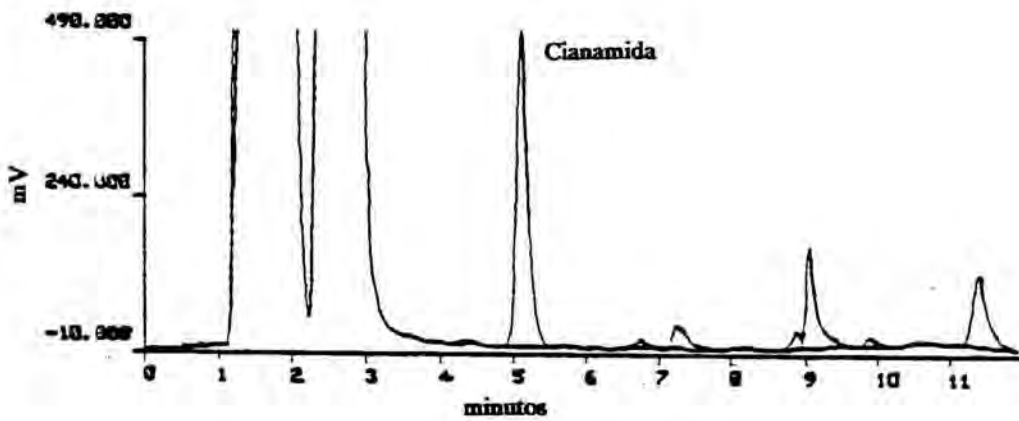


Figura 3.6. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma de perro conteniendo 238 ng/ml de cianamida, obtenida 120 minutos después de la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg de fármaco.

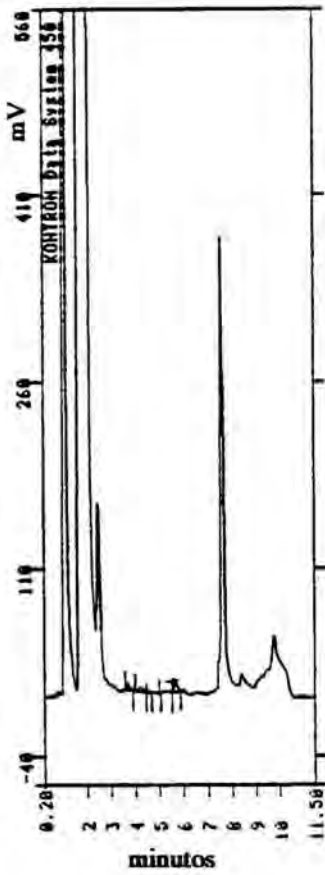
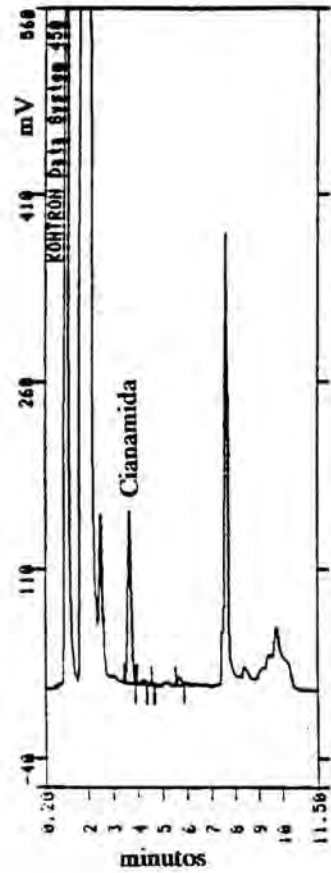


Figura 3.7. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma blanco de voluntario sano.

Figura 3.8. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma de voluntario sano conteniendo 117 ng/ml de cianamida, obtenida 12 minutos después de la administración oral de una dosis de 0.3 mg/kg de fármaco.



3.5.1.5. Validación de la metódica analítica

La validación de la metódica analítica se ha efectuado, en nuestras condiciones experimentales, para cada una de las especies sometidas a ensayo.

Para ello se han preparado cinco rectas de calibración (Karnes y col., 1991) con plasma de cada una de las especies, en días distintos y con estándares de concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 500 ng/ml de cianamida en el caso de la rata, de 10, 50, 100, 200 y 500 ng/ml en el caso del perro y de 10, 25, 50 100 y 200 ng/ml en plasma humano, procediendo tal y como se señala en los epígrafes 3.5.1.1 y 3.5.1.2.

Se han realizado las correspondientes determinaciones cuantitativas, de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.5.1.4 y seguidamente se ha comprobado (Maldener G., 1989; Karnes y col., 1991; Shah y col., 1992):

- La reproducibilidad en los tiempos de retención de la cianamida.
- La existencia de linealidad en el ámbito de concentraciones ensayado.
- La exactitud de la técnica analítica y la precisión de la misma, puestas de manifiesto por los valores del error relativo y del coeficiente de variación porcentual, respectivamente, para cada una de las concentraciones ensayadas.
- El límite de cuantificación de la técnica analítica.
- La sensibilidad y límite de detección de la técnica analítica.
- El porcentaje de recuperación de fármaco en plasma tras el procesamiento de las muestras.

Los resultados obtenidos en la validación de la metódica analítica, son los que a continuación se exponen:

a) Tiempo de retención y reproducibilidad

Tras la determinación de los tiempos de retención de la cianamida correspondientes a los estándares de calibración analizados durante el proceso de validación en plasma de rata, perro y humano, se han obtenido los resultados que se muestran en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. *Valores medios \pm DE (n=21) de los tiempos de retención de cianamida en muestras de plasma de rata, perro y humano.*

Espece	Tiempo retención (min)
Rata	4.24 \pm 0.10
Perro	4.15 \pm 0.07
Hombre	3.66 \pm 0.03

b) Linealidad

El ajustado de los valores de respuestas analíticas, en nuestro caso áreas de pico, frente a concentraciones plasmáticas de los distintos estándares, se ha realizado por el método de regresión lineal simple en plasma de rata y perro y por regresión lineal ponderada en plasma humano. En este último caso se ha hecho uso del programa Rectest (Segura, 1985). De hecho con la utilización de este programa lo que se realiza es una calibración inversa, puesto que se consideran las concentraciones como variables dependientes y como consecuencia de ello, los errores aleatorios asociados a las concentraciones son mayores que los asociados a las respuestas analíticas, al contrario de lo que ocurre en la calibración clásica, que minimiza los residuales de la variable dependiente y asume que el error de la variable independiente es despreciable. Otra de las asunciones de la calibración clásica por regresión lineal simple es el hecho de que los residuales calculados son independientes, es decir se distribuyen normalmente y poseen varianzas equivalentes. Esto se conoce como homocedasticidad. La ausencia de homocedasticidad entre las

Material y Métodos

varianzas asociadas a las distintas concentraciones de la recta de calibración, hecho que por otra parte se manifiesta en la mayoría de los casos por un aumento de la varianza al aumentar la concentración, obliga a efectuar una regresión lineal ponderada (Johnson y col., 1988), de modo que no puede aplicarse el procedimiento por mínimos cuadrados ordinario sin perder exactitud a concentraciones bajas. Al ponderar se aplica un factor inversamente proporcional a la varianza para cada concentración ensayada ($W_i = 1/\sigma(C_i)$), de este modo se consigue que los puntos de menor varianza tengan un peso mayor en el proceso de calibración que los de varianza más elevada, habiéndose demostrado que dicha ponderación minimiza la suma ponderada de cuadrados de residuales.

Sin embargo, puesto que en nuestro caso no se dispone más que de un replicado por día de ensayo, de cada una de las concentraciones, se acepta tomar como factor de ponderación $1/C_i^2$ (Boxenbaum y Riegelman, 1974), puesto que se ha comprobado que existe proporcionalidad entre los valores de $1/(C_i^2)$ y $1/\sigma(C_i)$. En la Tabla 3.7 se presentan los valores de $1/(C_i^2)$ y $1/\sigma(C_i)$, obtenidos los últimos a partir de los correspondientes 5 replicados, preparados en días distintos, de los estándares de cianamida en plasma humano de concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 200 ng/ml.

La aplicación del test t de Student de una cola ha permitido observar la existencia de una correlación significativa entre dichas variables ($r=0.992$, $p=0.00049$)(Segura, 1985).

La ausencia de homogeneidad en el tratamiento de datos, en cuanto a ponderación, en las 3 especies ensayadas se debe a que el presente trabajo se ha realizado en dos fases espaciadas en el tiempo, de modo que en un principio no se disponía de un programa adecuado para poder ponderar.

Para estudiar la existencia de linealidad en el ámbito de concentraciones ensayadas, se ha evaluado la significación estadística de la diferencia de la ordenada en el origen respecto a cero mediante el test t de student de una cola (Segura, 1985). Por otra parte, se ha efectuado un análisis de varianza de una vía previa comprobación de la homogeneidad de variancias (test de Barlett), seguido de un test de comparación múltiple (test de Scheffé) entre los valores de la relación respuesta/concentración, a las diferentes concentraciones estudiadas y para cada una de las especies. En los casos en que las variancias no fueron homogéneas, se analizó la existencia de diferencias estadísticamente significativas mediante las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.

Los resultados obtenidos indicaron que la ordenada en el origen de la recta de calibración confeccionada con plasma de rata (10-500 ng/ml) no es estadísticamente distinta de cero ($t=-0.8653$, $\phi=3$, $p>0.2$), sin embargo se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los ratios correspondientes a los estándares de 25-500 ng/ml con respecto al del estándar de 10 ng/ml ($p=0.009$). En el caso de la recta de calibración con plasma de perro (10-500 ng/ml) ambas pruebas demostraron la no existencia de diferencias estadísticamente significativas ($t=1.7340$, $\phi=3$, $p>0.1$ y $p=0.3681$, respectivamente).

En lo que respecta a la recta de calibración con plasma humano, cabe destacar que la ordenada en el origen no presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a cero en el ámbito de concentraciones de 10-50 ng/ml ($t=6.45$, $\phi=1$, $p>0.05$) y de 25-200 ng/ml ($t=1.7150$, $\phi=2$, $p>0.2$), pero si existen tales diferencias en el ámbito de 10-200 ng/ml ($t=4.3220$, $\phi=3$). Por otra parte no se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los ratios correspondientes a los estándares de 10-200 ng/ml ($p=0.3232$).

A juzgar por estos resultados, se puede afirmar que existe linealidad en el intervalo de concentraciones de 25-500 ng/ml en plasma de rata, de 10-500 ng/ml en plasma de perro y de 10-50 ng/ml y 25-200 ng/ml en plasma humano.

Tabla 3.7. *Correlación entre los valores de $1/(C_i^2)$ y $1/\sigma(C_i)$ correspondientes a los 5 replicados de los estándares de calibración de cianamida en plasma humano.*

Variable	Concentración (ng/ml)				
	10	25	50	100	200
$1/C_i^2$	0.01	0.0016	0.0004	0.0001	0.000025
$1/\sigma C_i$	4.3403	0.1082	0.0492	0.0225	0.0036

$r=0.992, p=0.00049$

c) Exactitud y Precisión

Para cada una de las concentraciones se ha calculado el error relativo que pone en evidencia la exactitud de la técnica o proximidad del valor obtenido con respecto al valor verdadero, y el coeficiente de variación porcentual que corrobora la precisión de los resultados obtenidos, es decir la repetibilidad para los distintos replicados de la recta de calibración. Dichos parámetros son interdependientes, es decir no puede considerarse el uno sin el otro, y constituyen el criterio de primera elección cuando se pretende evaluar el error de la metódica analítica. En las Tablas 3.8-3.10 se presentan los valores de concentración de cianamida determinados frente a los valores teóricos, así como los valores medios, las desviaciones estándar, los errores relativos y los coeficientes de variación porcentual resultantes, en plasma de rata, perro y humano, respectivamente.

Tabla 3.8. Concentraciones de cianamida halladas en plasma de rata, respecto a las concentraciones teóricas añadidas con sus correspondientes valores medios, desviaciones estándar, coeficientes de variación porcentual y errores relativos porcentuales.

Recta n°	Concentración (ng/ml)			
	25	50	100	500
1	28.59	47.60	98.44	500.37
2	20.27	55.99	98.87	499.86
3	28.98	40.82	105.60	499.60
4	27.97	52.78	93.34	500.91
5	23.36	50.01	101.94	499.69
\bar{x}	25.83	49.44	99.64	500.09
DE	3.84	5.75	4.54	0.55
CV(%)	14.88	11.62	4.56	0.11
E _r (%)	3.34	-1.12	-0.36	0.02

Se han excluido de dicha Tabla los resultados correspondientes al estándar de 10 ng/ml debido a que aunque la precisión de la técnica analítica a este nivel de concentración fue aceptable (CV% = 15.74), no ocurrió así con la exactitud (E_r % = 57.13).

En las Tablas 3.11 y 3.12 se resumen los valores de los errores relativos y coeficientes de variación porcentuales, respectivamente, para cada una de las tres especies sometidas a ensayo.

Tabla 3.9. *Concentraciones de cianamida halladas en plasma de perro, respecto a las concentraciones teóricas añadidas con sus correspondientes valores medios, desviaciones estándar, coeficientes de variación porcentual y errores relativos porcentuales.*

Recta n°	Concentración (ng/ml)			
	50	100	200	500
1	49.81	100.95	199.01	500.22
2	48.41	106.27	194.03	501.29
3	49.66	106.63	191.68	502.04
4	51.44	92.87	207.33	498.35
5	52.21	98.67	198.46	500.66
\bar{x}	50.31	101.08	198.10	500.51
DE	1.51	5.72	6.00	1.39
CV(%)	3.01	5.66	3.03	0.28
$E_r(\%)$	0.61	1.08	-0.95	0.10

Se han excluido de dicha Tabla los resultados correspondientes al estándar de 10 ng/ml debido a que aunque la exactitud de la técnica analítica a este nivel de concentración fue aceptable ($E_r\% = 4.62$), no ocurrió así con la precisión ($CV\% = 103.17$).

Tabla 3.10. Concentraciones de cianamida halladas en plasma humano, respecto a las concentraciones teóricas añadidas con sus correspondientes valores medios, desviaciones estándar, coeficientes de variación porcentual y errores relativos porcentuales.

Recta n°	Concentración (ng/ml)				
	10	25	50	100	200
1	9.60	27.97	50.17	88.98	198.33
2	10.76	21.99	48.96	102.95	211.06
3	10.70	22.21	44.33	97.11	230.09
4	10.05	24.18	54.03	99.47	191.54
5	10.05	28.27	42.91	87.63	225.13
\bar{x}	10.23	24.92	48.08	95.23	211.22
DE	0.48	3.04	4.51	6.67	16.61
CV(%)	4.78	12.20	9.37	7.00	7.86
E _r (%)	2.30	-0.31	-3.83	-4.77	5.61

Tabla 3.11. Valores de los errores relativos porcentuales correspondientes a cada una de las concentraciones de los estándares de calibración de plasma de rata, perro y humano.

Concentración (ng/ml)	E _r (%)		
	Rata	Perro	Hombre
10	-	-	2.30
25	3.34	-	-0.31
50	-1.12	0.61	-3.83
100	4.56	1.08	-4.77
200	-	-0.95	5.61
500	0.02	0.10	-

Tabla 3.12. *Valores de los coeficientes de variación porcentuales correspondientes a cada una de las concentraciones de los estándares de calibración de plasma de rata, perro y humano.*

Concentración (ng/ml)	CV (%)		
	Rata	Perro	Hombre
10	-	-	4.78
25	14.88	-	12.20
50	11.62	3.01	9.37
100	4.56	5.66	7.00
200	-	3.03	7.86
500	0.11	0.28	-

Los valores de error relativo obtenidos (< 6%), permiten calificar la técnica analítica empleada en la determinación de cianamida en plasma, ya sea de rata, perro o humano, como suficientemente exacta en el ámbito de concentraciones ensayadas (de 25 a 500 ng/ml en plasma de rata, de 50 a 500 ng/ml en plasma de perro y de 10 a 200 ng/ml en plasma humano). Al mismo tiempo, el método de valoración resultó ser aceptablemente preciso puesto que se obtuvieron coeficientes de variación porcentual inferiores al 15 %. Cabe destacar que en una experiencia efectuada con 5 replicados de los estándares de 25, 50, 100, 200 y 500 ng/ml de cianamida en plasma de perro, preparados y analizados el mismo día (intradía), experiencia que por otra parte podría considerarse como una medida de la precisión del método en condiciones óptimas, los valores de CV% observados para el estándar de 25 ng/ml fueron del 31.13%; por este motivo sólo se han considerado en la calibración los estándares de 50-500 ng/ml, a pesar de existir linealidad en el ámbito de concentraciones de 10-500 ng/ml como ya se ha demostrado anteriormente.

d) Límite de cuantificación

El límite de cuantificación o concentración más baja que puede ser determinada con una exactitud ($E_r < 20\%$), precisión ($CV\% < 20\%$) y variabilidad aceptables (Long y Winefordner, 1983), se ha establecido en 25 ng/ml, 50 ng/ml y 10 ng/ml en plasma de rata, perro y humano, respectivamente. Por este motivo, en los tabulados de concentración plasmática-tiempo y a efectos de tratamiento de resultados, no se tendrán en cuenta aquellos valores que estén por debajo de dichos valores.

e) Sensibilidad y límite de detección

El nivel de concentración inferior que puede considerarse estadísticamente distinto del blanco ha sido de 25 ng/ml en plasma de rata y perro y de 10 ng/ml en plasma humano. Estos valores han sido establecidos de acuerdo con la normativa de la IUPAC (Long y Winefordner, 1983) según la cual la respuesta del límite de detección (R_L) debe estar alejada tres desviaciones estándar ($3s_B$) de la respuesta de $n > 20$ replicados del blanco (R_B), siendo dicho valor el correspondiente a un nivel de confianza del 99.9%. Como consecuencia si:

$$R_L = R_B + 3 \cdot S_B \qquad \text{Ecuación 3.1}$$

y por otra parte, si la respuesta del límite de detección está relacionada con la concentración límite de acuerdo con la Ecuación 3.2,

$$R_L = b_0 + b_1 \cdot C_L \qquad \text{Ecuación 3.2}$$

el límite de detección vendrá dado por la Ecuación 3.3,

$$c_L = \frac{(R_L - b_0)}{b_1} = 3 \cdot \frac{S_B}{b_1} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

En la Tabla 3.13 se muestran los resultados obtenidos en plasma de rata, perro y humano.

Tabla 3.13. Resultados correspondientes al cálculo del límite de detección (c_L , ng/ml) de la cianamida en plasma de rata, perro y humano.

Parámetro	Plasma		
	Rata	Perro	Hombre
$R_B + 3s_B$	397961.3 + 697516.4	439358.2 + 866686.0	1.6789 + 1.9242
b_1	27330.24	26072.86	0.1994
c_L	25.52	33.24	9.65

f) Recuperación

El porcentaje de recuperación de la cianamida en plasma de rata, perro y humano, se ha estudiado para los estándares de 50, 100 y 200 ng/ml en plasma, respecto a soluciones de referencia de la misma concentración de cianamida preparadas en tampón carbonato-bicarbonato 0.2 M y pH 9.0 que se analizan directamente después de su dansilación, sin pasar por el proceso de extracción con acetato de etilo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.14. No se han detectado diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de recuperación de los 3 niveles de concentración ensayados, para ninguna de las tres especies estudiadas.

Tabla 3.14. Valores medios \pm DE ($n=3$) de los % de recuperación hallados para los estándares de 50, 100 y 200 ng/ml de cianamida en plasma de rata, perro y humano.

Concentración (ng/ml)	% Recuperación Valor medio \pm DE		
	Rata	Perro	Hombre
50	26.34 \pm 2.90	43.43 \pm 5.12	46.85 \pm 6.30
100	26.23 \pm 13.75	36.34 \pm 3.70	46.93 \pm 5.10
200	22.75 \pm 5.98	51.22 \pm 2.16	60.38 \pm 7.22

3.5.2. Determinación de la actividad de la aldehídoeshidrogenasa en hematíes

La determinación de la actividad de la aldehídoeshidrogenasa en hematíes, sólo se ha llevado a cabo en muestras de sangre humana. Cabe destacar que aunque se habla de actividad de la ALDH en hematíes, ésta se determina en sangre total. De hecho, la actividad de la ALDH se halla en eritrocitos, leucocitos y plaquetas (Rawles y col., 1987), sin embargo la relación leucocitos/eritrocitos en sangre es 1/800, luego la actividad en sangre total es prácticamente toda (98-99 %) debida a eritrocitos (Helander y Tottmar, 1986; Helander y Tottmar, 1988).

3.5.2.1. Preparación de las muestras

La preparación de las muestras para luego poder determinar la actividad de la aldehídoeshidrogenasa, se ha realizado de acuerdo con el procedimiento ya descrito en el apartado 3.5.1.1.2.

3.5.2.2. Preparación de las soluciones para el ensayo

a) Solución reguladora de pirofosfato sódico 42.5 mM (pH 8.8)

9.44 g de pirofosfato sódico, exactamente pesados, se disponen en un matraz aforado de 500 ml de capacidad y se enrasa hasta el volumen final con agua bidestilada. Seguidamente se ajusta el pH a 8.8 con ácido clorhídrico 1 N.

b) Solución de NAD

Se disuelven 25.35 mg de NAD, exactamente pesados, en 15 ml de solución reguladora de pirofosfato sódico 42.5 mM, pH 8.8.

c) Solución de bisulfito sódico 10 mM

Se prepara 5 mM en disulfito sódico y al diluir 5 veces en el incubado de membranas mitocondriales quedará 1 mM en disulfito que equivale a 2 mM en bisulfito.

d) Solución de Dopamina 1 mM

Se prepara 5 mM de forma que quedará 1 mM por dilución 1:5 en el incubado de membranas mitocondriales. Para ello se disuelven 23.5 mg de dopamina en 25 ml de solución de bisulfito sódico.

e) Solución reguladora de fosfato potásico 50 mM pH 7.5

Solución A

Se depositan 17.418 g de K_2HPO_4 , exactamente pesados, en un matraz aforado de 1000 ml de capacidad, enrasando hasta el volumen final con agua bidestilada.

Solución B

Se depositan 13.609 g de KH_2PO_4 , exactamente pesados, en un matraz aforado de 1000 ml de capacidad, enrasando hasta el volumen final con agua bidestilada.

41 ml de la solución A y 9 ml de la solución B, se diluyen hasta un volumen final de 100 ml con agua bidestilada, obteniéndose así la solución reguladora de fosfato potásico 50 mM, pH 7.5. Finalmente, se comprueba el pH.

f) Solución reguladora de fosfato potásico 10 mM, pH 7.5

Se disponen 10 ml, exactamente medidos, de la solución anteriormente preparada en un matraz aforado de 50 ml de capacidad y se enrasa hasta el volumen final con agua bidestilada.

g) Solución de sacarosa 0.25 M

Se disponen 85.58 g de sacarosa, exactamente pesados, en un matraz de 1000 ml de capacidad, enrasando hasta el volumen final con agua bidestilada.

h) Solución de bisulfito de 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL)

El DOPAL se obtiene enzimáticamente a partir de dopamina, según el procedimiento descrito por Petterson y Tottmar (Petterson y Tottmar, 1982). Dicha metódica se basa en la oxidación de dopamina por la MAO (monoaminooxidasa) de membrana mitocondrial de hígado de rata.

Obtención de los extractos de membrana mitocondrial hepática

El método de fraccionamiento utilizado ha sido el propuesto por Tottmar y col. (Tottmar y col., 1973). Se extraen los hígados de ratas recién sacrificadas por descerebración y decapitación posterior y se perfunden con solución isotónica de sacarosa (0.25 M), por punción en la vena porta con una aguja hipodérmica conectada al recipiente que contiene la solución isotónica y corte de la vena cava para eliminar el líquido de perfusión. El lavado se prolonga hasta conseguir eliminar totalmente los restos de sangre. Trás eliminar las adherencias grasas y restos de tejido conectivo, los hígados se congelan a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ mientras no se efectue la separación de las fracciones subcelulares. Llegado el momento, se descongelan y se trocean, manteniéndolos en un baño hielo-agua. Para la obtención de la fracción mitocondrial se procede según el esquema de la Figura 3.9.

Las mitocondrias de hígado de rata así obtenidas, se resuspenden en 20 ml de una solución tampón de fosfato potásico 10 mM pH 7.5, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora. Luego se sonicán para conseguir su rotura a intervalos de 1 minuto durante 3 minutos, deteniendo la sonicación unos 30 segundos entre cada uno de dichos intervalos. Las membranas mitocondriales se aíslan por centrifugación a $26000 \times g$ durante 2 horas. El "pellet" obtenido se resuspende y se lava tres veces y luego se resuspende en unos 5 ml de tampón fosfato potásico 10 mM pH 7.5. Se determina la concentración de proteína en dicho volumen por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y luego se calcula el

volumen a añadir para conseguir una concentración de proteína de aproximadamente 50 mg/ml.

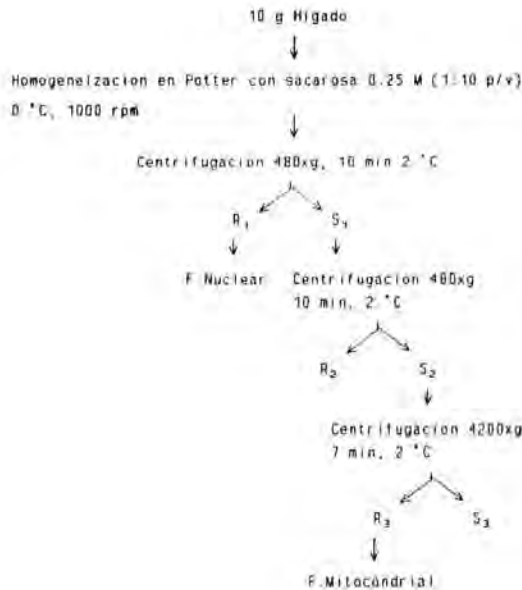


Figura 3.9. Reproducción esquemática de la obtención de la fracción mitocondrial de hígado de rata.

Oxidación de dopamina por la MAO de membrana mitocondrial

1 ml de la preparación de membrana mitocondrial, se incubaba a 30 °C y durante 3 horas, en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5, en presencia de dopamina (1 mM) y bisulfito sódico (2 mM) hasta un volumen final de 50 ml. Este se adiciona a la mezcla de reacción para evitar la formación de productos secundarios coloreados y mejorar el rendimiento de la misma. Tras la incubación, la mezcla se centrifuga a 38000 g durante 30 minutos. La solución de la forma bisulfítica del aldehído así obtenida, se utiliza para la determinación de la actividad de la aldehído deshidrogenasa, sin

Material y Métodos

más purificación. El rendimiento de la reacción en lo que respecta a concentración de DOPAL formado, se comprueba mediante una lectura espectrofotométrica del NADH formado en el transcurso de la reacción de 0.1 ml de la solución bisulfítica de DOPAL con 0.5 ml NAD (2.5 mM) en presencia de 1.9 ml de pirofosfato sódico 42 mM (pH 8.8) y 25 μ l de preparado de ALDH, a una longitud de onda de 340nm ($\tau = 6.22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

i) Solución de ácido perclórico al 16.8 % - bisulfito sódico 30 mM

Se disponen, exactamente medidos, 2.8 ml de la solución de HClO_4 al 60% (p/v) en un matraz aforado de 100 ml de capacidad, enrasando hasta el volumen final con agua bidestilada.

Se toman, exactamente pesados, 0.143 g de disulfito sódico y se disuelven hasta un volumen final de 50 ml en la solución de ácido perclórico al 16.8 %

j) Solución Metanol/ citrato sódico 50 mM - EDTA 0.002 % -octilsulfato sódico 45 mg/l (10/90) pH 2.5

Se disponen en un matraz aforado de 2000 ml de capacidad, 29.4 g de citrato sódico. $2\text{H}_2\text{O}$, 40 mg de EDTA, 90 mg de octilsulfato sódico, enrasando hasta el volumen final con agua bidestilada. Se mezclan 1800 ml de dicha solución con 200 ml de metanol ajustando el pH a 2.5, con ácido sulfúrico concentrado, antes del enrase.

3.5.2.3. Preparación de las soluciones patrón

Se preparan soluciones estándar de DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacético) cuya adición a muestras de sangre hemolizada blanco, tal como se describe en el apartado 3.5.2.4, permite disponer de una recta de calibración en la cual se interpolarán los valores de concentración de DOPAC hallados

en las muestras problema, obtenidas a distintos tiempos después de la administración de la cianamida a los voluntarios. A partir de las concentraciones de DOPAC analizadas, se determinará la actividad de la aldehído-deshidrogenasa en cada una de las muestras, de acuerdo con lo descrito también en el apartado 3.5.2.4. El procedimiento seguido es el que se expone a continuación:

11.5 mg de DOPAC, exactamente pesados, se disuelven en 25 ml de tampón pirofosfato sódico 42.5 mM pH 8.8 (Solución A: 2.74 mM). 1 ml de la solución anterior se deposita en un matraz aforado de 50 ml de capacidad, enrasando hasta el volumen final siempre con la misma solución reguladora de pirofosfato sódico (Solución B: 54.7 μ M). A partir de la solución B se efectúan las siguientes diluciones en tampón pirofosfato sódico:

- 1:2, obteniéndose una solución de concentración 27.35 μ M
- 1:4, obteniéndose una solución de concentración 13.68 μ M
- 1:8, obteniéndose una solución de concentración 6.84 μ M

3.5.2.4. Descripción del método analítico

La metódica analítica utilizada para la determinación de la actividad del enzima en sangre es la descrita por Helander y Tottmar (Helander y Tottmar, 1987). Dicha técnica se basa en la determinación de la actividad metabólica de la aldehído-deshidrogenasa por incubación de muestras de sangre hemolizadas con el aldehído derivado de la dopamina, es decir DOPAL (3,4-dihidroxifenilacetaldehído), en solución reguladora de pirofosfato sódico 42.5 mM (pH 8.8) y en presencia de NAD y de EDTA; la presencia de EDTA en el medio de incubación evita cualquier posible oxidación no enzimática del sustrato. La desaparición del DOPAL, así como la aparición del DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacético) formado, se cuantifican mediante una metódica de cromatografía líquida de alta eficacia con detección electroquímica, procediéndose de acuerdo con las siguientes etapas:

3.5.2.4.1. Reacción de obtención de DOPAC a partir de DOPAL

Estándars de la recta de calibración

Las muestras de sangre basales, ya hemolizadas, se diluyen en una proporción 1:20, depositando 25 μ l de sangre hemolizada, exactamente medidos, en 5 tubos de centrífuga, y añadiendo a continuación 475 μ l de solución reguladora de pirofosfato sódico 42.5 mM (pH 8.8) a cada uno de ellos. Seguidamente se adicionan 0.5 ml del mismo tampón pirofosfato y 0.5 ml de solución de NAD. Después de agitar la mezcla durante unos segundos en vortex, ésta se preincuba durante 5 minutos a 37 °C. Seguidamente se añade 1 ml de tampón pirofosfato y de soluciones patrón de DOPAC de concentraciones 54.7, 27.35, 13.68 y 6.84 μ M a los distintos tubos, para obtener los estándares de la recta de calibración de concentraciones 0, 18.23, 9.12, 4.56 y 2.28 μ M, respectivamente. La adición se efectúa en un intervalo de tiempo de 30 segundos, y se agita de nuevo en vortex. Se incuba durante 15 minutos a 37 °C, y luego se añaden de forma progresiva a intervalos de 30 segundos 0.5 ml de la mezcla de ácido perclórico al 16.8 % conteniendo bisulfito sódico 30 mM, tal y como se procede con las muestras problema, retirando a la vez las muestras del baño. Transcurridos 15 minutos, las muestras se centrifugan a 15000 rpm durante 10 minutos, mediante la centrífuga SORVALL RC-5B ya descrita en el apartado 3.4.1.2. El sobrenadante de cada una de ellas, se filtra a través de filtros Millipore de 0.45 μ m, recogiendo el filtrado directamente en viales de Wisp de 4 ml de capacidad, para su posterior inyección en el cromatógrafo.

Muestras problema

Las muestras problema hemolizadas, se diluyen también en solución reguladora de tampón pirofosfato 42.5 mM (pH 8.8) en una proporción 1:20 y luego se añaden 1.35 ml de la misma solución reguladora y 0.5 ml de NAD. Trás agitación en vortex, las muestras se preincuban durante 5 minutos

a 37 °C. Seguidamente se añaden 0.15 ml de DOPAL a tiempo controlado (en 30 segundos) agitando de nuevo. Se deja transcurrir la reacción de formación de DOPAC durante 15 minutos y luego se detiene por adición de 0.5 ml de la mezcla de ácido perclórico al 16.8 % - bisulfito sódico 30 mM, que fija el exceso de DOPAL, retirando las muestras del baño y agitando en vortex. Al cabo de 15 minutos se procede igual que con las muestras patrón, es decir se centrifuga a 15000 rpm durante 10 minutos y se filtra el sobrenadante a través de filtros de 0.45 μm .

3.5.2.4.2. Valoración

La determinación analítica se efectúa mediante el cromatógrafo líquido de alta resolución descrito en el párrafo 3.4.1.2.

El volumen de muestra inyectado es de 10 μl .

Las condiciones cromatográficas empleadas son las siguientes:

- Flujo 1.0 ml/min
- Detección electroquímica (Potencial: +0.80 V, Range Switch: 50 nA, Integrador: 500 mV).
- Presión 2000 psi
- Velocidad del papel 5 cm/min
- Anchura de pico 40
- Supresión ruido de fondo 200
- Fase móvil: Metanol /citrate sódico 50 mM, EDTA 0.002 %, octil-sulfato sódico 45 mg/l (10/90) , pH final 2.5

El método de cuantificación utilizado fue el del estándar externo, puesto que no fue posible hallar un estándar interno que cumpliera con los requisitos de ausencia de solapamiento entre picos y suficiente sensibilidad al mismo tiempo.

Los eluyentes que han de pasar por la columna se filtran a través de los filtros de membrana adecuados y se desgasifican en un baño de ultrasonidos:

- Metanol: filtro de membrana tipo FH de 0.5 μm (Millipore).
- Agua destilada y solución citrato sódico/EDTA/octilsulfato: filtro de membrana tipo MF de 0.45 μm (Millipore).

En las Figuras 3.10 y 3.11 se reflejan los cromatogramas correspondientes a una muestra de sangre blanco de voluntario n° 6 y a una muestra patrón 8.6 μM de DOPAC confeccionada con sangre del mismo voluntario, respectivamente.

En las Figuras 3.12 y 3.13 se muestran los cromatogramas correspondientes a las muestras problema, extraídas 8 h después de la administración intravenosa de placebo y de 0.6 mg/kg de cianamida al voluntario n° 6, respectivamente.

En dichas Figuras se distinguen perfectamente las señales cromatográficas debidas al DOPAL en exceso, y DOPAC formado, por acción de la ALDH. En ellas se refleja el efecto inhibitor de la ALDH por parte de la cianamida, siendo el área del pico correspondiente al DOPAC formado mayor tras la administración de placebo que tras la administración de la cianamida.

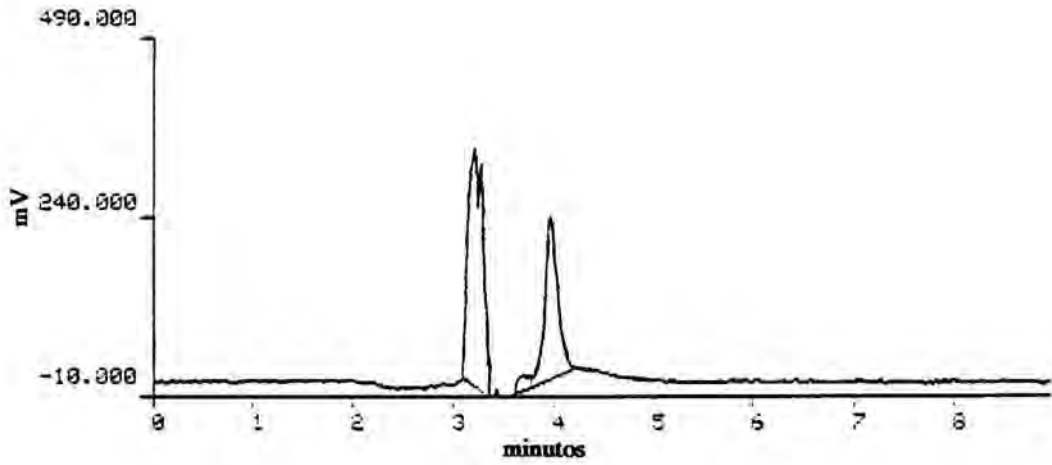


Figura 3.10. Cromatograma correspondiente a una muestra de sangre basal del voluntario n° 6.

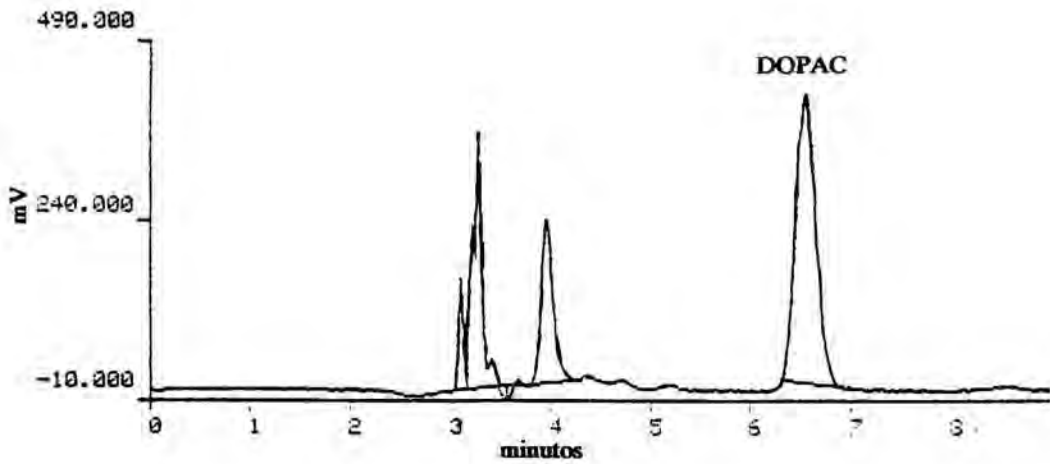


Figura 3.11. Cromatograma correspondiente a una muestra patrón 8.6 μM de DOPAC en sangre del voluntario n° 6.

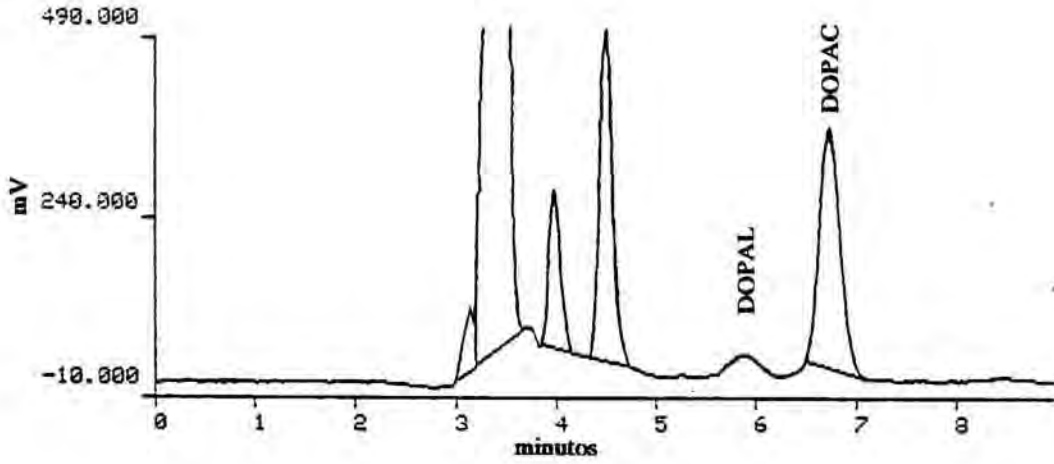


Figura 3.12. Cromatograma correspondiente a una muestra problema extraída 8 horas después de la administración intravenosa de placebo al voluntario n° 6.

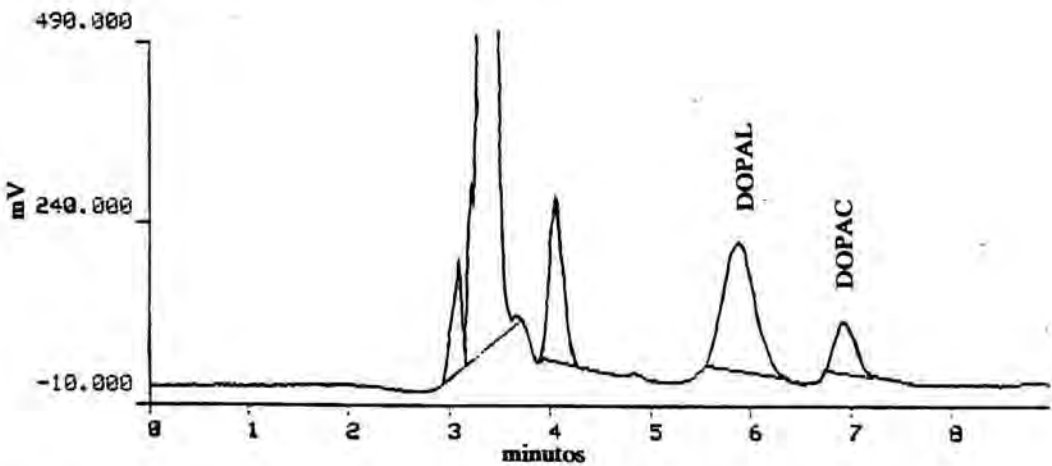


Figura 3.13. Cromatograma correspondiente a una muestra problema extraída 8 horas después de la administración intravenosa de 0.6 mg/kg de cianamida al voluntario n° 6.

3.5.2.4.3. Validación de la metódica analítica

Con objeto de validar la metódica analítica para la determinación del DOPAC formado en muestras de sangre de voluntarios sanos, en nuestras condiciones experimentales, se han confeccionado, en días distintos, 5 rectas de calibración con estándares de DOPAC de concentraciones 2.28, 4.56, 9.12 y 18.23 μM , tal como se ha indicado en el apartado 3.5.2.4. a). Se han realizado las correspondientes determinaciones cuantitativas, según lo descrito en el apartado 3.5.2.4. b), y seguidamente se ha estudiado:

- La reproducibilidad en los tiempos de retención del DOPAC.
- La existencia de linealidad en el ámbito de concentraciones ensayado.
- La exactitud de la técnica analítica y la precisión de la misma, puestas de manifiesto por los valores del error relativo y del coeficiente de variación porcentual, respectivamente, para cada una de las concentraciones ensayadas.

Los resultados son los que a continuación se exponen:

a) Tiempo de retención y reproducibilidad

El valor medio \pm DE (n=20) de los tiempos de retención del DOPAC en los estándares de calibración confeccionados con sangre de voluntarios sanos ha sido de 6.95 ± 0.34 minutos.

b) Linealidad

El ajustado de los valores de respuestas analíticas, en nuestro caso áreas de pico, frente a concentraciones de DOPAC en sangre, se ha efectuado por el método de regresión lineal simple, mediante el programa Rectest (Segura, 1985).

Material y Métodos

Tras un análisis de varianza de una vía previa comprobación de la homogeneidad de variancias (test de Barlett) y consecutivamente un test de comparación múltiple (test de Scheffé) entre los valores de la relación respuesta/concentración (ratio) a las diferentes concentraciones estudiadas, las variancias fueron homogéneas ($p=0.348$), habiéndose observado diferencias estadísticamente significativas entre los valores del ratio del estándar de concentración más elevada ($18.23 \mu\text{M}$) y los estándares de concentraciones 4.56 y $2.28 \mu\text{M}$ ($p < 0.05$).

Por otra parte, la ordenada en el origen de la recta de calibración confeccionada con los estándares de DOPAC ($2.28 - 18.23 \mu\text{M}$) no ha resultado ser estadísticamente distinta de cero ($t=-2.70$, $\phi=2$, $p > 0.1$).

A juzgar por los resultados obtenidos, se puede afirmar que existe linealidad en el ámbito de concentraciones de $2.28 - 9.12 \mu\text{M}$, y este ha sido el intervalo considerado a efectos de cálculo de las concentraciones de DOPAC en las muestras problema.

c) Exactitud y precisión

Para cada una de las concentraciones se ha calculado el error relativo y el coeficiente de variación porcentual. En la Tabla 3.15 se presentan los valores de concentración de DOPAC determinados frente a los valores teóricos, así como los valores medios, las desviaciones estándar, los errores relativos y los coeficientes de variación porcentual resultantes.

Los valores de error relativo obtenidos ($< 8\%$) permiten calificar la técnica analítica empleada en la determinación del DOPAC en sangre humana, como suficientemente exacta en el ámbito de concentraciones ensayadas ($2.28 - 18.23 \mu\text{M}$). Del mismo modo, esta metódica resultó ser aceptablemente precisa puesto que se obtuvieron coeficientes de variación porcentual también inferiores al 8% .

Tabla 3.15. Concentraciones de DOPAC halladas en muestras de sangre humana, respecto a las concentraciones teóricas añadidas con sus correspondientes valores medios, desviaciones estándar, coeficientes de variación porcentual y errores relativos porcentuales.

Recta n°	Concentración (μM)			
	2.28	4.56	9.12	18.23
1	2.31	4.19	8.31	17.13
2	2.33	4.20	8.26	17.15
3	2.22	4.34	8.24	17.14
4	2.63	4.11	8.99	18.15
5	2.57	4.45	8.59	18.27
\bar{x}	2.41	4.26	8.48	17.57
DE	0.18	0.14	0.32	0.59
CV(%)	7.37	3.18	3.76	3.34
$E_r(\%)$	5.79	-6.62	-7.04	-3.63

3.5.2.4.4. Determinación de la concentración de hemoglobina

El procedimiento utilizado es el descrito por Boehringer (International Committee for standardization in haematology of the European Society of haematology, 1965), que no es más que el método estándar recomendado para la determinación fotométrica de la cianometahemoglobina.

Análogamente a la determinación de la actividad de la ALDH, se toman 25 μl de cada una de las muestras de sangre problema y se adicionan sobre 5 ml de reactivo para la determinación de hemoglobina. Se deja transcurrir la reacción y luego se efectúa una lectura espectrofotométrica a 540 nm. El contenido en hemoglobina se calcula a partir de la Ecuación 3.4.

$$C_{Hb} = \frac{DO^{540} \cdot PM}{\epsilon_{HICN} \cdot d \cdot 10} \quad \text{Ecuación 3.4}$$

siendo,

C_{Hb} = mg de Hemoglobina presentes en 100 ml de sangre.

ϵ_{HICN} = Coeficiente de extinción mM de la cianometahemoglobina, $44 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

PM = Peso molecular de la cianometahemoglobina, 64458 g.

DO^{540} = Densidad óptica de la solución de cianometahemoglobina a 540 nm.

d = Longitud de la cubeta, 1 cm.

3.5.2.4.5. Cálculos

La actividad de la aldehídoeshidrogenasa puede expresarse como nmoles de DOPAC formado por unidad de tiempo (h) y por mg de proteína o quizás mejor por mg de hemoglobina, puesto que tal como ya se ha comentado, en el hombre la actividad de la ALDH en sangre total es casi exclusivamente debida a la actividad presente en eritrocitos (Helander y Tottmar, 1986).

Para dicho cálculo, se parte de los valores de concentración de DOPAC de cada una de las muestras en $\mu\text{moles/l}$ o lo que es lo mismo en nmoles/ml. La cantidad de DOPAC formado por unidad de tiempo (h) y por mg de Hemoglobina, vendrá dado por la Ecuación 3.5.

$$Q_{DOPAC} = \frac{C_{DOPAC} \cdot V_1}{t_1 \cdot C_{Hb} \cdot V_2} = \frac{C \cdot 48000}{t_1 \cdot C_{Hb}} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

expresada en unidades de $\text{nmoles} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Hb}^{-1}$

siendo,

Q_{DOPAC} = nmoles de DOPAC formados por mg de Hemoglobina y por hora.

C_{DOPAC} = Concentración de DOPAC en nmoles/ml.

V_1 = Volumen final de la muestra problema en la que se determina DOPAC, 3 ml.

t_1 = Tiempo de incubación de las muestras, 0.25 h.

C_{Hb} = mg de Hemoglobina en 100 ml de sangre.

V_2 = Volumen de muestra de sangre en la que se determina el contenido en Hemoglobina, 0.025 ml.

Los porcentajes de inhibición (%I) de la actividad del enzima debida a la cianamida a los distintos tiempos (t_i) después de la administración del fármaco, se determinan a partir de la Ecuación 3.6.

$$\% I = 100 - \frac{Q_{DOPAC_i}}{Q_{DOPAC_0}} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

siendo,

Q_{DOPAC_i} = nmoles de DOPAC formados por mg de Hemoglobina y por hora en el tiempo i.

Q_{DOPAC_0} = nmoles de DOPAC formados por mg de Hemoglobina y por hora en el tiempo cero, previo a la administración del fármaco.

3.6. TRATAMIENTO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

3.6.1. ESTUDIO FARMACOCINETICO

La Farmacocinética utiliza dos aproximaciones distintas para el análisis y tratamiento de los datos experimentales con el fin de estimar los principales parámetros farmacocinéticos. En la primera aproximación se hace uso de diversos modelos físicos que pretenden explicar el tránsito del fármaco en el organismo a partir de sus ecuaciones representativas. Los distintos modelos que pueden plantearse en estudios farmacocinéticos son, entre otros, modelos compartimentales que utilizan funciones polioxponenciales, modelos no lineales que utilizan funciones hiperbólicas, o bien modelos fisiológicos que se basan en un sistema diferencial de balance de masa (Martinez-Lanao y Dominguez-Gil, 1987). Los modelos compartimentales basados en sistemas físico-químicos de transferencia de materia regidos por unas determinadas constantes de velocidad constituyen los modelos más clásicos y más ampliamente utilizados en el estudio cinético de los fármacos en el organismo. Esta aproximación es modelo dependiente y requiere la discriminación y selección entre los modelos ensayados.

Existe otro tipo de aproximación para el tratamiento de los datos experimentales que no requiere la discriminación de un modelo farmacocinético concreto para la estima de los principales parámetros farmacocinéticos; dicha aproximación se denomina incorrectamente modelo-independiente ya que, como se verá más adelante, para llevar a cabo esta aproximación se requiere asumir un determinado proceso cinético de eliminación.

El hecho de que la estimación de los parámetros farmacocinéticos se realice de forma más simple mediante la aproximación no compartimental, nos ha llevado a considerar esta, en primer lugar, para el tratamiento de nuestros datos experimentales, por cuyo motivo se detalla primero lo referente a dicha

aproximación y a continuación se expone la filosofía y metodología de obtención de dichos parámetros a través del análisis compartimental.

3.6.1.1. Aproximación no compartimental

La Farmacocinética dispone de métodos de tratamientos de datos y obtención de parámetros farmacocinéticos que no precisan del análisis compartimental en lo que se refiere a la discriminación de un modelo concreto y que, por consiguiente, no se hallan limitados por las exigencias teóricas del modelo ni por el ajustado del mismo a los datos experimentales.

3.6.1.1.1. Bases del tratamiento farmacocinético utilizado en la aproximación no compartimental.

La finalidad de cualquier tratamiento farmacocinético es la de obtener a partir de los datos experimentales, los principales parámetros farmacocinéticos representativos del curso del fármaco en el organismo. La aproximación no compartimental requiere en primer lugar asumir un orden cinético para la fase de disposición terminal, en general, asumiendo que el fármaco posee un comportamiento farmacocinético lineal, la fase de disposición terminal de las curvas de niveles plasmáticos se considera de primer orden.

La determinación de la constante de la fase de disposición terminal se suele efectuar por regresión lineal semilogarítmica entre aquellos pares de valores tiempo/concentración que delimitan dicha fase; la pendiente de dicha recta representada por la Ecuación 3.7, es la constante de la fase de disposición terminal. La decisión de que puntos delimitan la fase monoexponencial terminal no deja de estar sujeta a un cierto grado de subjetividad.

$$\ln C = - \beta \cdot t + \ln C_0$$

Ecuación 3.7

Conocida la constante de la fase de disposición terminal se puede determinar la semivida biológica de acuerdo con la Ecuación 3.8

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\beta} \qquad \text{Ecuación 3.8}$$

La determinación del área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) se realiza en dos fases de acuerdo con lo expuesto en la Ecuación 3.9.

$$AUC_0^\infty = AUC_0^t + AUC_t^\infty \qquad \text{Ecuación 3.9}$$

La primera fase comporta el area bajo la curva desde el tiempo cero hasta el tiempo correspondiente al último tiempo experimental de toma de muestra ($AUC_{0,t}$). La segunda fase comprende la estimación del área bajo la curva desde el tiempo correspondiente al último tiempo experimental hasta infinito ($AUC_{t,\infty}$).

La determinación del valor de $AUC_{0,t}$ se suele realizar mediante uno de los métodos de integración numérica que detallamos a continuación:

- Método trapezoidal.
- Método logotrapezoidal.
- Método mixto.
- Método de Lagrange.
- Método de los esplines.
- Método de Yeh y col.

Todos ellos utilizan funciones polinómicas para el cálculo del área bajo la curva de niveles plasmáticos.

El método trapezoidal lineal realiza el cálculo considerando en cada intervalo de tiempo el área de un trapecio delimitado por los tiempos del

intervalo (t_{i-1} y t_i) y las correspondientes concentraciones experimentales de fármaco (C_{i-1} y C_i), de acuerdo con la Ecuación 3.10. La suma de las áreas de cada trapecio obtenido hasta el último tiempo experimental permite conocer el valor de AUC_{0-t} . Dicho método subestima el área durante la fase de absorción en el caso de una administración extravasal, o bien en la fase ascendente en el caso de una infusión intravenosa, mientras que la sobreestima en la fase descendente.

$$[AUC_{in}]_{t_{i-1}}^{t_i} = [t_i - t_{i-1}] \cdot \left[\frac{C_i + C_{i-1}}{2} \right] \quad \text{Ecuación 3.10}$$

El segundo método, conocido como método logotrapezoidal, utiliza la transformación logarítmica entre cada par de concentraciones, partiendo de las siguientes consideraciones:

$$AUC_{t_{i-1}}^{\infty} = \frac{C_{i-1}}{K} \quad \text{Ecuación 3.11}$$

$$AUC_{t_i}^{\infty} = \frac{C_i}{K} \quad \text{Ecuación 3.12}$$

$$AUC_{t_{i-1}}^{t_i} = AUC_{t_{i-1}}^{\infty} - AUC_{t_i}^{\infty} = \frac{C_{i-1} - C_i}{K} \quad \text{Ecuación 3.13}$$

Puesto que el valor de K puede estimarse a partir de la pendiente entre t_{i-1} y t_i de acuerdo con la Ecuación 3.14,

$$K = \frac{\ln C_{i-1} - \ln C_i}{t_i - t_{i-1}} \quad \text{Ecuación 3.14}$$

el valor del área bajo la curva en el intervalo comprendido entre t_{i-1} y t_i vendrá dado por la Ecuación 3.15.

$$AUC_{t_{i-1}}^{t_i} = \frac{C_{i-1} - C_i}{\frac{\ln C_{i-1} - \ln C_i}{t_i - t_{i-1}}} = \frac{C_{i-1} - C_i}{\ln C_{i-1} - \ln C_i} \cdot (t_i - t_{i-1})$$

Ecuación 3.15

Sumando los valores obtenidos para cada uno de los intervalos considerados hasta el último tiempo experimental, se obtiene el valor de AUC_{0-t} por el método logotrapezoidal. Dicho método es quizás más apropiado cuando los niveles plasmáticos decaen de forma exponencial, puesto que utiliza para cada intervalo la pendiente específica del mismo. Sin embargo puede dar lugar a estimaciones erróneas en la parte ascendente de la curva o cerca de la concentración máxima. Tampoco puede utilizarse cuando la concentración es cero o bien si los valores de concentración de los tiempos consecutivos considerados dentro del intervalo son iguales. A pesar de dichas limitaciones, ambos métodos (trapezoidal y logotrapezoidal) pueden utilizarse de forma combinada para obtener soluciones óptimas (Gouyette, 1983). Así pues el método mixto utiliza la aproximación trapezoidal en la fase ascendente y la aproximación logotrapezoidal en la fase descendente.

El método de Lagrange (Rocci y Jusko, 1983) no utiliza una interpolación lineal, sino una interpolación polinómica cúbica entre cada par de concentraciones experimentales que suministra mayor precisión en la estimación de AUC.

El método de los esplines (Yeh, y Kwan, 1978), utiliza esplines cúbicos; dicho método podría considerarse como uno de los métodos menos distorsionables cuando se utiliza en combinación con el método logotrapezoidal.

El método de Yeh y col. (Yeh y col., 1987) propuesto más recientemente, es un método de interpolación que utiliza funciones polinómicas cúbicas a partir

de tres puntos adyacentes y evita las oscilaciones que se observan en determinados casos con el método de los esplines.

De todos los métodos citados los más utilizados son el método trapezoidal, el logotrapezoidal y el mixto. La razón de ello es su mayor sencillez desde un punto de vista matemático, y además la mayor complejidad de cálculo no supone, en la inmensa mayoría de las veces, una mejoría significativa en la mayor exactitud de la estimación del valor de AUC_{0-t} . Por otra parte, se trata de métodos adecuados cuando lo que se pretende es comparar valores de AUC de datos experimentales con formas similares y procedentes de esquemas de muestreo parecidos.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el método más apropiado para la estimación del valor de AUC_{0-t} correspondiente a una curva de niveles plasmáticos obtenida tras la administración de un fármaco en bolus intravenoso, es el método logotrapezoidal y en este caso se deberá calcular el valor de C_0 por extrapolación. En general en el caso de una aproximación no compartimental el valor de C_0 suele estimarse por extrapolación de la recta semilogarítmica estimada con los 2 o 3 primeros pares de valores tiempo/concentración.

La determinación de $AUC_{t-\infty}$ se realiza mediante la Ecuación 3.16 en la que C_t es la concentración interpolada en la recta de regresión semilogarítmica de la fase monoexponencial terminal, correspondiente al último tiempo de toma de muestras. El porcentaje de área extrapolada determinado de este modo no debería ser superior al 20 % del área total, luego será conveniente sacar el máximo número de muestras para que el área extrapolada sea mínima, aunque ello también vendrá condicionado por el límite de cuantificación de la metódica analítica utilizada.

$$AUC_t^{\infty} = \frac{C_t}{\beta}$$

Ecuación 3.16

La determinación del aclaramiento plasmático (Cl) se realiza por aplicación directa de la Ecuación 3.17 en la que D es la dosis administrada y F la biodisponibilidad en magnitud (cuando se trata de una administración por vía intravenosa el valor de F es la unidad).

$$Cl = \frac{F \cdot D}{AUC} \qquad \text{Ecuación 3.17}$$

Para la determinación del volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario Vd_{ss} se requiere determinar previamente el tiempo medio de residencia (MRT) o tiempo medio durante el cual las moléculas de fármaco permanecen inalteradas en el organismo, tras una administración en bolus intravenoso del mismo.

El concepto de MRT se basa en la aplicación de la teoría de los Momentos estadísticos propuesta por Yamaoka y col. (Yamaoka y col., 1978b). Dicha teoría se basa en que el tránsito del fármaco en el organismo es un proceso estocástico, estando regido el movimiento individual de las moléculas de fármaco por una función de probabilidad, puesto que no todas son metabolizadas o excretadas al mismo tiempo. En consecuencia puede considerarse el tiempo medio de residencia del fármaco en el organismo como resultado de una distribución de frecuencias, con sus correspondientes valores de media y varianza asociados, que pueden ser estimados a partir de la utilización de tres momentos estadísticos. Así pues, Yamaoka y col. (Yamaoka y col., 1978b) y Cutler (Cutler, 1978) hablan del momento estadístico de orden cero o área bajo la curva de niveles plasmáticos ($AUC_{0-\infty}$), definida por la Ecuación 3.18, y cuya metodología de cálculo desde el punto de vista de la aproximación no compartimental ya ha sido expuesta en los párrafos anteriores.

$$AUC_{0-\infty} = \int_0^{\infty} C \cdot dt \qquad \text{Ecuación 3.18}$$

El valor del tiempo medio de residencia (MRT), viene dado por la Ecuación 3.19,

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC} \quad \text{Ecuación 3.19}$$

en la que AUMC es el área bajo la curva de los valores t.C respecto al tiempo o área bajo la curva del primer momento, tal como se observa en la Ecuación 3.20.

$$AUMC = \int_0^{\infty} t \cdot C \cdot dt \quad \text{Ecuación 3.20}$$

Para la determinación de AUMC se procede como en el caso de AUC en dos fases: integración numérica del área comprendida entre 0 y el último tiempo experimental (t) utilizando cualquiera de los métodos enunciados, siendo de nuevo los más utilizados el trapezoidal (Ecuación 3.21) y el logotrapezoidal (Ecuación 3.22) y determinación del área comprendida entre t e infinito mediante la Ecuación 3.23.

$$AUMC_0^t = \sum AUMC_{t_{i-1}}^{t_i} = \sum_{i=1}^n (t_i - t_{i-1}) \cdot \frac{(C_i \cdot t_i + C_{i-1} \cdot t_{i-1})}{2}$$

Ecuación 3.21

$$AUMC_0^t = \sum AUMC_{t_{i-1}}^{t_i} = \sum_{i=1}^n (t_i - t_{i-1}) \cdot \frac{(C_i \cdot t_i - C_{i-1} \cdot t_{i-1})}{\ln \frac{C_i}{C_{i-1}}} - \frac{(t_i - t_{i-1})^2 \cdot (C_i - C_{i-1})}{\left[\ln \frac{C_i}{C_{i-1}} \right]^2}$$

Ecuación 3.22

$$\int_t^{\infty} t \cdot C \cdot dt = \frac{t \cdot C_t}{\beta} + \frac{C_t}{\beta^2} \quad \text{Ecuación 3.23}$$

siendo C_t la concentración interpolada en la recta de regresión semilogarítmica de la fase monoexponencial terminal correspondiente al último tiempo de toma de muestras y β la pendiente de la misma. Cabe destacar que la extrapolación de esta fracción siempre es mayor que la correspondiente a la de la curva de concentraciones plasmáticas en función del tiempo por lo que la estimación del AUMC siempre es menos exacta que la del AUC. De hecho el valor de $AUC_{t-\infty}$ debería ser $< 5\%$ para que el valor de $AUMC_{t-\infty}$ fuera $< 20\%$.

El segundo momento de la curva de concentraciones plasmáticas-tiempo (AUMMC) (Ecuación 3.24) se calcula también en dos fases de acuerdo con la Ecuación 3.25 y siguiendo el mismo criterio que en el caso del momento de orden cero y del primer momento bajo la curva, para cada una de estas fases.

$$AUMMC = \int_0^{\infty} t^2 \cdot C \cdot dt \quad \text{Ecuación 3.24}$$

$$AUMMC = AUMMC_0^t + AUMMC_t^{\infty} \quad \text{Ecuación 3.25}$$

En este caso el valor de la fase de extrapolación $AUMMC_{t-\infty}$ viene dado por la Ecuación 3.26.

$$AUMMC_t^{\infty} = \frac{t^2 \cdot C_t}{\beta} + \frac{2 \cdot t \cdot C_t}{\beta^2} + \frac{2 \cdot C_t}{\beta^3} \quad \text{Ecuación 3.26}$$

El valor del AUMMC permite definir la varianza del MRT (VRT) según la Ecuación 3.27.

$$VRT = \frac{AUMMC}{AUC} - MRT^2$$

Ecuación 3.27

Sin embargo, los métodos de estimación numérica de dichos parámetros con los cálculos por extrapolación que dicha estimación conlleva dan lugar a errores totalmente inaceptables, siendo poco fiable la determinación del VRT tal como mencionan Yamaoka y col. (Yamaoka y col., 1978b) y Riegelman y Collier (Riegelman y Collier, 1980).

El valor del volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario se determina a partir de los datos cinéticos después de la administración del fármaco en bolus intravenoso, luego, una vez determinado el valor de MRT puede calcularse dicho parámetro por medio de la Ecuación 3.28.

$$Vd_{ss} = Cl \cdot MRT$$

Ecuación 3.28

La expresión matemática correspondiente a la Ecuación 3.19 es más bien representativa del tiempo necesario para que un grupo de moléculas se elimine del organismo desde el momento de su administración que del tiempo medio en que éstas permanecen en el organismo (Karol, 1990). De hecho lo último sólo es cierto tras la administración de un bolus intravenoso, en que las moléculas de fármaco son introducidas en el organismo a tiempo cero. En los demás casos, el tiempo cero corresponde al momento en que se inicia la administración del fármaco. Por consiguiente cuando la entrada de fármaco en el organismo tiene lugar en un tiempo finito, esto es en el caso de una administración por infusión intravenosa o bien de una administración extravasal, la relación AUMC/AUC equivale a la suma del tiempo medio que tardan las moléculas de fármaco en incorporarse al organismo o tiempo medio de residencia del fármaco en el lugar de la administración (MIT) y del tiempo medio que éstas permanecen en el organismo (MRT), de acuerdo con lo que se indica en la Ecuación 3.29.

$$\left[\frac{AUMC}{AUC} \right] = MIT + MRT_{bolus\ iv} \quad \text{Ecuación 3.29}$$

Puesto que en el caso de la infusión intravenosa de orden cero el valor de MIT equivale al tiempo que dura la infusión (T) dividido por 2, el cálculo del MRT por esta vía de administración que corresponde al valor de la relación AUMC/AUC tras la perfusión, se efectuará de acuerdo con la Ecuación 3.30.

$$MRT_{infusión} = \left[\frac{AUMC}{AUC} \right]_{infusión} = \frac{T}{2} + MRT_{bolus\ iv}$$

Ecuación 3.30

Sin embargo, tras la administración oral del fármaco el valor del MRT_{oral} englobará el tiempo medio de residencia del fármaco en el lugar de administración (MAT) y el tiempo medio de residencia del fármaco en el organismo (MRT) y se calculará a partir de la relación de valores de $AUMC_{oral}$ y AUC_{oral} según la Ecuación 3.31.

$$MRT_{oral} = \left[\frac{AUMC}{AUC} \right]_{oral} = \frac{1}{K_a} + MRT_{bolus\ iv}$$

Ecuación 3.31

Cabe destacar que si el proceso de absorción es de primer orden el valor del MIT en este caso denominado MAT (tiempo medio de absorción) de la Ecuación 3.29 equivale al valor inverso de la constante de absorción K_a .

Perrier y Mayersohn (Perrier y Mayersohn, 1982) han propuesto las ecuaciones alternativas para el cálculo de $V_{d_{ss}}$ cuando el fármaco se administra por infusión intravenosa (Ecuación 3.32) y cuando se administra por vía oral (Ecuación 3.33).

$$Vd_{ss} = Cl \cdot \left(\frac{AUMC}{AUC} - \frac{T}{2} \right) \quad \text{Ecuación 3.32}$$

En la Ecuación 3.32, el valor del cociente AUMC/AUC se corrige sustrayendo el término T/2 para transformarlo en MRT correspondiente a un bolus intravenoso.

Tras la administración oral el cociente AUMC/AUC se corrige por el inverso del valor de la constante de absorción de primer orden K_a y debe considerarse además que se precisa conocer el valor de la biodisponibilidad absoluta en magnitud F para poder determinar el valor de Cl tal como ya se ha expuesto en la Ecuación 3.17.

$$Vd_{ss} = Cl \cdot \left(\frac{AUMC}{AUC} - \frac{1}{K_a} \right) \quad \text{Ecuación 3.33}$$

Mediante una aproximación no compartimental puede también obtenerse información acerca de la velocidad de absorción de un determinado principio activo, para ello uno de los métodos mas asequibles consiste en aplicar la teoría de los momentos estadísticos y determinar el tiempo medio de absorción MAT a partir de los valores de los tiempos medios de residencia obtenidos tras la administración oral e intravenosa por aplicación directa de la Ecuación 3.34.

$$MAT = MRT_{oral} - MRT_{i.v.} \quad \text{Ecuación 3.34}$$

La Ecuación 3.34 permite conocer la velocidad de absorción del fármaco sin hacer ninguna asunción en cuanto a la cinética del proceso de absorción.

La determinación experimental de los valores del nivel plasmático máximo (C_{max}) y del tiempo al que se alcanza C_{max} (T_{max}) permiten obtener una información acerca de la velocidad de absorción válida aunque no exenta de variabilidad. En este caso la precisión y la exactitud de las determinaciones

Material y Métodos

dependerá mayoritariamente del propio diseño experimental, concretamente del número de puntos de que se disponga en los alrededores del nivel máximo que se pretende estimar y de los intervalos entre los mismos.

La determinación de la Biodisponibilidad absoluta en magnitud (F) se efectúa a partir de la relación de valores de áreas bajo la curva de niveles plasmáticos obtenidos tras la administración extravasal e intravenosa de la misma dosis de fármaco. En caso de no administrar la misma dosis de fármaco por ambas vías, dichos valores se normalizan por los correspondientes valores de ésta (Ecuación 3.35).

$$F = \frac{AUC_{ev} / D_{ev}}{AUC_{iv} / D_{iv}} \qquad \text{Ecuación 3.35}$$

La aplicación de la aproximación no compartimental expuesta puede realizarse con escaso esfuerzo ya que existen toda una serie de programas implementados en ordenadores personales que participan perfectamente de esta filosofía (pKCALC (Shumaker, 1986), MKMODEL (Holdford, 1990), SIPHAR (Gomeni, 1991), PCNONLIN (Metzler, 1992) entre otros).

En la presente memoria se ha utilizado el programa pKCALC (Shumaker, 1986) para la estimación de los parámetros farmacocinéticos ya mencionados. En el cálculo de los valores de $AUC_{0,t}$ tanto tras la administración intravenosa del fármaco ya sea en bolus o bien en infusión, como tras la administración oral del mismo se ha aplicado la aproximación trapezoidal.

Por otra parte los valores de MRT obtenidos tras la administración en bolus iv, en infusión iv y oral del fármaco, expuestos en el capítulo de resultados son los proporcionados directamente por el programa para cuyo cálculo a partir de los valores de AUMC y AUC utiliza la aproximación trapezoidal.

Conviene destacar que para el tratamiento de datos obtenidos tras la administración oral del fármaco, dicho programa exige la entrada del valor de

la constante de absorción (K_a), determinada por ejemplo por el método de los residuales, y también el valor de la Biodisponibilidad absoluta (F). Puesto que en nuestro caso se desconoce F , el programa pKCALC proporciona el valor de V_{dss}/F en lugar de V_{dss} .

3.6.1.2. Aproximación compartimental

En la aproximación compartimental del tratamiento de los datos experimentales, una vez obtenida la información sobre la evolución de los niveles de fármaco, habitualmente concentraciones en función del tiempo, en los diferentes fluidos biológicos, debe plantearse el diseño de un modelo biofísico adecuado que permita cuantificar los procesos que tienen lugar.

3.6.1.2.1. Análisis compartimental

El estudio del tránsito del fármaco a través del organismo puede facilitarse mediante un método simplificado que se basa en considerar al organismo dividido en un número mayor o menor de compartimientos abiertos, a los que accede y de los que sale una determinada concentración o cantidad de fármaco por unidad de tiempo, dicho método se conoce como el **análisis compartimental**. Un compartimiento podría definirse como una entidad farmacocinética que puede describirse por un volumen acuoso orgánico definido y una concentración de fármaco contenido en este volumen.

Desde un punto de vista matemático y tal como ya se ha mencionado en párrafos anteriores, estos modelos utilizan sistemas de ecuaciones diferenciales lineales (de primer orden), en que las concentraciones de fármaco, constituyen la variable dependiente que se asume lleva un error asociado y los tiempos la variable independiente no sujeta a error. Estos sistemas de ecuaciones pueden resolverse mediante transformadas de Laplace, obteniéndose ecuaciones integradas de tipo poliexponencial. Cada compartimiento considerado equivale a una nueva exponencial de la ecuación poliexponencial integrada. Por este

Material y Métodos

motivo, el tratamiento matemático de un modelo, compuesto por un número elevado de compartimientos es muy complejo y los modelos generalmente utilizados no sobrepasan la utilización de cuatro compartimientos, siendo los modelos abiertos de uno y dos compartimientos los que se utilizan con mayor frecuencia.

En estos casos el número de compartimientos ya sean externos o bien internos al organismo vendría dado por el número de términos exponenciales que posee la función explícita que rige el tránsito del fármaco en el organismo.

Cabe destacar que este tipo de modelos se plantean generalmente con una filosofía de cinética lineal, aunque no se descarta la posibilidad de que incluyan términos matemáticos que expliquen algún tipo de proceso no lineal implicado en el proceso global.

La utilización de modelos compartimentales comporta una serie de etapas a seguir que se resumen a continuación:

1. Diseñar el experimento
2. Obtener los datos experimentales
3. Seleccionar los modelos preliminares más apropiados y definir sus funciones matemáticas representativas
4. Ajustar la o las diversas funciones matemáticas a los datos experimentales mediante programas apropiados de regresión no lineal
5. Juzgar acerca de la bondad de los ajustados obtenidos
6. Seleccionar el modelo más probable desde el punto de vista cinético o estadístico
7. Obtener los parámetros farmacocinéticos a partir de la función de ajuste a los datos experimentales representativa del modelo seleccionado.

3.6.1.2.2. Modelado farmacocinético

Según Sheiner (Sheiner, 1984) el análisis farmacocinético de los datos experimentales mediante modelos paramétricos, pretende conocer no sólo el grado de asociación entre la variable dependiente (concentración) y la variable independiente (tiempo), sino también los mecanismos responsables de dicha asociación para luego poder hacer predicciones; sin embargo, un modelo no permite predecir nunca el valor exacto de la variable dependiente, de forma que esta lleva siempre un grado de incertidumbre asociado. En general, se asume que cualquier observación puede ser descrita por un modelo de regresión dado por la Ecuación 3.36.

$$y_i = C_i + e_i = f(x_i, \theta) + e_i \qquad \text{Ecuación 3.36}$$

De la Ecuación 3.36 se desprende que cualquier valor de concentración experimental (y_i) puede ser expresado como suma de dos términos; por una parte su valor medio dado por la función matemática $f(x_i, \theta)$ conocida como modelo estructural, en la que x_i son los valores de la variable independiente, en nuestro caso el tiempo aunque en algunos casos también podría ser la dosis y θ la notación de los parámetros del modelo (V_d , K , por ejemplo) en forma vectorial y por otra el error aleatorio no explicado (e_i) que podría interpretarse como la diferencia entre la concentración observada (y_i) y la predicha por el modelo $f(x_i, \theta)$.

Los modelos estructurales pueden expresarse de forma empírica (modelos empíricos) ó bien mecanística (modelos mecanísticos). Los modelos empíricos a su vez pueden adoptar la forma de distintas funciones como por ejemplo polinomios (Ecuación 3.37) o bien suma de términos exponenciales (Ecuación 3.38), siendo estas últimas las más utilizadas en farmacocinética tal como se especifica más adelante.

$$f(x, \theta) = \sum_{k=0}^m \theta_k \cdot X^k \quad \text{Ecuación 3.37}$$

$$f(x, \theta) = \sum_{k=1}^m \theta_{2k-1} \cdot e^{-\theta_{2k} x} \quad \text{Ecuación 3.38}$$

Los modelos empíricos describen únicamente la relación existente entre las variables dependiente e independiente sin atender a ningún significado fisiológico. Dichos modelos tienen sentido especialmente cuando únicamente interesa conocer el grado de asociación entre las variables, sin embargo cuando además se pretende obtener información de los procesos físicos que tienen lugar, se consideran los modelos mecanísticos que en farmacocinética se construyen mediante sistemas de ecuaciones diferenciales lineales.

Los errores aleatorios se distribuyen normalmente, de tal forma que el modelo de error vendrá definido por el valor esperado del error $E(e_i) = \mu$ y por la dispersión del mismo alrededor del valor esperado o modelo de varianza $\text{var}(e_i)$.

Aunque la metódica analítica utilizada en la determinación cuantitativa del fármaco puede considerarse la principal fuente de error, no deben descartarse otras posibles fuentes de error experimental. En cualquier caso es fundamental conocer la evolución del error asociado a la variable dependiente frente al valor de esta y establecer el modelo de varianza que lo describa. En el caso de que se disponga de medidas repetidas (m) de la variable dependiente (y_i) de acuerdo con la Ecuación 3.39.

$$y_{ik} = f(x_i, \theta) + e_{ik} \quad k = 1, m \quad \text{Ecuación 3.39}$$

las varianzas de todos los errores e_{ik} para $k=1, m$ ($\text{var}(e_i)$) son iguales porque x_i es constante. Sin embargo cuando se trata de observaciones distintas, por

ejemplo y_i, y_k , el valor de $\text{var}(e_i)$ es distinto al de $\text{var}(e_k)$ y además dicho valor tiende a disminuir al aumentar el tiempo (x_i); como consecuencia tal dependencia puede describirse mediante el modelo de varianza de e_i dado por la Ecuación 3.40.

$$\text{var}(e_i) = [\sigma_1^2 \cdot f(x_i, \theta, \sigma_2)]$$

Ecuación 3.40

es decir la varianza de e_i depende también de la variable independiente (x_i) y de los parámetros (θ), siendo x_i parámetros específicos del modelo de varianza y σ^2 el parámetro que permite que el modelo de varianza propiamente dicho $f(x_i, \theta, \sigma)$ sea independiente de la magnitud del valor absoluto de la observación (y_i).

En los apartados siguientes se detallan las representaciones esquemáticas, así como las funciones matemáticas (modelos estructurales), expresadas explícitamente, representativas del tránsito del fármaco en el organismo tras su administración en bolus y en infusión intravenosa, según los modelos farmacocinéticos más utilizados de uno, dos y tres compartimientos internos, de acuerdo con Wagner (Wagner, 1975) y Gibaldi y Perrier (Gibaldi y Perrier, 1982). Seguidamente se muestran también las representaciones esquemáticas y ecuaciones poliexponenciales asociadas a los modelos de uno y dos compartimientos internos considerados tras la administración oral del fármaco.

3.6.1.2.2.1. Administración intravenosa

A. Modelo monocompartimental

El modelo monocompartimental es, sin lugar a dudas, el modelo farmacocinético más simple. Dicho modelo considera al organismo como un compartimiento único en el que el fármaco se distribuye instantáneamente.

A.1. Bolus intravenoso

Si se asume que el proceso cinético de eliminación del fármaco a partir del único compartimiento considerado según este modelo (Figura 3.14) es de primer orden, la ecuación representativa de la desaparición del fármaco del organismo en función del tiempo, después de su administración en bolus intravenoso, es una ecuación monoexponencial (ver Ecuación 3.41). Dicha Ecuación explica el hecho de que éste y los que luego se presentan sean modelos farmacocinéticos lineales cuando en realidad tal y como ya se ha mencionado en párrafos anteriores se utilizan modelos de regresión no lineal para su ajustado a los datos experimentales; así pues este modelo es lineal respecto a la dosis (D), pero se analiza por regresión no lineal porque es no lineal respecto a sus parámetros.

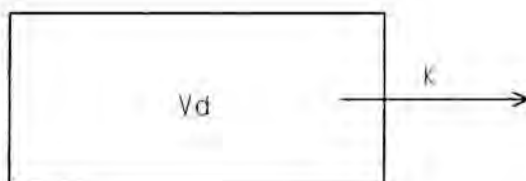


Figura 3.14. Representación esquemática del comportamiento de un fármaco administrado en bolus iv, según un modelo monocompartimental.

$$C = \frac{D}{Vd} \cdot e^{-k \cdot t}$$

Ecuación 3.41

Tal como se deduce de la Ecuación 3.41, los parámetros representativos del modelo monocompartimental tras la administración intravenosa del fármaco son el volumen de distribución (V_d) y la constante de eliminación (K). En general, en estos modelos el número de parámetros es siempre igual a 2 veces el número de términos exponenciales.

A partir de los parámetros obtenidos se podrá determinar la semivida biológica ($t_{1/2}$), el aclaramiento plasmático (Cl), el área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) y el tiempo medio de residencia (MRT) mediante las ecuaciones que se describen a continuación:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K} \quad \text{Ecuación 3.42}$$

$$Cl = Vd \cdot K \quad \text{Ecuación 3.43}$$

$$AUC_0^\infty = \frac{D}{Vd \cdot K} \quad \text{Ecuación 3.44}$$

$$MRT = \frac{1}{K} \quad \text{Ecuación 3.45}$$

A.2. Perfusión intravenosa

Cuando el fármaco se administra vía intravenosa a velocidad constante durante un período de tiempo T conocido como tiempo de perfusión, el esquema explicativo del comportamiento del fármaco en el organismo según el modelo monocompartimental, es idéntico al de la Figura 3.14, pero considerando una constante de velocidad de entrada de fármaco al compartimiento considerado, de orden cero (K_0) (Figura 3.15).



Figura 3.15. Representación esquemática del comportamiento de un fármaco administrado en perfusión iv, según un modelo monocompartimental.

En este caso la evolución temporal de la concentración de fármaco en el organismo durante el período de infusión, viene dada por la Ecuación 3.46.

$$C = \frac{K_0}{Vd \cdot K} \cdot (1 - e^{-K \cdot t}) \quad \text{Ecuación 3.46}$$

Dicha Ecuación presenta tres parámetros, Vd, K y K_0 , siendo este último la velocidad de perfusión del fármaco expresada en cantidad de fármaco que accede al compartimiento por unidad de tiempo.

A partir de la Ecuación 3.46 puede conocerse la concentración de fármaco en estado de equilibrio estacionario (Ecuación 3.47), teniendo en cuenta que si $t = \infty$, $e^{-Kt} = 0$, de forma que transcurrido un tiempo de perfusión de aproximadamente igual a 4 semividas biológicas del fármaco, la concentración plasmática del mismo no diferirá más de un 10 % de la correspondiente al estado de equilibrio estacionario, mientras que después de un tiempo de perfusión de aproximadamente 7 semividas biológicas, esta diferencia será inferior al 1%.

$$C_{ss} = \frac{K_0}{Vd \cdot K} \quad \text{Ecuación 3.47}$$

A partir de los parámetros obtenidos se podrá determinar la semivida biológica ($t_{1/2}$), el aclaramiento plasmático (Cl), y el área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) mediante las Ecuaciones 3.42-3.44 ya descritas en párrafos anteriores. Mientras que el tiempo medio de residencia (MRT) se calcula a partir de la Ecuación 3.48.

$$MRT_{infusión} = \frac{T}{2} + MRT_{bolus iv} = \frac{T}{2} + \frac{1}{K} \quad \text{Ecuación 3.48}$$

Para ello hay que tener en cuenta que una vez finalizada la infusión y siempre que se haya alcanzado el estado de equilibrio estacionario, la Ecuación que rige la caída de concentraciones plasmáticas de fármaco del organismo es,

$$C = \frac{K_0}{Vd \cdot K} \cdot e^{-K \cdot t'} \quad \text{Ecuación 3.49}$$

siendo t' el tiempo transcurrido desde la interrupción de la perfusión; mientras que si la infusión se ha interrumpido antes de alcanzar tal estado de equilibrio, la Ecuación válida es,

$$C = \frac{K_0}{Vd \cdot K} (1 - e^{-K \cdot T}) \cdot e^{-K \cdot t'} \quad \text{Ecuación 3.50}$$

siendo T el tiempo que dura la infusión y t' el tiempo transcurrido desde la interrupción de la perfusión.

B. Modelos multicompartimentales

Las premisas del modelo monocompartimental de distribución instantánea son excesivamente simples para que puedan cumplirse si se tiene en cuenta la complejidad del organismo. En general, la mayoría de fármacos no suele distribuirse instantáneamente en todo el organismo ya que este posee zonas

anatómicas mucho mejor irrigadas a las que el fármaco accede a mayor velocidad (englobadas en el denominado compartimiento central) que otras zonas, incluidas en el llamado compartimiento periférico. Por este motivo, no es difícil imaginarse que en las zonas mejor irrigadas la distribución del fármaco puede producirse de forma prácticamente instantánea mientras que en aquellas zonas que reciben un aporte sanguíneo inferior se requerirá un cierto tiempo para que se alcance el estado de equilibrio estacionario en el organismo en lo que a concentraciones de fármaco se refiere.

B.1. Modelo bicompartimental

B.1.1. Bolus intravenoso

El modelo abierto de dos compartimientos presupone que la distribución instantánea se realiza en el compartimiento central mientras que se requiere un cierto tiempo para que se alcance el equilibrio de concentraciones en el compartimiento periférico. Tal como se observa en el esquema de la Figura 3.16, en general, se asume que la eliminación tiene lugar desde el compartimiento central. Aunque dicha eliminación podría discurrir no sólo en el compartimiento central sino también en el compartimiento periférico o en ambos simultáneamente, se requeriría información adicional a la de los niveles plasmáticos en función del tiempo para suponer la utilización de un modelo distinto al más general. Como consecuencia en todas las Ecuaciones desarrolladas a continuación se asume que la eliminación tiene lugar en el compartimiento central.

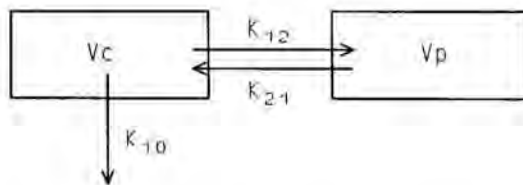


Figura 3.16. *Representación esquemática del comportamiento de un fármaco administrado en bolus iv, según un modelo bicompartimental.*

La Ecuación que describe el curso de los niveles plasmáticos en función del tiempo es una función biexponencial, concretamente se trata de la suma de dos términos exponenciales (Ecuación 3.51), debido a que en este modelo y después de la administración intravenosa del fármaco, se consideran dos compartimientos internos.

$$C = A_o \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B_o \cdot e^{-\beta \cdot t}$$

Ecuación 3.51

En dicha Ecuación A_o y B_o son los coeficientes y α y β las constantes híbridas de disposición rápida y lenta respectivamente que engloban los procesos de distribución y eliminación.

A partir de los valores de A_o , B_o , α y β cuya metodología de cálculo se expondrá más adelante y conocida la dosis administrada se determinan los principales parámetros farmacocinéticos representativos del modelo bicompartimental: Volumen del compartimiento central (V_c), Volumen del compartimiento periférico (V_p), Volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario (V_{dss}), la semivida biológica o semivida de la fase de disposición lenta β ($t_{1/2\beta}$), la semivida de la fase de disposición rápida α ($t_{1/2\alpha}$) y las microconstantes de distribución (K_{12}), de retorno (K_{21}) y de eliminación (K_{10}).

El cálculo de los parámetros anteriormente reseñados se efectúa mediante las expresiones que se detallan a continuación:

$$\frac{C_o}{K_{10}} = \frac{A_o}{\alpha} + \frac{B_o}{\beta}$$

Ecuación 3.52

$$\alpha \cdot \beta = K_{21} \cdot K_{10}$$

Ecuación 3.53

$$\alpha + \beta = K_{12} + K_{21} + K_{10} \quad \text{Ecuación 3.54}$$

$$V_c = \frac{D}{C_0} \quad \text{Ecuación 3.55}$$

$$V_p = V_c \cdot \left(\frac{K_{12}}{K_{21}} \right) \quad \text{Ecuación 3.56}$$

$$V_{\text{des}} = V_c + \frac{(K_{12} \cdot V_d)}{K_{21}} = V_c \cdot \left(1 + \frac{K_{12}}{K_{21}} \right) \quad \text{Ecuación 3.57}$$

$$t_{1/2\beta} = \frac{\ln 2}{\beta} \quad \text{Ecuación 3.58}$$

$$t_{1/2\alpha} = \frac{\ln 2}{\alpha} \quad \text{Ecuación 3.59}$$

El aclaramiento plasmático (Cl) y el área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) se determinan mediante las Ecuaciones 3.60 y 3.61, respectivamente.

$$Cl = V_c \cdot K_{10} \quad \text{Ecuación 3.60}$$

$$AUC_0^\infty = \frac{A_0}{\alpha} + \frac{B_0}{\beta} \quad \text{Ecuación 3.61}$$

B.1.2. Perfusión intravenosa

Análogamente a lo anteriormente expuesto para el modelo monocompartimental, cuando el fármaco se administra vía intravenosa a velocidad constante, el esquema explicativo del comportamiento del fármaco en el organismo según el modelo bicompartimental, es idéntico al del bolus intravenoso, pero considerando una constante de velocidad de entrada de fármaco al compartimiento central, de orden cero (K_o) (Figura 3.17).

Así pues, la Ecuación representativa de las concentraciones de fármaco en el organismo a cualquier tiempo, desde el inicio de la perfusión es,

$$C = \frac{K_o(K_{21} - \alpha) \cdot (1 - e^{-\alpha T})}{V_c \cdot \alpha \cdot (\alpha - \beta)} \cdot e^{-\alpha t} + \frac{K_o(\beta - K_{21}) \cdot (1 - e^{-\beta T})}{V_c \cdot \beta(\alpha - \beta)} \cdot e^{-\beta t}$$

Ecuación 3.62

Dicha Ecuación presenta cinco parámetros, K_o , K_{21} , α , β y V_c . El valor de $T = t$ mientras el fármaco se está perfundiendo de forma que va modificándose con el tiempo. A partir del momento que finaliza la perfusión, T pasa a ser un valor constante que equivale al tiempo que ha durado la perfusión.

Por tanto, durante la perfusión, es decir mientras $T=t$ y operando con las Ecuaciones 3.62 y 3.53 se obtiene la Ecuación 3.63, que describe el aumento de la concentración plasmática de fármaco durante la perfusión del mismo.

$$C = \frac{K_o}{V_c \cdot K_{10}} \cdot \left[1 + \frac{\beta - K_{10}}{\alpha - \beta} \cdot e^{-\alpha t} + \frac{K_{10} - \alpha}{\alpha - \beta} \cdot e^{-\beta t} \right]$$

Ecuación 3.63

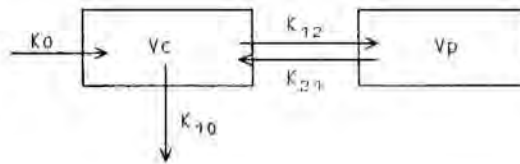


Figura 3.17. Representación esquemática del comportamiento de un fármaco administrado en perfusión iv, según un modelo bicompartimental.

A partir de la Ecuación 3.63 puede estimarse el valor de la concentración plasmática de fármaco correspondiente al estado de equilibrio estacionario, alcanzado después de un tiempo de perfusión de como mínimo igual a 7 semividas biológicas del fármaco (Ecuación 3.64).

$$C_{ss} = \frac{K_0}{V_c \cdot K_{10}} \quad \text{Ecuación 3.64}$$

Dicha Ecuación permite, por otra parte, conocer la velocidad de perfusión del fármaco necesaria para alcanzar una determinada concentración plasmática en estado de equilibrio estacionario. No obstante, para ello, es necesario determinar previamente los valores de V_c y K_{10} a partir de los datos de concentración plasmática tiempo después de un bolus intravenoso del fármaco.

Finalizada la perfusión del fármaco, los niveles plasmáticos de fármaco disminuyen de forma biexponencial y la Ecuación que rige el tránsito del fármaco en el organismo viene dada por,

$$C = R \cdot e^{-\alpha \cdot t'} + S \cdot e^{-\beta \cdot t'} \quad \text{Ecuación 3.65}$$

siendo t' el tiempo post-perfusión, es decir $t' = t - T$

Los coeficientes R y S vienen dados por las expresiones de las Ecuaciones 3.66 y 3.67, respectivamente, si la perfusión se ha interrumpido antes

de alcanzar el estado de equilibrio estacionario, y por las Ecuaciones 3.68 y 3.69 cuando la perfusión se ha detenido después de alcanzar el equilibrio.

$$R = \frac{K_o \cdot (\alpha - K_{21})}{V_c \cdot (\alpha - \beta)} \cdot \frac{(1 - e^{-\alpha T})}{\alpha} \quad \text{Ecuación 3.66}$$

$$S = \frac{K_o \cdot (K_{21} - \beta)}{V_c \cdot (\alpha - \beta)} \cdot \frac{(1 - e^{-\beta T})}{\beta} \quad \text{Ecuación 3.67}$$

$$R = \frac{K_o \cdot (\alpha - K_{21})}{V_c \cdot (\alpha - \beta) \cdot \alpha} \quad \text{Ecuación 3.68}$$

$$S = \frac{K_o \cdot (K_{21} - \beta)}{V_c \cdot (\alpha - \beta) \cdot \beta} \quad \text{Ecuación 3.69}$$

Los coeficientes R y S pueden relacionarse con A_o y B_o u ordenadas en el origen a tiempo cero correspondientes a la Ecuación representativa de los niveles plasmáticos de fármaco tras administración en bolus intravenoso, según el modelo bicompartimental (Ecuación 3.51), mediante las Ecuaciones 3.70 y 3.71 (cuando la perfusión se detiene antes de alcanzar el estado de equilibrio estacionario) y mediante las Ecuaciones 3.72 y 3.73 (cuando la perfusión se detiene después de alcanzar el estado de equilibrio estacionario) (Loo y Riegelman, 1970).

$$A_o = \frac{R \cdot K_o \cdot T \cdot \alpha}{K_o \cdot (1 - e^{-\alpha T})} \quad \text{Ecuación 3.70}$$

$$B_o = \frac{S \cdot K_o \cdot T \cdot \beta}{K_o \cdot (1 - e^{-\beta T})} \quad \text{Ecuación 3.71}$$

$$A_o = \frac{R \cdot K_o \cdot T \cdot \alpha}{K_o} \quad \text{Ecuación 3.72}$$

$$B_o = \frac{S \cdot K_o \cdot T \cdot \beta}{K_o} \quad \text{Ecuación 3.73}$$

siendo,

$$K_o \cdot T = D$$

Como consecuencia, finalizada la perfusión pueden determinarse los valores de los coeficientes (R y S) y exponentes (α y β) de la Ecuación 3.65, y a partir de éstos, los valores de A_o y B_o . Seguidamente se calculan los parámetros V_c , V_p , V_{dss} , $t_{1/2\beta}$, $t_{1/2\alpha}$, K_{12} , K_{21} , K_{10} , Cl y $AUC_{0-\infty}$ mediante las Ecuaciones 3.52-3.61, anteriormente expuestas.

B.2. Modelo Tricompartimental

B.2.1. Bolus intravenoso

El decurso de niveles plasmáticos de fármaco observado después de su inyección intravenosa, obedeciendo el modelo tricompartimental esquematizado en la Figura 3.18 viene dado por la Ecuación 3.74.

Tal como se observa en la Figura 3.18, en este modelo se considera un compartimiento central al cual el fármaco accede a mayor velocidad y dos compartimientos periféricos uno de los cuales corresponde a las zonas menos afines del organismo, en las que el fármaco tarda más en distribuirse, y se denomina también compartimiento periférico profundo (P_2) en contraposición con el compartimiento periférico superficial (P_1). Análogamente al modelo bicompartimental y teniendo en cuenta el fármaco sometido a ensayo, asumimos que el proceso de eliminación ocurre únicamente en el compartimiento central correspondiente a las zonas más irrigadas del organismo.

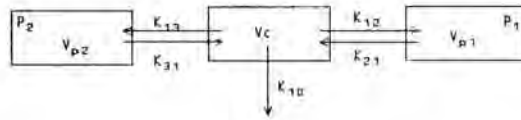


Figura 3.18. Representación esquemática del comportamiento de un fármaco administrado en bolus iv, según un modelo tricompartmental.

La Ecuación 3.74 es la suma de tres términos exponenciales representativos de los tres compartimientos internos considerados por este modelo. Dicha Ecuación, presenta tres coeficientes (P_o , A_o y B_o) dados por las Ecuaciones 3.75, 3.76 y 3.77 respectivamente, siendo π , α , y β las constantes híbridas de disposición, asumiéndose que β es la constante de velocidad más lenta y que π es mayor que α .

$$C = A_o \cdot e^{-\alpha t} + B_o \cdot e^{-\beta t} + P_o \cdot e^{-\pi t} \quad \text{Ecuación 3.74}$$

$$P_o = \frac{D \cdot (K_{21} - \pi) \cdot (K_{31} - \pi)}{V_c \cdot (\pi - \alpha) \cdot (\pi - \beta)} \quad \text{Ecuación 3.75}$$

$$A_o = \frac{D \cdot (K_{21} - \alpha) \cdot (\alpha - K_{31})}{V_c \cdot (\pi - \alpha) \cdot (\alpha - \beta)} \quad \text{Ecuación 3.76}$$

$$B_o = \frac{D \cdot (K_{21} - \beta) \cdot (K_{31} - \beta)}{V_c \cdot (\alpha - \beta) \cdot (\pi - \beta)} \quad \text{Ecuación 3.77}$$

A pesar de la mayor complejidad matemática que supone la introducción de un nuevo término exponencial en la Ecuación matemática representativa del curso de niveles plasmáticos (Ecuación 3.74), la definición de este modelo se hace necesaria y su aplicación es posible por el hecho de disponer cada vez más de metodicas analíticas que permiten alcanzar límites de cuantificación suficientemente bajos, de modo que se pueden describir de un modo más riguroso las curvas de concentración plasmática-tiempo.

Material y Métodos

A partir de los valores de P_0 , A_0 y B_0 y de π , α y β y conocida la dosis administrada, se determinan los principales parámetros farmacocinéticos representativos del modelo tricompartmental: Volumen del compartimiento central (V_c), Volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario (V_{dss}), la semivida biológica o semivida de la fase de disposición β ($t_{1/2\beta}$), y las microconstantes de distribución al compartimiento periférico superficial (K_{12}) y de retorno del mismo (K_{21}), microconstantes de distribución al compartimiento periférico profundo (K_{13}) y de retorno del mismo (K_{31}), y de eliminación del compartimiento central (K_{10}).

El cálculo de los parámetros anteriormente mencionados se efectúa mediante las expresiones que se detallan a continuación:

$$K_{21} = \alpha + \frac{A \cdot (\pi - \alpha) \cdot (\alpha - \beta)}{(P + A + B) \cdot (\alpha - K_{31})}$$

Ecuación 3.78

$$K_{31} = \beta + \frac{B \cdot (\pi - \beta) \cdot (\alpha - \beta)}{(P + A + B) \cdot (K_{21} - \beta)}$$

Ecuación 3.79

$$K_{10} = \frac{\alpha \cdot \beta \cdot \pi}{K_{21} \cdot K_{31}}$$

Ecuación 3.80

$$K_{13} = \alpha + \beta + \pi - (K_{10} + K_{12} + K_{21} + K_{31})$$

Ecuación 3.81

$$K_{12} = \frac{(\alpha\beta + \alpha\pi + \beta\pi) - K_{21} \cdot (\alpha + \beta + \pi) - K_{10} \cdot K_{31} + K_{21}^2}{K_{31} - K_{21}}$$

Ecuación 3.82

$$V_c = \frac{D}{P_o + A_o + B_o}$$

Ecuación 3.83

$$V_{dss} = V_c \cdot \left[1 + \frac{K_{12}}{K_{21}} + \frac{K_{13}}{K_{31}} \right]$$

Ecuación 3.84

$$t_{1/2\beta} = \frac{\ln 2}{\beta}$$

Ecuación 3.85

El aclaramiento plasmático (Cl) y el área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) se determinan mediante las Ecuaciones 3.86 y 3.87, respectivamente.

$$Cl = V_c \cdot K_{10}$$

Ecuación 3.86

$$AUC_0^\infty = \frac{P_o}{\pi} + \frac{A_o}{\alpha} + \frac{B_o}{\beta}$$

Ecuación 3.87

3.6.1.2.2.2. Administración oral

A. Modelo monocompartimental

Trás la administración extravasal, debe considerarse la presencia de un compartimiento externo al organismo (el lugar de absorción) y por consiguiente el tránsito del fármaco en el organismo viene condicionado por el acceso y por

la salida de fármaco del compartimiento interno. Si se asumen los procesos de absorción y eliminación de primer orden, la ecuación representativa del tránsito del fármaco en el organismo es una ecuación biexponencial tal como se detalla en la Ecuación 3.88 en la que, como en la vía intravenosa, V_d es el volumen de distribución, K la constante de eliminación, K_a la constante aparente de absorción y F la biodisponibilidad absoluta en magnitud.

$$C = \frac{F \cdot D \cdot K_a}{V_d \cdot (K_a - K)} \cdot (e^{-Kt} - e^{-K_a t}) \quad \text{Ecuación 3.88}$$

Es frecuente en muchos casos tener una expresión más simplificada de la ecuación 3.88 tal como se detalla en la ecuación 3.89 que como se observa es una suma algebraica de dos términos exponenciales en la que A_1 y A_2 son los coeficientes y K_1 y K_2 los exponentes.

$$C = A_1 \cdot e^{-K_1 t} - A_2 \cdot e^{-K_2 t} \quad \text{Ecuación 3.89}$$

El motivo de la utilización de la expresión simplificada está justificado por el hecho de que, en muchos casos, no se dispone de información acerca del comportamiento farmacocinético del fármaco obtenido por administración intravenosa y, por tanto, no es posible conocer ni la biodisponibilidad absoluta (F) ni el volumen de distribución (V_d). Si no se conocen los parámetros farmacocinéticos tras la administración intravenosa, es imposible discernir entre la exponencial representativa del proceso de absorción y la representativa del proceso de eliminación, lo único cierto es que el proceso más rápido irá afectado de signo negativo en la suma algebraica de términos exponenciales. En principio se asigna el término negativo a la exponencial representativa del proceso de absorción ya que se considera que dicho proceso es el más rápido sin embargo, se sabe que en determinadas circunstancias la constante de absorción puede ser menor que la de eliminación, "fenómeno del flip-flop", en estos casos la

exponencial representativa del proceso de absorción debe ir afectada de signo positivo. De acuerdo con lo expuesto, en ausencia de datos intravenosos, la administración extravasal no permite estimar con fiabilidad las constantes que rigen el proceso de entrada y salida del fármaco del compartimiento interno.

A partir de esta ecuación biexponencial se puede determinar el área bajo la curva de niveles plasmáticos ($AUC_{0-\infty}$) de acuerdo con la ecuación 3.90 que se detalla a continuación:

$$AUC_0^\infty = \frac{A_1}{K_1} - \frac{A_2}{K_2} - \left[\frac{A_1}{K_1} \cdot (1 - \exp^{-K_1 \cdot t_0}) - \frac{A_2}{K_2} \cdot (1 - \exp^{-K_2 \cdot t_0}) \right]$$

Ecuación 3.90

En la Figura 3.19 se detalla un esquema representativo del modelo monocompartimental tras administración extravasal.

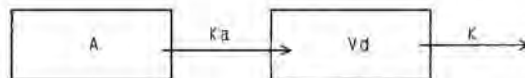


Figura 3.19. Representación esquemática del modelo monocompartimental tras administración extravasal y de una curva de niveles plasmáticos representativa del tránsito del fármaco a través del organismo.

B. Modelo Bicompartimental

Tras la administración extravasal como en el caso anterior hay que considerar un compartimiento externo adicional (el lugar de absorción) y por consiguiente el esquema de dicho modelo tal como se detalla en la Figura 3.20 posee 3 compartimientos y la correspondiente ecuación que describe el decurso de las concentraciones plasmáticas (concentraciones en el compartimiento central) en función del tiempo, es una suma algebraica de tres términos exponenciales tal como se detalla en la Ecuación 3.91,

$$C = \frac{F \cdot D \cdot K_{01}}{V_c} \cdot \left(\frac{K_{21} - \alpha}{(K_{01} - \alpha) \cdot (\beta - \alpha)} \cdot e^{-\alpha\tau} + \frac{K_{21} - \beta}{(K_{01} - \beta) \cdot (\alpha - \beta)} \cdot e^{-\beta\tau} + \frac{K_{21} - K_{01}}{(\alpha - K_{01}) \cdot (\beta - K_{01})} \cdot e^{-K_{01}\tau} \right)$$

Ecuación 3.91

en la que F es la biodisponibilidad absoluta, V_c el volumen en el compartimiento central, K_{01} la constante de absorción, α la constante de disposición rápida, β la constante de disposición lenta, y K_{21} la constante de retorno. Tal como ya se comentó en el modelo monocompartimental, cuando no se disponen de datos tras la administración intravenosa, se ignora el valor de F, el valor de V_c y se plantea la ambigüedad de asignar correctamente a cada término exponencial el valor de K_{01} , α o β . En muchos casos la Ecuación 3.91 se simplifica a la Ecuación 3.92

$$C = A_1 \cdot e^{-K_1\tau} + A_2 \cdot e^{-K_2\tau} + A_3 \cdot e^{-K_3\tau} \quad \text{Ecuación 3.92}$$

en la que A_1 , A_2 y A_3 son los coeficientes y K_1 , K_2 y K_3 son los exponentes. La Ecuación 3.92 es una suma algebraica en el que como mínimo uno de los términos debe ser negativo y en determinados casos dos de estos términos exponenciales pueden ser negativos.

En función de los valores de las constantes α , β , K_{21} y K_{01} la Ecuación triexponencial expresada en la ecuación 3.91 (que contempla tres compartimientos) puede perder un término exponencial ($K_{21} \approx K_{01}$) y convertirse en una ecuación biexponencial representativa, en este caso de un fármaco que presenta un comportamiento farmacocinético bicompartimental. Es importante retener este hecho ya que consideramos que es suficientemente ilustrativo de que la evaluación del tipo de modelo farmacocinético a partir de la morfología de las curvas de niveles plasmáticos, debe realizarse siempre tras la administración intravenosa y no tras la administración extravasal.

El área bajo la curva de niveles plasmáticos se obtiene en estos casos mediante la siguiente ecuación:

$$AUC_0^\infty = \frac{A_1}{K_1} + \frac{A_2}{K_2} + \frac{A_3}{K_3} \left[\frac{A_1}{K_1} \cdot (1 - \exp^{-K_1 \cdot t_0}) + \frac{A_2}{K_2} \cdot (1 - \exp^{-K_2 \cdot t_0}) + \frac{A_3}{K_3} \cdot (1 - \exp^{-K_3 \cdot t_0}) \right]$$

Ecuación 3.93

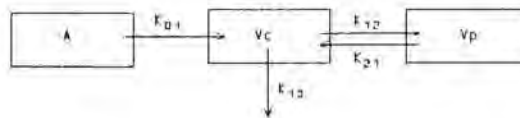


Figura 3.20. Representación esquemática del modelo bicompartimental tras la administración extravasal.

El cálculo del tiempo medio de residencia a partir de las ecuaciones poliexponenciales se determina en todos los casos en función de los coeficientes y exponentes mediante la siguiente ecuación:

$$MRT = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{A_i}{K_i^2} \right)}{\sum_{i=1}^n \left(\frac{A_i}{K_i} \right)} \quad \text{Ecuación 3.94}$$

La determinación de los valores Cmax de y de Tmax a partir de las funciones poliexponenciales se realiza buscando el tiempo en el que la función derivada de la ecuación que rige el tránsito del fármaco en el organismo se iguala a cero. Conocido el valor de Tmax, el valor de Cmax se obtiene al calcular C para t=Tmax en la ecuación poliexponencial correspondiente (Ecuaciones 3.88 y 3.91 para fármacos con comportamiento farmacocinético monocompartimental y bicompartimental respectivamente).

El valor de la Biodisponibilidad absoluta en magnitud (F) se hallará igual como se ha indicado en el tratamiento no compartimental de los datos experimentales, a partir de la Ecuación 3.35, utilizando en este caso el valor del área bajo la curva de niveles plasmáticos ya sea intravenosa u oral, obtenida a partir de la ecuación teórica.

3.6.1.2.2.3. Estudios de absorción. Determinación del grado de absorción

El grado de absorción de un fármaco se determina mediante métodos de balance de masas que consideran que la cantidad de fármaco absorbido a un tiempo dado equivale a la suma de la cantidad de fármaco presente en el organismo, en un determinado instante, más la cantidad de fármaco eliminada del mismo hasta ese mismo instante.

Los métodos más utilizados de balance de masas son el método de Wagner-Nelson (Wagner y Nelson, 1963) aplicable al caso de fármacos cuya cinética tras administración intravenosa del mismo se ajuste a un modelo monocompartmental y el método de Loo-Riegelmann para fármacos bicompartmentales (Loo y Riegelmann, 1968). Se presenta a continuación la teoría correspondiente al método de Loo-Riegelmann puesto que es el que se ha utilizado en la presente Memoria para el cálculo del grado de absorción.

Método de Loo-Riegelmann

El método de Loo-Riegelmann, tal como ya se ha mencionado, considera tres compartimientos, dos internos y uno externo, de acuerdo con el esquema de la Figura 3.20, siendo la Ecuación 3.91 la que describe el decurso de concentraciones plasmáticas en función del tiempo para dicho modelo.

Puesto que se trata de un método de balance de masas, se cumple en todo momento que,

$$Q_a = Q_c + Q_p + Q_e \quad \text{Ecuación 3.95}$$

siendo Q_a la cantidad de fármaco absorbida a un tiempo t , y Q_c , Q_p , y Q_e las cantidades de fármaco en compartimiento central, en compartimiento periférico y eliminado (ya sea por metabolismo o excreción) hasta ese mismo tiempo.

Si se divide cada uno de los términos de la ecuación anterior por el volumen de distribución del fármaco en compartimiento central (V_c), esta queda expresada en cantidades de fármaco en compartimiento central y periférico expresadas como concentración plasmática. Por otra parte, puesto que la cantidad de fármaco que es eliminada por unidad de tiempo viene dada por la Ecuación 3.96,

$$\frac{dQ_e}{dt} = Q \cdot K_{10} = C \cdot V_c \cdot K_{10} \quad \text{Ecuación 3.96}$$

y la integración de la Ecuación 3.96 entre un tiempo $t_0=0$ y un tiempo t , proporciona la cantidad de fármaco eliminada a un tiempo t (Ecuación 3.97), la concentración de fármaco eliminada entre un tiempo $t_0=0$ y un tiempo t vendrá dada por la Ecuación 3.98.

$$(Q_e)_t = K_{10} \cdot V_c \cdot \int_{t_0}^t C \cdot dt \quad \text{Ecuación 3.97}$$

$$(C_e)_t = K_{10} \cdot \int_{t_0}^t C \cdot dt \quad \text{Ecuación 3.98}$$

Luego substituyendo en la Ecuación 3.95, se obtiene la expresión que permite conocer la cantidad de fármaco absorbida, expresada en concentraciones plasmáticas, a un tiempo t A_t ,

$$A_t = \left[\frac{Q_a}{V_c} \right]_t = C_t + C_{p,t} + K_{10} \cdot \int_{t_0}^t C_t \cdot dt \quad \text{Ecuación 3.99}$$

Puesto que a tiempo infinito puede considerarse que todo el fármaco se ha eliminado del organismo, la cantidad total de fármaco absorbido equivaldrá a la cantidad total de fármaco eliminado y la Ecuación anterior se transforma en,

$$A_\infty = \left[\frac{Q_a}{V_c} \right]_\infty = K_{10} \cdot \int_{t_0}^{\infty} C_t \cdot dt = K_{10} AUC_0^\infty \quad \text{Ecuación 3.100}$$

Luego el cociente entre A_t y A_∞ permite conocer la fracción de fármaco absorbida expresada en concentraciones plasmáticas a cada tiempo t , sin tener que hacer ninguna asunción con respecto a la cinética del proceso de absorción del fármaco. Los valores de AUC_{0-t} y $AUC_{0-\infty}$ pueden estimarse por el método de los trapezoides.

Ahora bien, para el cálculo de A_t se requiere conocer además de las concentraciones de fármaco en compartimiento central, los valores de la concentración del mismo en compartimiento periférico y puesto que este no es muestreable, dichos valores deben calcularse teóricamente. Para ello se asume que entre dos tiempos consecutivos se puede considerar que los niveles plasmáticos de fármaco decaen de forma lineal, luego la concentración de fármaco en compartimiento central a un tiempo t_n se puede expresar como,

$$C_{t_n} = C_{t_{n-1}} + M \cdot \Delta t \quad \text{Ecuación 3.101}$$

siendo,

$$\Delta t = t_n - t_{n-1} \quad \text{Ecuación 3.102}$$

$$\Delta C_p = C_{p_{t_n}} - C_{t_{n-1}} \quad \text{Ecuación 3.103}$$

$$M = \frac{\Delta C_p}{\Delta t} \quad \text{Ecuación 3.104}$$

teniendo en cuenta que la variación instantánea de la concentración de fármaco en compartimiento periférico viene dada por la Ecuación 3.105.

$$\frac{dC_p}{dt} = -K_{21} \cdot C_p + K_{12} \cdot C \quad \text{Ecuación 3.105}$$

Si en dicha ecuación (Ecuación 3.105) se substituye el valor de C por el valor de C_m dado por la Ecuación 3.101 y luego se resuelve por el método de las transformadas de Laplace, se llega a la Ecuación 3.106.

$$C_p = \frac{K_{12}}{K_{21}} \cdot C_{t_{n-1}} \cdot [1 - e^{-K_{21} \cdot \Delta t}] - K_{12} \cdot \frac{(\Delta C / \Delta t)}{K_{21}^2} \cdot (1 - e^{-K_{21} \cdot \Delta t}) + \frac{K_{12} \cdot (\Delta C / \Delta t)}{K_{21}} \cdot \Delta t + C_{p_{n-1}} \cdot e^{-K_{21} \cdot \Delta t}$$

$$\text{Ecuación 3.106}$$

Por consiguiente para conocer la concentración de fármaco en compartimiento periférico a cada tiempo t_n se debe substituir en la Ecuación 3.106 el valor de la concentración de fármaco en dicho compartimiento correspondiente

Material y Métodos

al intervalo de tiempo anterior t_{n-1} , teniendo en cuenta que a tiempo cero dicho valor es nulo.

Por otra parte, las Ecuaciones 3.100 y 3.106 ponen en evidencia que para poder calcular el grado de absorción del fármaco por el método de Loo-Riegelmann (Ecuación 3.107), se requiere haber administrado previamente y en un ensayo separado el fármaco vía intravenosa al mismo individuo, para poder determinar los valores de las constantes de distribución (K_{12}) y de retorno (K_{21}) del fármaco, así como la constante de eliminación (K_{10}) y es preciso también conocer el volumen de distribución en compartimiento central (V_c).

El método de Loo-Riegelmann permite además del grado de absorción calcular el valor de la constante de absorción del fármaco siempre y cuando se asuma que el proceso de absorción es de primer orden (Ecuación 3.108).

$$\frac{A_t}{A_\infty} \cdot 100 \qquad \text{Ecuación 3.107}$$

$$A_\infty - A_t = A_\infty \cdot e^{-K_a \cdot t} \qquad \text{Ecuación 3.108}$$

3.6.1.2.2.4. Modelos no lineales

Los modelos hasta ahora descritos suelen construirse habitualmente con una filosofía de cinética lineal, hecho que no impide la posibilidad de inclusión de términos matemáticos que permitan cuantificar procesos cinéticos no lineales implicados en el proceso global. Los procesos de carácter no lineal más habituales en farmacocinética pueden ser tanto procesos saturables de absorción o de excreción de fármacos, como procesos de biotransformación o metabolismo de fármacos, y también procesos de fijación a proteínas plasmáticas o tisulares.

Todos ellos se describen desde un punto de vista matemático por funciones hiperbólicas. Concretamente la Ecuación de Michaelis-Menten en su forma diferencial (Ecuación 3.109) permite caracterizar algunos de estos procesos y puede utilizarse de forma aislada o bien combinarse con funciones correspondientes a otros modelos como son los compartimentales. De hecho este es también el procedimiento seguido cuando se consideran procesos de entrada de fármaco al organismo regidos por una constante de velocidad de orden cero, como es el caso de la infusión intravenosa aunque este tipo de cinética (orden cero) no es exclusiva de la infusión intravenosa y también podría observarse tras la administración del fármaco por una vía extravasal. El primer término de la Ecuación 3.109 representa la velocidad de cambio de la concentración de fármaco (aparición o bien desaparición) en un compartimiento dado, en función del modelo que se postule, dependiendo ello a su vez de los datos experimentales de que se disponga, en lo que respecta al ó bien a los compartimientos muestreados. V_{\max} es la constante de capacidad, K_m la constante de afinidad y C la concentración de fármaco.

No hay que olvidar que la cinética de orden cero es un caso particular de la cinética de orden mixto, de forma que matemáticamente se demuestra que cuando los valores de concentración de fármaco tienden a infinito, $C \gg K_m$ y K_m aporta muy poco al denominador de la Ecuación 1.109, de forma que la variación de la concentración de fármaco por unidad de tiempo se transforma en un valor constante (Ecuación 3.110). Sin embargo, a concentraciones bajas (cuando $C \rightarrow 0$), la Ecuación 3.109 se transforma en una función de orden uno (Ecuación 3.111) que de hecho es el proceso cinético más frecuente en la eliminación de la mayoría de los fármacos.

$$\frac{dC}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot C}{K_m + C} \qquad \text{Ecuación 3.109}$$

$$\frac{dC}{dt} = V_{\max} \qquad \text{Ecuación 3.110}$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{V_{\max}}{K_m} \cdot C$$

Ecuación 3.111

3.6.1.2.3. Estimación de parámetros

3.6.1.2.3.1. Métodos de regresión no lineal. Algoritmos de ponderación

La determinación y optimización de cada uno de los parámetros implicados en los distintos modelos anteriormente indicados se consigue mediante el ajuste de dichos modelos a los datos experimentales por métodos de regresión no lineal y haciendo uso de programas informatizados. Las premisas que deben cumplir los métodos de regresión no lineal para el ajustado de los datos experimentales son (Daniel y Wood, 1971):

- Utilización de todos los datos relevantes.
- Aplicación del principio de la parsimonia, en lo que respecta al número de parámetros y coeficientes implicados.
- Estimación de la precisión de los parámetros determinados.
- Capacidad de detección de posibles desviaciones entre los datos experimentales y los modelos propuestos
- Establecer la capacidad predictiva del modelo haciendo uso de sus ecuaciones representativas y de los parámetros del mismo.

El método de regresión no lineal más utilizado para el ajuste de los datos experimentales y estimación de parámetros, es el de los mínimos cuadrados.

Los mismos autores indican que en dicho método se asumen las siguientes premisas:

- La forma de la ecuación que ajustará los datos experimentales es la correcta.
- Los datos utilizados constituyen una muestra representativa del sistema, son independientes y poseen la misma varianza
- La variable independiente, en nuestro caso el tiempo, no presenta error asociado.
- Los errores asociados a los datos experimentales se encuentran distribuidos aleatoriamente.

Un condicionante más de la regresión no lineal por mínimos cuadrados es la necesidad de disponer de unas buenas estimas iniciales de los parámetros, ya que de lo contrario las estimas obtenidas después del procedimiento iterativo no convergerían a los valores óptimos.

Las estimas de los mínimos cuadrados son aquellos valores de los parámetros (θ) que minimizan la suma de las desviaciones al cuadrado entre los valores de concentraciones observadas (y_i) y las predichas por el modelo ensayado (C_i), siendo la función objetiva o minimizada la dada por la Ecuación 3.112.

$$O_{LS} = \sum_{i=1}^N (y_i - C_i)^2 \quad \text{Ecuación 3.112}$$

donde N es el número de observaciones experimentales.

Sin embargo el procedimiento de los mínimos cuadrados ordinarios (OLS), solo queda justificado para el cálculo de los parámetros del modelo, cuando los errores aleatorios se encuentran normalmente distribuidos y presentan una varianza constante (homocedásticos), es decir cuando todas las observaciones se conocen con el mismo grado de certeza. Sin embargo cuando los datos experimentales no presentan la misma varianza (heterocedásticos) o bien se encuentran en un amplio intervalo de valores (más de un orden de

Material y Métodos

magnitud entre el valor inferior y el superior), se recurre al sistema de la ponderación. En este caso la función objetiva que se minimiza es la de los mínimos cuadrados ponderados (WLS, weighted least squares) (Ecuación 3.113).

$$O_{WLS} = \sum_{i=1}^N W_i (y_i - C_i)^2 \quad \text{Ecuación 3.113}$$

Existen diversos algoritmos de ponderación posibles, sin embargo se ha podido constatar que en farmacocinética, las estimas óptimas de los parámetros del modelo se obtienen cuando se utiliza como factor de ponderación el recíproco de la varianza de los errores $\text{var}(e_i)$. (Ecuaciones 3.114 y 3.115), siendo este el criterio más aceptado desde un punto de vista estadístico, puesto que se da a cada observación un peso equivalente a la imprecisión con que esta se determina.

$$W_i = \frac{\sigma_1^2}{\text{var}(e_i)} \quad \text{Ecuación 3.114}$$

$$\text{var}(e_i) = g_i = \sigma_1^2 \cdot f^\alpha(x_i, \theta) \quad \text{Ecuación 3.115}$$

siendo $\alpha = 0, 1, 2$

Sin embargo para conocer la varianza de cada punto experimental debe disponerse de medidas repetidas del mismo, hecho que no siempre es viable.

No obstante si $y_i \approx f(x_i, \theta)$, es decir los valores de concentración observados se aproximan a los valores predichos por el modelo, entonces de las Ecuaciones 3.111 y 3.112 se deduce que cuando $\alpha=0$, $g_i=\sigma_1^2$ es decir todas las observaciones presentan la misma varianza y por tanto $W_i=1$; cuando $\alpha=1$, $g_i=\sigma_1^2 f(x_i, \theta)$, es decir la varianza es directamente proporcional a la magnitud de la observación y en este caso $W_i=y_i^{-1}$ y cuando $\alpha=2$, $g_i=\sigma_1^2 f^2(x_i, \theta)$, es decir $W_i=y_i^{-2}$. Este sería el factor de ponderación a utilizar cuando en el intervalo de concentraciones ensayadas, el coeficiente de variación es constante, hecho demostrado en aquellos procedimientos analíticos en que se trabaja con

diluciones en serie. Luego teniendo en cuenta que los errores en la determinación de la concentración de fármaco se deben fundamentalmente a la metódica analítica, aunque no deben descartarse otros posibles factores, como paso previo a cada experiencia y a partir de los resultados de la validación de aquella podría establecerse la función matemática que relacione la variable dependiente con su varianza (modelo de varianza) y así conocer el factor de ponderación más conveniente en cada caso.

Además del modelo de varianza en que se hallan implicados los algoritmos de ponderación estándares ($1/y_i$, $1/y_i^2$) que tal y como ya se ha mencionado requieren que $y_i \approx f(x_i, \theta)$, se han propuesto otros modelos de varianza para describir el componente aleatorio de los datos experimentales. El modelo de varianza dado por la Ecuación 3.116 denominado también modelo de potencia, sería la forma general del dado por la Ecuación 3.115, en que la función $f(x_i, \theta)$ se halla elevada a una potencia, pero en este caso, σ_2 puede presentar cualquier valor. Este modelo se distingue del representado por la Ecuación 3.115 en que en este caso son dos los parámetros a determinar, σ_1 y σ_2 , uno de los cuales (σ_2) está relacionado de forma no lineal con la varianza. Este hecho es importante cuando se trabaja con el método de los mínimos cuadrados, puesto que este funciona con algoritmos de ponderación en que el modelo de varianza implícito es lineal (Ecuación 3.115), pero no funciona cuando el modelo de varianza sea el dado por la Ecuación 3.116.

$$\text{var}(e_i) = \sigma_1^2 \cdot f^{n^2}(x_i, \theta) \qquad \text{Ecuación 3.116}$$

En el modelo polinomial (Ecuación 3.117) los tres primeros términos son función de la precisión de la magnitud de los valores observados mediante las diversas métodos utilizadas en la determinación analítica de fármacos. Así por ejemplo el término lineal predomina cuando se utilizan técnicas de contaje de producto marcado radiactivamente, mientras que el término cuadrático es más importante cuando en la metódica analítica se utiliza el procedimiento de

Material y Métodos

diluciones en serie. El término constante podría representar la variabilidad debida al ruido de fondo observado en ausencia de fármaco. Sin embargo, de nuevo el método de los mínimos cuadrados no puede ser utilizado cuando el modelo de varianza implícito presenta más de uno de los términos anteriormente indicados.

$$\text{var}(e_i) = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 \cdot f(\theta, t_i) + \sigma_3^2 \cdot f^2(\theta, x_i) + \dots + \sigma_n^2 \cdot f^n(\theta, x_i)$$

Ecuación 3.117

Otra alternativa posible, aunque menos utilizada, es la aproximación conocida como regresión por mínimos cuadrados reponderados iterativamente (IRWLS) en la que la función objetiva minimizada es la dada por la Ecuación 3.113, pero en este caso los factores de ponderación (W_i) se calculan a partir de los valores de los parámetros estimados o bien a partir de los valores de concentración predichos por el modelo ($f(x_i, \theta)$), después de cada iteración. El procedimiento seguido consiste en:

1. Elegir unas estimas iniciales de los parámetros (θ_0)
2. Calcular los factores de ponderación de acuerdo con la Ecuación 3.118 o bien la Ecuación 3.119.

$$W_i = f(x_i, \theta_0)^{-1} \quad i=1, N \quad \text{Ecuación 3.118}$$

$$W_i = f(x_i, \theta_0)^{-2} \quad \text{Ecuación 3.119}$$

3. Obtener nuevas estimas de los parámetros (θ_1) mediante los factores de ponderación anteriormente calculados en la etapa 2.
4. Si la diferencia $|\theta_0 - \theta_1|$ ya es suficientemente pequeña pueden considerarse correctas las estimas de los parámetros obtenidos; en caso

contrario, se toman como estimas iniciales θ_1 y se repiten las etapas 2-4.

Según Metzler (Metzler, 1987) en la práctica habitual pocas veces se dispone de datos con varianza constante, hecho que obliga a utilizar un determinado esquema de ponderación. Dicho autor sugiere además que la forma exacta de la función de varianza no tiene excesiva relevancia siendo además indiferente utilizar en la ponderación las concentraciones observadas (y_i) o bien las predichas por el modelo $f(x_i, \theta)$, sin embargo lo que sí es importante es utilizar una ponderación no uniforme cuando los errores no son constantes en todas las observaciones. La utilización de un algoritmo de ponderación adecuado es muy importante en el análisis de datos experimentales en farmacocinética, sobretodo cuando lo que se pretende es estimar con la máxima exactitud y precisión los parámetros del modelo, y también poder predecir las concentraciones plasmáticas de fármaco a cualquier tiempo. Efectivamente diversos autores han demostrado en sus trabajos la existencia de amplias discrepancias entre los valores de los parámetros farmacocinéticos, en parte debidas a la utilización de distintos algoritmos de ponderación (Clements y Prescott, 1976; Chennavasin y col., 1981). Por otra parte, los mismos autores han podido comprobar que la predicción de los valores de concentración en estado de equilibrio estacionario, utilizando parámetros resultantes del análisis de los datos experimentales con distintos algoritmos de ponderación es menos sensible a la variación de dichos estimas como consecuencia de la utilización de los diversos algoritmos mencionados.

Según Peck y col. (Peck y col., 1984) la base estadística de la ponderación en el método de los mínimos cuadrados ponderados se halla en la estructura del componente que describe la variabilidad aleatoria de los datos experimentales. Dicha variabilidad debida ya sea a la imprecisión de la metódica analítica, a una inadecuación del modelo farmacocinético seleccionado a priori y posiblemente a otras causas desconocidas presenta a menudo una relación no lineal con la magnitud de $f(x_i, \theta)$. El método de los mínimos cuadrados ponderados que utiliza las ponderaciones estándar $1/y_i$, $1/y_i^2$, es tan solo una aproxima-

ción del modelo general (Ecuación 3.116) restringida a la estimación de un solo parámetro de proporcionalidad σ_1 , con valores de $\sigma_2 = 0, 1$ y 2 . El análisis gráfico propuesto por Boxenbaum y col. (Boxenbaum y col., 1974) carece de objetividad, dando lugar a discrepancias en la elección final del algoritmo de ponderación más adecuado. El método de los mínimos cuadrados reponderados iterativamente elimina la aproximación considerada por el anterior respecto a la relación entre $\text{var}(e_i)$ y $f(x_i, \theta)$, sin embargo también está restringido a un modelo de varianza de un solo parámetro de proporcionalidad (σ_1) (Ecuación 3.115) en que los valores de α deben ser determinados previamente a través del análisis de curvas estándar de forma aislada o bien mediante análisis iterativo, partiendo de valores fijos de α elegidos arbitrariamente.

Todo ello ha llevado a Peck y col. (Peck y col., 1984) a proponer un método alternativo que permite una mayor flexibilidad en la propuesta y estimación de modelos de varianza. En el método de los mínimos cuadrados extendidos (ELS) el modelo de varianza se especifica de forma explícita y no de forma implícita como ocurría en el método de los mínimos cuadrados ponderados (WLS). Por otra parte en dicho método el modelo de varianza puede adoptar cualquier forma incluyendo funciones no lineales de $f(x_i, \theta)$ con más de un parámetro σ (Ecuación 3.116), es decir $\text{var}(e_i) = V[f(x_i, \theta), \sigma]$. En dicho método la estimación simultánea de los parámetros del modelo farmacocinético (θ) y de los parámetros del modelo de varianza (σ) se efectúa minimizando la función objetiva (función log-likelihood) dada por la Ecuación 3.120.

$$ELS = \sum_{i=1}^N \frac{[y_i - f(x_i, \theta)]^2}{V[f(x_i, \theta), \sigma]} + \ln [V(f(x_i, \theta), \sigma)]$$

Ecuación 3.120

El método ELS podría considerarse como una forma general del WLS; es decir siempre que $V[f(x_i, \theta), \sigma]$ adopte la forma de las funciones dadas por la

Ecuación 3.116. En estos casos las estimaciones de θ y σ_1 son idénticas por ambos métodos (ELS y WLS) dentro de la asunción de que $y_i \approx f(x_i, \theta)$. Sin embargo el método ELS permite la utilización de modelos de varianza no restringidos como los dados por las Ecuaciones 3.113 y 3.114. En este sentido dicho método resuelve el problema que se plantea en el momento de la elección del algoritmo de ponderación óptimo al tiempo que permite el ajustado y estimación de los modelos de varianza más adecuados para describir la variabilidad aleatoria de los datos experimentales.

3.6.1.2.3.2. Algoritmos matemáticos utilizados en la estimación de parámetros

La mayor parte de modelos farmacocinéticos no son lineales respecto a sus parámetros motivo por el cual estos no pueden estimarse mediante métodos directos, siendo necesaria la utilización de métodos numéricos iterativos.

Los métodos de regresión no lineal utilizan una serie de procedimientos matemáticos o algoritmos para la minimización de la función objetiva y estimación de parámetros. Los problemas que suelen plantearse en dichos procedimientos son falta de convergencia debido posiblemente a estimas iniciales inadecuadas de los parámetros, o bien a la existencia de más de un mínimo (mínimo verdadero y mínimo local) de forma que unas estimas iniciales malas pueden llevar al mínimo falso (mínimo local). El problema de la obtención de las estimas iniciales de los parámetros adecuadas al modelo o función que se pretende optimizar se abordará en párrafos posteriores.

En general el procedimiento seguido por los distintos algoritmos matemáticos para alcanzar el mínimo se basa en:

1. Disponer de unas estimas iniciales de los parámetros (θ_0)
2. Elegir la dirección que se desea seguir
3. Elegir la longitud de la etapa en dicha dirección para que la función objetiva disminuya

Material y Métodos

4. Evaluar la función a minimizar en la nueva posición (θ_1)
5. Averiguar si puede darse por finalizada la búsqueda; en caso negativo se repiten las etapas 2-4 utilizando θ_1 como estimas de los parámetros.

En lo que concierne a las etapas 2-3 los algoritmos utilizados se basan en dos tipos de estrategia distintos:

- Algoritmos de búsqueda directa
- Algoritmos de gradiente

A. Algoritmos de búsqueda directa

Dichos métodos, únicamente requieren la estimación de la función objetiva sin ser necesario el cálculo de las derivadas parciales de la misma. Dentro de los métodos de búsqueda directa se distinguen:

- Método Grid-Search
- Método Simplex
- Método Powell

A.1. Método Grid-Search

El método Grid-Search se basa en dividir la superficie de respuesta en una especie de "parrilla". La superficie de respuesta es una función que se genera entre los parámetros a determinar y la suma de cuadrados de los residuales correspondientes a la variable dependiente. La "parrilla" debe presentar 3 puntos (1) a lo largo de cada dimensión considerada ($p=2$), el tamaño de malla de la misma representa los incrementos (longitud de la etapa) que se han decidido probar. Se determina el valor de la suma de cuadrados de residuales (SSQ) en cada uno de los puntos de la parrilla y luego se construye una nueva parrilla (de menor tamaño de malla) alrededor del punto que presenta el valor más pequeño de SSQ y así sucesivamente.

Este método es simple y no requiere la utilización de derivadas; en cada etapa de búsqueda el número de funciones objetivas a determinar es de l^p-1 , se trata de un método muy lento y no puede considerarse un buen método de optimización.

A.2. Método Simplex

El método simplex (Spendley y col., 1962)) es un método secuencial que se aproxima al mínimo a través de los movimientos de una figura geométrica con un vértice ($l=p+1$) más que dimensiones tiene la superficie de respuesta (p), es decir un vértice más por parámetro y en la superficie de respuesta un eje espacial más por parámetro. Así por ejemplo en el caso de un triángulo (2 parámetros) se realizan movimientos de reflexión en dicha superficie, de aquel vértice del triángulo que presenta el valor más elevado de SSQ; se calculan los valores de SSQ de los vértices del nuevo triángulo y se efectúa la reflexión del peor de ellos y así sucesivamente. El método simplex modificado introducido por Nelder y Mead (Nelder y Mead, 1965) permite además de la reflexión, la modificación de las dimensiones del triángulo ya sea por expansión o bien contracción. Se trata de un método robusto, es decir posee una capacidad de respuesta adecuada en base a las estimas iniciales utilizadas, es numéricamente simple y siempre acaba convergiendo; sin embargo es un método bastante lento. Es un método bueno para situarse fácilmente en la zona del óptimo, pero es muy malo para precisar el óptimo. Suele utilizarse para la selección de estimas iniciales cuando la complejidad del modelo farmacocinético utilizado lo requiere. En caso de que se desee utilizar para la determinación de estimas finales se recomienda cebarlo dos veces. Por otra parte, algunos de los programas que utilizan el método simplex presentan la desventaja de no proporcionar los valores de las desviaciones estándar de los parámetros estimados.

B. Algoritmos de gradiente

Los métodos de gradiente intentan aproximar la función objetivo a una función cuadrática y luego hallar el mínimo de esta, para ello se requiere conocer el gradiente (primera derivada) o pendiente que va hacia el mínimo local y la segunda derivada de θ_0 con respecto a θ .

Algunos de los métodos de gradiente a destacar son (Motulsky y Ransnas, 1987):

- Método steepest descent
- Método de Gauss-Newton
- Método de Gauss-Newton modificado por Hartley
- Método de Marquardt
- Método de Gauss-Newton con la modificación de Levenberg

De todos ellos comentaremos únicamente aquellos utilizados por los programas empleados en el tratamiento de datos experimentales de la presente Memoria.

B.1. Método Steepest descent

El método Steepest descent se mueve desde la posición inicial en la dirección de disminución de la suma de cuadrados, luego calcula la pendiente en la nueva posición y se repite el proceso. Este método se basa pues en hallar el mínimo tras repetidos movimientos en sentido descendente de la pendiente. A pesar de que después de las primeras iteraciones se avanza rápidamente hacia el mínimo, las últimas suelen realizar bastantes movimientos en zig-zag antes de alcanzar el mínimo, especialmente cuando la longitud del movimiento en cada etapa es grande; por tanto se requieren bastantes iteraciones antes de que el método converja en una solución.

B.2. Método de Gauss-Newton

El método de Gauss-Newton utiliza una aproximación lineal es decir considera ecuaciones polinomiales de forma en las que el valor de la variable dependiente y es lineal respecto a cada uno de los parámetros de la ecuación. Concretamente dicho método utiliza una aproximación tal de forma que se genere una superficie elipsoide simétrica. Desde la posición inicial el algoritmo puede proyectar el elipsoide completo, con ello se van modificando los valores de los parámetros hasta alcanzar el mínimo de la suma de cuadrados de residuales. Gracias a las funciones lineales respecto a los parámetros el método de Gauss-Newton halla inmediatamente la solución sin necesidad de muchas iteraciones. El método de Gauss-Newton es adecuado cuando se dispone de estimas iniciales buenas de forma que se esté cerca del mínimo; en caso contrario puede ocurrir que se mueva en una dirección incorrecta empeorando el ajustado.

B.3. Método de Gauss-Newton con la modificación de Levenberg

Tanto este método como el de Marquardt (Marquardt, 1963), combinan las ventajas del método Steepest descent y del Gauss-Newton. Puesto que el primero de ellos trabaja bien en las primeras iteraciones y el segundo lo hace cuando ya se está cerca del mínimo, con la modificación de Levenberg se aplica repetidamente el método Steepest descent hasta minimizar considerablemente la suma de cuadrados de residuales, y en el momento en que esta ya no disminuye más se utiliza la aproximación del método de Gauss-Newton.

B.4. Método de Gauss-Newton modificado por Hartley

La modificación introducida por Hartley (Hartley, 1961) consiste en que después de cada iteración la suma de cuadrados debe disminuir.

Este método no es tan robusto como el de Gauss-Newton con la modificación de Levenberg, pero es extremadamente rápido. No es aconsejable para el ajustado de modelos complejos.

3.6.1.2.3.3. Obtención de las estimas iniciales de los parámetros farmacocinéticos

Las estimas iniciales de los parámetros farmacocinéticos para cebar los programas que utilizan métodos de regresión no lineal pueden obtenerse mediante determinados métodos matemáticos o gráficos como por ejemplo linealización entendiéndose por tal la transformación de la variable dependiente con objeto de obtener algún tipo de relación lineal entre esta y la independiente.

Se han descrito diversos métodos gráfico-numéricos para obtener estimas iniciales para modelos poliexponenciales; de entre ellos, el método de los residuales también conocido como método de la retroproyección o bien en términos anglosajones "stripping" (Wagner, 1975)) es el método clásico más utilizado.

Tal como ya se ha mencionado en párrafos anteriores, en un sistema compartimental lineal se asume que el comportamiento cinético de un fármaco puede describirse por la suma de términos exponenciales (Ecuación 3.121).

$$y = \sum_{i=1}^m C_i \cdot e^{-K_i \cdot t} \qquad \text{Ecuación 3.121}$$

siendo C el valor de la concentración a un tiempo dado t, y C_i y K_i los coeficientes y exponentes respectivamente de cada uno de los sumandos.

El método de los residuales permite comprobar si los datos experimentales de que se dispone pueden ser descritos por una suma de términos exponenciales, a la vez que proporciona las estimas de los coeficientes C_i y de los exponentes K_i . En dicho método se asume que después de un tiempo suficientemente largo $t > T_1$ los primeros $m-1$ términos exponenciales se anulan, a pesar de que teóricamente para que un término exponencial se anule se requiere un tiempo infinito, sin embargo puede demostrarse que transcurridas 7 semividas el porcentaje de fármaco remanente en el organismo es despreciable ($< 1\%$). De este modo para $t > T_1$, la Ecuación poliexponencial se transforma en una monoexponencial (Ecuación 3.122) representativa de las observaciones de la fase terminal que puede linearizarse mediante la aplicación de logaritmos neperianos a ambos términos de la misma (Ecuación 3.123). Como consecuencia por regresión lineal de la fase monoexponencial terminal pueden estimarse los valores de C_m (antilogaritmo de la ordenada en el origen) y K_m (valor absoluto de la pendiente).

$$y = C_m \cdot e^{-K_m \cdot t} \qquad \text{Ecuación 3.122}$$

$$\ln y = \ln C_m - K_m \cdot t \qquad \text{Ecuación 3.123}$$

Seguidamente se calculan los residuales restando los valores estimados en la fase monoexponencial terminal a los valores experimentales restantes de acuerdo con la Ecuación 3.124.

$$R_{1,i} = Y_i - C_m \cdot e^{-K_m \cdot t_i} \qquad \text{Ecuación 3.124}$$

siendo $t_i < T_1$

En general asumiendo siempre que para cualquier $t > T_k$, los primeros $m-k$ términos exponenciales se anulan y procediendo del modo ya indicado se

Material y Métodos

consigue desglosar la ecuación poliexponencial en cada uno de sus términos monoexponenciales y determinar así todos los parámetros de la misma.

El método de los residuales es satisfactorio siempre y cuando se cumpla que $K_1 > K_2 > K_3 \dots > K_m$; es decir se asume que existe una clara diferenciación entre los valores de K_i , los términos exponenciales no se superponen y como consecuencia sus parámetros pueden estimarse de forma aislada. Efectivamente, si consideramos un proceso representado por la suma de dos términos exponenciales con constantes K_1 y K_2 , una relación entre ambas igual o inferior a 2 puede llevar a errores importantes en la estimación de ambas constantes, e incluso a la imposibilidad de la identificación de la existencia de una de ellas.

Se trata de un método que puede aplicarse ya sea gráficamente (en papel semilogarítmico), lo cual permite disponer tan solo de valores aproximados de los coeficientes y exponentes, o bien por regresión lineal. Para ello el experimentador debe escoger los puntos que pertenecen a cada una de las fases, empezando por la fase terminal, efectuar la regresión entre los valores de los logaritmos de las concentraciones residuales y de los tiempos y a partir de aquí estimar los valores de C_i y K_i tal como se ha descrito anteriormente. Este procedimiento puede realizarse con una simple calculadora, sin embargo existen programas de ordenador desarrollados para este fin que luego se comentarán.

En dichos programas, la regresión lineal se efectúa mediante el método de los mínimos cuadrados permitiendo trabajar también con distintos algoritmos de ponderación.

No obstante, la complejidad matemática de determinados modelos farmacocinéticos dificulta el cálculo de las estimas iniciales de determinados parámetros farmacocinéticos mediante métodos de regresión lineal, hecho que aconseja la utilización de algoritmos más potentes como por ejemplo los de

búsqueda directa, en el marco de la regresión no lineal, siendo el método simplex el más utilizado.

Cabe destacar que puesto que se trata de estimas iniciales, estas no requieren ser determinadas con una gran precisión, no obstante no hay que olvidar que la calidad de las estimas finales de los parámetros dependerá de los valores iniciales de los mismos. Según Boxenbaum y col. (Boxenbaum y col., 1974) las estimas finales de los parámetros solo convergerán a su valor verdadero si las estimas iniciales son lo suficientemente próximas a dichos valores verdaderos. Por otra parte si las estimas finales no son las que cabría esperar a partir de estimas iniciales correctas, entonces será necesario revisar el modelo o bien los datos experimentales.

3.6.1.2.3.4. Bondad del ajustado y selección del modelo farmacocinético óptimo

Una vez seleccionado el modelo farmacocinético a ensayar, la ponderación estadística, las estimas iniciales de los parámetros y el algoritmo de minimización, la etapa siguiente consiste en efectuar el ajuste mediante el programa de ordenador de elección y obtener las estimas definitivas de los parámetros farmacocinéticos. Naturalmente para ello es requisito indispensable que el programa de ordenador utilizado alcance la convergencia, siendo este uno de los criterios para evaluar la bondad del ajustado obtenido. El valor de los parámetros así como la precisión con que se estimen dependerá de la correcta

selección del modelo farmacocinético, de las estimas iniciales de que se disponga y de una adecuada selección de los datos experimentales.

Las desviaciones estándar de los parámetros determinados por el método de los mínimos cuadrados constituyen una medida de la precisión con que estos se estiman, precisión que por otra parte se tendrá en cuenta en la selección del modelo farmacocinético óptimo; El cálculo de las desviaciones estándar se efectúa de acuerdo con la Ecuación 3.125.

$$SD = (S^2 \cdot v^{jj})^{1/2}$$

Ecuación 3.125

siendo SD la desviación estándar de la estimación j de un parámetro dado, S² la suma ponderada de las desviaciones al cuadrado entre los valores observados y los valores teóricos predichos por el modelo, dividida por el número de grados de libertad y v^{jj} es el elemento j de la diagonal de la matriz de covarianza V⁻¹, siendo la matriz de varianzas V, la suma de productos cruzados de algunas derivadas parciales, para cuya evaluación se utilizan algoritmos de gradiente. Valores elevados de SD con respecto al valor absoluto del parámetro son indicativos de que las estimas del parámetro dentro de un amplio intervalo de valores del mismo pueden proporcionar ajustados similares, en cuanto a bondad se refiere, de los datos experimentales; como consecuencia de ello dichos parámetros no pueden considerarse bien estimados.

Otro modo de expresar la precisión de un parámetro es el coeficiente de variación (Ecuación 3.126)

$$CV (\%) = \frac{SD}{\theta_i} \cdot 100$$

Ecuación 3.126

siendo θ_i el valor estimado del parámetro. Si el CV % es superior al 50 %, la falta de precisión se considera demasiado grande para ser aceptada.

Por otra parte es importante conocer si existe interdependencia entre los parámetros estimados por el modelo. La matriz de correlación, obtenida a partir de la matriz de varianzas (V) y cuyos elementos vienen dados por la Ecuación 3.127, informa acerca de ello de forma que la existencia de una elevada correlación entre dos parámetros dados (j,k) indicará que los datos experimentales impiden que dichos parámetros sean claramente diferenciables.

$$C(j,k) = \frac{V(j,k)}{[V(j,j) \cdot V(k,k)]^{1/2}}$$

Ecuación 3.127

El problema de la selección del modelo farmacocinético óptimo puede empezar a abordarse mediante el examen visual del gráfico correspondiente al ajustado del modelo en cuestión, a los datos experimentales.

Aunque en principio no existe ningún criterio absoluto respecto a la selección de modelos farmacocinéticos, en general son dos los objetivos que se persiguen, en primer lugar una distribución aleatoria de las observaciones experimentales respecto a las teóricas predichas por el modelo, y en segundo lugar que la suma ponderada de cuadrados de residuales sea mínima.

El estudio de la distribución aleatoria de las observaciones experimentales respecto a la curva teórica se efectúa mediante lo que se conoce como análisis de residuales que consiste en la representación gráfica de los valores residuales ponderados frente a los valores predichos de la variable dependiente o bien frente a los valores de la variable independiente (tiempo). En este tipo de representación cualquier "outlier" o valor residual ponderado que se aparte considerablemente de los demás (aproximadamente 3 o 4 veces la desviación estándar del valor medio de los residuales restantes), puede ser detectado rápidamente, indicando la existencia de una desviación de la observación correspondiente, respecto del modelo propuesto. Aunque dicho ensayo aporta información acerca de la bondad del ajuste, no puede aplicarse como único criterio para juzgar la bondad del ajustado obtenido.

En modelos farmacocinéticos lineales, el aumento del número de términos exponenciales en la ecuación poliexponencial que pretende explicar los datos experimentales supone una reducción de la suma de cuadrados de los residuales, pero por otra parte ello implica también una mayor complejidad matemática. Por este motivo es conveniente averiguar desde un punto de vista

Material y Métodos

estadístico si el aumento del número de parámetros reduce significativamente la suma ponderada de cuadrados de residuales de tal forma que quede justificado el ajustado de los datos experimentales con un modelo más complejo. Para ello se aplica un test F, en el que se comparan las sumas ponderadas de cuadrados de residuales de cada uno de los modelos ensayados (WSS_j, WSS_k) (Ecuación 3.128).

$$F = \left[\frac{WSS_j - WSS_k}{WSS_k} \right] \cdot \left[\frac{df_k}{df_j - df_k} \right] \quad \text{Ecuación 3.128}$$

siendo df el número de grados de libertad que equivale al número de datos experimentales utilizados en el ajustado menos el número de parámetros del modelo, $df_j > df_k$. El valor de F calculado puede compararse con el valor dado por las tablas para un nivel de significación del 95%, para df_k y $(df_j - df_k)$ grados de libertad.

Cuando la función objetiva minimizada es la de los mínimos cuadrados ordinarios, el coeficiente de determinación r^2 permite evaluar de forma correcta la bondad del ajustado. Teniendo en cuenta que la variación total de la variable dependiente puede descomponerse en la suma de la variación explicada por el modelo y de la parte no explicada o residual (e_i), el coeficiente de determinación equivale a la relación entre la variación explicada por el ajustado y la variación total, dadas a su vez por las correspondientes sumas de cuadrados (Ecuación 3.129), de forma que cuanto más se aproxime a la unidad el valor de dicho parámetro mayor tanto por uno de la variación total será explicada por los valores predichos por el modelo.

$$r^2 = \frac{SSQ_{\text{modelo}}}{SSQ_{\text{total}}} \quad \text{Ecuación 3.129}$$

En ocasiones, se habla de coeficiente de correlación múltiple (r) en lugar de coeficiente de determinación (r^2), siendo el primero igual a la raíz cuadrada del segundo.

Otro criterio, aplicado por Yamaoka y col. (Yamaoka y col., 1978a) a modelos farmacocinéticos lineales, es el criterio de Akaike, también conocido como criterio de MAICE o mínimo valor de AIC. Asumiendo que los errores aleatorios de los datos experimentales obedecen a una distribución normal, el valor de AIC se define de acuerdo con la Ecuación 3.130.

$$AIC = N \cdot \ln SSQ + 2 \cdot p \qquad \text{Ecuación 3.130}$$

siendo N el número de datos experimentales, p el número de parámetros del modelo y SSQ la suma ponderada de cuadrados de residuales bajo la hipótesis de que estos pertenecen a una distribución normal. Este criterio considera simultáneamente la bondad del ajustado y el número de parámetros cuando se comparan modelos. La ecuación o el modelo con el valor más pequeño de AIC será el que mejor explique los datos experimentales, ahora bien en el caso de que dos modelos distintos presenten el mismo valor de AIC, dicho criterio se decanta por aquel con menor número de parámetros de acuerdo con el principio de la parsimonia. Como consecuencia la aplicación de este criterio estadístico no requiere la utilización del estadístico F .

En algunas ocasiones el valor de AIC se expresa también de acuerdo con la Ecuación 3.131

$$- AIC = - \log \textit{likelihood} + p \qquad \text{Ecuación 3.131}$$

siendo la función $\log \textit{likelihood}$ equivalente a la suma de cuadrados de residuales bajo la hipótesis de una distribución normal (Ecuación 3.132).

$$-2 \log \text{likelihood} = n \cdot \ln (2\pi) + WSS \qquad \text{Ecuación 3.132}$$

siendo WSS el valor de la función objetiva

Otros criterios también utilizados por determinados programas son el criterio de Schwarz (Ecuación 3.133) y el criterio de Leonard (Ecuación 3.134)

$$\text{Schwarz} = - \log \text{likelihood} + 1/2 \cdot p \cdot \ln H \qquad \text{Ecuación 3.133}$$

$$L = - \log \text{likelihood} - 1/2 \cdot p \cdot \ln 2\pi + 1/2 \cdot \ln H \qquad \text{Ecuación 3.134}$$

siendo H el determinante de la matriz de segundas derivadas parciales de los valores de y respecto a los parámetros.

Cuando el método de regresión no lineal utilizado es el de los mínimos cuadrados extendidos (ELS), existen programas que consideran como valor de p, en las ecuaciones anteriormente expuestas, únicamente el número de parámetros del modelo estructural correspondiente (ELSMOS), sin embargo otros incluyen también aquí los parámetros correspondientes a la función de error (SIPHAR).

Debe destacarse que todos los criterios estadísticos citados se refieren a los modelos que se ajustan a los datos, pero no reflejan en ningún momento la contribución del modelo de error, salvo en aquellos casos en que este se halle incluido en la función objetiva que se minimiza.

Cuando el ajustado de un determinado modelo a los datos experimentales proporciona una distribución aleatoria de los residuales y además un aumento en el número de parámetros no reduce significativamente la suma ponderada de las desviaciones al cuadrado, el modelo puede considerarse

correcto. El hecho de que un modelo sea consistente no significa que sea el único posible, de hecho esto ocurre cuando los datos experimentales no aportan la suficiente información para definir el modelo elegido, de modo que estos pueden ser ajustados igual de bien por más de un modelo, de tal forma que dichos modelos sean equiprobables y por tanto imposible seleccionar el modelo óptimo únicamente desde el punto de vista de los mínimos cuadrados.

3.6.1.2.3.5. Programas utilizados en el ajustado de los datos experimentales

A. Estudios en animales de experimentación

Los estudios en animales de experimentación se han realizado en una etapa previa a los estudios en voluntarios sanos y por esta razón no existe uniformidad en cuanto a los programas utilizados en el tratamiento de datos en ambos casos.

Programa JANA

El programa JANA se ha utilizado para la obtención de las estimas iniciales de los parámetros correspondientes al estudio cinético llevado a cabo en el perro, tanto tras la administración intravenosa como tras la administración oral del fármaco.

Dicho programa utiliza la técnica del "stripping", introduciendo una nueva aproximación de forma que no se requiere hacer ninguna asunción respecto al valor de la relación entre los exponentes de las ecuaciones poliexponenciales. Este nuevo procedimiento corrige iterativamente la superposición de los términos exponenciales (Dunne, 1985, 1986). Para ello parte de la consideración de que no es necesario que a valores $t > T_k$ deba asumirse que los $m-k$ términos exponenciales más elevados se anulen totalmente (Ecuación 3.135); estos pueden ser determinados a los tiempos t_i y luego restarse

Material y Métodos

de los correspondientes R_{k-1} (ó bien y_i cuando $k=1$) para obtener los residuales corregidos (R^*) de acuerdo con la Ecuación 3.136.

$$\sum_{j=1}^{m-k} C_j \cdot \exp(-K_j \cdot t) = 0 \quad \text{Ecuación 3.135}$$

$$R_{k-1,i}^* = R_{k-1,i} - \sum_{j=1}^{m-k} C_j \cdot \exp(-K_j \cdot t_i) \quad \text{Ecuación 3.136}$$

Sin embargo el segundo término de la Ecuación 3.135 no puede ser evaluado puesto que se desconocen los valores de C_j y k_j , para obviar este problema, el programa JANA opera del siguiente modo:

1. Obtiene las estimas iniciales de los parámetros asumiendo que para $t > T_k$ los primeros $m-k$ términos exponenciales se anulan.
2. Corrige los datos experimentales de acuerdo con las Ecuaciones utilizando las estimas iniciales anteriormente calculadas.
3. Determina de nuevo las estimas de los parámetros aplicando la técnica del stripping a los datos corregidos.
4. Repite las etapas 2-3 hasta que las estimas halladas no mejoran con respecto a las anteriormente obtenidas.

Los algoritmos de ponderación que permite seleccionar el programa, bajo criterio del experimentador, son 1, $1/y$, $1/y^2$ y $1/(y)^{1/2}$; existe una última opción que permite especificar la ponderación deseada para cada una de las observaciones experimentales en el archivo de entrada de datos. Los pesos son normalizados por el programa de forma que la suma total de todos ellos es igual al número de observaciones experimentales. Cabe destacar que los datos se introducen en un formato de tres columnas, la primera de ellas para los valores de tiempo, la segunda para valores de concentración y la última para los valores de ponderación cuando se desee incluirla aquí; este formato es compatible con

el utilizado por el programa de regresión no lineal PCNONLIN. En nuestro caso concreto, los datos experimentales se han ponderado por $1/y^2$.

El programa JANA es un programa interactivo que permite decidir al usuario el número máximo de términos exponenciales deseados en la función poliexponencial que se pretende ajustar, y seguidamente ajusta los datos empezando por un término exponencial en el caso de la vía intravenosa, y dos términos exponenciales en el caso de la vía oral, añadiendo luego cada vez un nuevo término a la ecuación, hasta el máximo número fijado por el usuario. El programa considera todas las posibilidades de reparto de los datos experimentales entre los distintos términos exponenciales, tomando como mínimo dos puntos en cada fase exponencial. Para los datos experimentales obtenidos tras la administración intravenosa (bolus) de cianamida en rata y perro se ha elegido un máximo de tres términos exponenciales. En el caso de la administración oral, se ha seleccionado también el mismo máximo de términos exponenciales en ambas especies.

Se utiliza un criterio de convergencia para decidir en que momento debe terminar el proceso iterativo, y también se especifica el número máximo de iteraciones que se desea el programa realice aún cuando no se haya satisfecho el criterio de convergencia.

En el caso de las administraciones extravasales el programa permite, en función de los datos experimentales de que se dispone, considerar la existencia de un tiempo de latencia, pero dado que la cianamida administrada en solución oral presenta una absorción muy rápida, este no se ha tenido en cuenta.

Finalmente el programa proporciona los valores de los parámetros estimados y el número de puntos considerado en cada fase monoexponencial para obtener dichas estimas, también presenta la suma total de cuadrados corregida, la suma ponderada de cuadrados de los residuales y el coeficiente de determinación (r^2).

Programa ELSMOS

El programa ELSMOS es un programa de regresión no lineal escrito en FORTRAN IV (Francis, 1984) que se ha utilizado para la obtención de las estimas definitivas de los parámetros farmacocinéticos determinados tras la administración intravenosa y oral de cianamida al perro. Dicho programa muestra las siguientes posibilidades:

- Utiliza para el ajustado de los datos experimentales y como única opción el método de los mínimos cuadrados extendidos (ELS), siendo por tanto la función objetiva minimizada la dada por la Ecuación 3.137.

$$ELS = \sum_{i=1}^N \left[\left[\frac{(y_i - FUN)}{SEF} \right]^2 + \ln (SEF^2) \right] \quad \text{Ecuación 3.137}$$

- Presenta distintos modelos estructurales (FUN), definidos en forma de ecuaciones polixponenciales, en una subrutina separada de los modelos de error (SEF), de tal forma que para un modelo estructural dado se pueden ajustar los datos experimentales ensayando distintos modelos de varianza.
- Opera con el algoritmo de Gauss-Newton modificado por Hartley, para la minimización de la función objetiva.
- La salida de resultados muestra los valores de las concentraciones observadas y predichas, así como los valores de los residuales estandarizados y los correspondientes a la función de error (SEF) para cada tiempo experimental. Asimismo, presenta los valores de los parámetros de cada modelo con sus errores estándar y coeficientes de variación porcentual, la matriz de varianza-covarianza de los coeficientes del modelo ajustado y la matriz de correlación entre los parámetros.

- Los parámetros estadísticos para la comparación entre modelos alternativos que muestra el programa son el coeficiente de correlación múltiple, la función loglikelihood, y los criterios de Akaike, Schwarz y Leonard.
- Con respecto a la salida gráfica, dicho programa permite disponer de las curvas ajustadas de concentración plasmática tiempo, así como de las curvas de correlación entre concentraciones experimentales y predichas por el modelo y de las representaciones gráficas de los residuales y de los residuales estandarizados frente a las concentraciones predichas.

En la presente Memoria se ha utilizado la función 1 (FUN 1) (Ecuación 3.138) para el ajustado de los datos experimentales obtenidos ya sea tras la administración intravenosa o bien oral del fármaco al perro, siendo la función de error utilizada en ambos casos la función SEF 1 (Ecuación 3.139)

$$P = (K_2 + K_4 + K_6) \cdot \text{EXP} [-K_1 \cdot (T-K_8)] + K_2 \cdot \text{EXP} [-K_3 \cdot (T-K_8)] \\ + K_4 \cdot \text{EXP} [-K_5 \cdot (T-K_8)] + K_6 \cdot \text{EXP} [-K_7 \cdot (T-K_8)]$$

Ecuación 3.138

En la Ecuación 3.138 los valores de K_1 y K_8 son iguales a cero si los datos que se ajustan proceden de una administración en bolus intravenoso; por otra parte, si los datos son orales el valor de K_8 es igual a cero siempre que no exista tiempo de latencia. En cuanto a los valores de los demás coeficientes de la Ecuación (K_2 - K_7) se les dará un valor fijo igual a cero o bien igual al de la estima inicial correspondiente proporcionada por el programa JANA en función del modelo que se pretenda ajustar (mono-, bi- o tricompartmental en el caso de los datos intravenosos, o bien biexponencial o triexponencial en el caso de los datos orales).

$$SEF1 = \sqrt{\text{Var}(e_j)} = \sqrt{K_1^2 + K_2^2 \cdot (K_2 \cdot \text{FUN})^{K_2}}$$

Ecuación 3.139

Para la selección del modelo farmacocinético óptimo se ha considerado tanto el criterio de Akaike o mínimo valor de AIC, como la precisión de los parámetros estimados por cada modelo (CV%).

Programa PCNONLIN

El programa PCNONLIN (Metzler, 1992) es un programa de regresión no lineal que permite controlar muchos factores para la correcta estimación de los parámetros farmacocinéticos. Entre sus posibilidades podrían citarse las siguientes:

- Cálculo automático de las estimas iniciales de los parámetros, siempre y cuando el modelo utilizado pertenezca a la librería del programa.
- Posee una librería de los modelos más utilizados cuyas ecuaciones matemáticas representativas están definidas en forma de ecuaciones diferenciales
- Permite confeccionar nuevos modelos de acuerdo con las propias necesidades del usuario
- Dentro de cada modelo permite definir las ecuaciones de todos los parámetros principales o secundarios que se desee estimar
- Permite establecer los límites inferior y superior de los valores de los parámetros
- Opera con el procedimiento de los mínimos cuadrados ponderados o bien reponderados, pero no con el de los mínimos cuadrados extendidos. Permite igual como en el caso del programa JANA introducir el factor de ponderación deseado para cada dato experimental dentro del archivo de datos.
- Puede trabajar con 3 algoritmos de minimización de la función objetiva distintos, concretamente el algoritmo Simplex propuesto por Nelder y Mead (1), el algoritmo de Gauss-Newton con la modificación de Levenberg, que es con el que el programa opera por defecto (2) y el algoritmo de Gauss-Newton modificado por Hartley (3).

- Permite efectuar ajustados múltiples, es decir ajustar simultáneamente una misma función a varias series de datos experimentales.
- Permite calcular nuevos parámetros a partir de los ya estimados
- La salida de resultados proporciona los valores de las concentraciones predichas, de los residuales, de las desviaciones estándar y de los residuales estandarizados; proporciona también la suma de cuadrados de residuales sin ponderar y ponderados, tanto de las curvas individuales, como de las curvas combinadas en el caso de un ajustado simultáneo, el coeficiente de correlación y el número de grados de libertad para cada modelo y también los valores de los parámetros estimados, su error estándar y el intervalo de confianza para un nivel de significación del 95%. La salida gráfica presenta las curvas ajustadas así como las curvas de los residuales ponderados frente a los valores predichos ponderados o bien frente a los valores del tiempo.

El ajustado de los resultados experimentales correspondientes a la rata, se ha realizado mediante el programa PCNONLIN, también utilizado en el tratamiento de los resultados experimentales obtenidos tras la administración oral del fármaco a voluntarios sanos. Concretamente, en el caso de la rata se han ensayado los modelos 1 (monocompartimental) y 7 (bicompartimental) tras la administración de la cianamida en bolus intravenoso, y los modelos 3 (biexponencial) y 11 (triexponencial) tras la administración oral del fármaco, todos ellos pertenecientes a la librería del programa. El ajustado se ha efectuado sin ponderación de los datos experimentales y se ha utilizado como algoritmo de minimización el de Gauss-Newton con la modificación de Levenberg. Por otra parte, se han ensayado dos ajustados simultáneos de los datos experimentales intravenosos y orales mediante dos modelos (uno correspondiente al modelo mono- y el otro al bicompartimental) no pertenecientes a la librería del programa, y cuyos listados se presentan en el Apéndice I de la presente Memoria.

B. Estudios en voluntarios sanos

Tanto las estimas iniciales como definitivas de los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intravenosa de cianamida a voluntarios sanos se han determinado mediante el programa SIPHAR (Gomeni, 1991)

Programa SIPHAR

El programa SIPHAR es un programa modular, interactivo, que permite mediante la subrutina "Modelos exponenciales" ajustar con bastante rapidez, distintos modelos estructurales (definidos en forma de ecuaciones poliexponenciales) dada una determinada vía de administración (ya se trate de bolus iv, infusión iv o bien administración extravasal) a los mismos datos experimentales variando de forma dinámica la estructura del modelo de error asociado a los mismos.

El mismo programa dispone de un algoritmo (peeling) (Gomeni y Gomeni, 1978) que permite obtener estimas iniciales de los parámetros. El usuario puede disponer de las concentraciones plasmáticas en función del tiempo representadas en escala semilogarítmica y a partir de ahí decidir el número óptimo de exponenciales para describir esos datos así como el número de observaciones de cada fase exponencial y comprobar también visualmente la bondad del ajustado. A partir de las estimas iniciales obtenidas por el método anteriormente descrito, el programa dispone de dos algoritmos numéricos para minimizar la función objetiva por regresión no lineal, el algoritmo POWELL (Gomeni, 1991) y el de Gauss-Newton modificado por Hartley (Hartley, 1961). El primero de ellos es el que funciona por defecto y ha sido el utilizado en la presente memoria. El criterio de convergencia utilizado es 0.00001, es decir el

programa interrumpe la búsqueda cuando el cambio fraccional de la función objetiva (L) en dos etapas consecutivas es inferior a dicho valor (Ecuación 3.140).

$$\left| \frac{L [p(i)] - L [p(i+1)]}{L [p(i)]} \right| < 0.00001$$

Ecuación 3.140

Por otra parte la estimación de parámetros puede efectuarse por el método de los mínimos cuadrados ponderados (WLS) ($W=1, 1/y, 1/y^2$, ó bien una ponderación introducida por el usuario en el archivo de datos que suele corresponder a la varianza de las observaciones medidas, en caso de que se disponga de medidas repetidas), ó bien por el método de los mínimos cuadrados extendidos (ELS).

El programa SIPHAR proporciona los valores de las concentraciones predichas, los valores residuales y los residuales estandarizados, proporciona también las desviaciones estándar y los coeficientes de variación de los parámetros estimados, así como los gráficos de los residuales y residuales estandarizados frente a los valores predichos de concentración y frente al tiempo, la matriz varianza-covarianza y la matriz de correlación. Además de los parámetros obtenidos a partir del modelo, también calcula el valor de AUC, MRT, Cl y Vd_b por el procedimiento no compartimental.

Los parámetros estadísticos que presenta el programa son el criterio de Akaike, el valor de la función log likelihood, el valor de la suma de cuadrados de residuales y el de la la función objetiva utilizada, el criterio de Schwartz y el criterio de Leonard.

Los datos de concentración plasmática-tiempo hallados tras la infusión intravenosa de cianamida a voluntarios sanos han sido ajustados mediante las funciones triexponencial, biexponencial y monoexponencial, previa obtención de

las estimas iniciales con el algoritmo peeling ensayando en cada uno de los casos tanto el procedimiento de los mínimos cuadrados ponderados ($1/y$, $1/y^2$) (Metzler, 1987), como el método de los mínimos cuadrados extendidos (Peck y col., 1984). Las funciones matemáticas para ajustar datos de infusión intravenosa tienen la forma de la Ecuación 3.62, es decir después del ajustado el programa proporciona directamente los valores de A y B en lugar de R y S como coeficientes. El usuario debe introducir además de los datos experimentales de concentración plasmática-tiempo, el tiempo de infusión. Entre todos los algoritmos de ponderación ensayados, se ha optado por el método de los mínimos cuadrados extendidos y luego se ha seleccionado el modelo farmacocinético óptimo siempre en base al mínimo valor de AIC y a los valores de los CV% de los parámetros farmacocinéticos.

El programa SIPHAR posee una subrutina que permite determinar la velocidad de absorción de fármacos por distintos métodos (Wagner-Nelson, Loo-Riegelmann, y Deconvolución). La estimación de la constante de velocidad de absorción plantea bastantes problemas. Cuando los datos experimentales de que se dispone son concentraciones plasmáticas tras una administración extravasal del fármaco, conviene determinar el valor de la constante de velocidad de eliminación en una experiencia independiente vía intravenosa si se desea disponer de una correcta estimación de la constante de velocidad de absorción.

El intento fallido de ajustar las curvas de niveles plasmáticos obtenidas tras la administración de las tres dosis orales de cianamida al mismo modelo para todos los voluntarios nos ha llevado a determinar el grado de absorción del fármaco por el método de Loo-Riegelmann. Para ello el programa SIPHAR requiere los valores de concentración plasmática-tiempo obtenidos tras administración de cada una de las dosis orales (0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg), así como los valores de las constantes de disposición α y β y de los coeficientes A_0 y B_0 obtenidos tras el ajustado previo de los datos intravenosos, con este mismo programa. A partir de dichos valores calcula el valor de las microconstantes (K_{12} ,

K_{21} y K_{10}) y del volumen de distribución (V_c). En este caso la salida de resultados proporciona los porcentajes de fármaco absorbido y remanente a cada tiempo así como las representaciones gráficas correspondientes y también los valores de los tiempos en que se ha absorbido un 10, 50 y 90 % de la cantidad de fármaco susceptible de absorberse en cada caso.

En el análisis de los datos experimentales obtenidos tras la administración oral del fármaco en estudio, a voluntarios sanos, se han postulado tres modelos distintos con objeto de poder explicar el proceso cinético de desaparición de fármaco del lugar de absorción.

En dichos modelos se consideran dos compartimientos, el primero de los corresponde al lugar de absorción (1) desde donde desaparece la cantidad de fármaco absorbida, mientras que el segundo representa el lugar donde accede toda la cantidad de fármaco desaparecida del lugar de absorción antes de alcanzar la circulación sistémica (2). Se asume que la constante de velocidad que rige el proceso de transferencia de (1) a (2) es de primer orden (K_a), pero a la vez se postula una pérdida de fármaco por metabolismo del lugar de absorción cuya cinética es la que distingue a cada uno de los modelos de los otros dos.

Así pues, en el Modelo 1 se considera que la desaparición de fármaco del lugar de absorción se debe únicamente al proceso de absorción de acuerdo con un proceso de orden uno (K_a), en el Modelo 2 se asume que el proceso de desaparición por metabolismo del lugar de absorción sigue una cinética cinética de orden cero (V_M) y en el Modelo 3 una cinética de orden mixto (Michaelis-Menten) (V_M , K_M). Los parámetros que caracterizan cada uno de estos modelos son los que se presentan en la Figura 3.21.

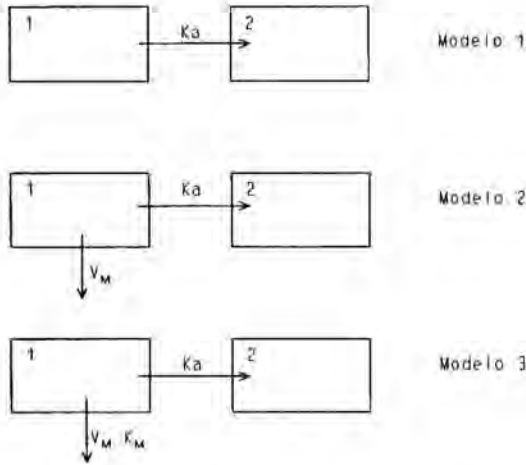


Figura 3.21. Esquema representativo de los modelos 1, 2 y 3 postulados para explicar los datos experimentales obtenidos tras la administración oral de 0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg de cianamida a voluntarios sanos.

Puesto que únicamente se disponía de valores de concentración plasmática de fármaco, debido a que en este caso el lugar de absorción no es muestreable, cada uno de estos modelos se ha ajustado a los valores de cantidades de fármaco absorbidas ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en función del tiempo, determinadas estas a partir de los valores del grado de absorción, estimados a su vez a partir del método de Loo-Riegelmann, y de la Biodisponibilidad obtenida después del tratamiento no compartimental de los datos experimentales, para cada uno de los voluntarios y para cada una de las tres dosis orales ensayadas.

Para el ajustado de dichos modelos a nuestros datos experimentales se ha utilizado el programa PCNONLIN versión 3.1 (Metzler,1992), cuyas características ya se han presentado en párrafos anteriores.

En nuestro caso concreto se han definido por separado los 3 modelos postulados (Modelos 1, 2 y 3) y se ha efectuado un ajustado simultáneo de cada uno de ellos a las tres series de datos obtenidos tras las tres dosis orales (0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg) de cianamida a voluntarios sanos. Con el ajustado simultáneo se

obtienen los valores de los parámetros, correspondientes a cada uno de los modelos ensayados, que mejor satisfacen conjuntamente los datos experimentales provenientes de las tres dosis ensayadas. Los listados de definición de cada uno de estos modelos (modelos 1, 2 y 3), así como del archivo que incluye los comandos necesarios para realizar el ajustado simultáneo en los tres casos se incluyen en el Apéndice I. Después de ensayar los tres algoritmos de minimización posibles nos hemos decidido por el de Gauss-Newton con la modificación de Hartley (3). Siguiendo el mismo procedimiento se ha seleccionado $1/y_i$ como algoritmo de ponderación de los datos experimentales.

El criterio estadístico considerado en la selección del modelo cinético óptimo para cada uno de los voluntarios ha sido el del mínimo valor de AIC, no sin dejar de lado los valores de los errores estándar de los parámetros.

3.6.1.2.3.6. Estudio de la linealidad cinética

El estudio de la linealidad cinética se ha abordado comparando los parámetros que a continuación se indican:

- Aclaramiento plasmático (Cl_p)
- Semivida de eliminación ($t_{1/2}$)
- Volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario (V_{dss})
- Area bajo la curva de niveles plasmáticos normalizada por la dosis (AUC/D)

estimados tras la administración intravenosa del fármaco a distintas dosis, concretamente 1, 2 y 4 mg/kg de cianamida en el perro y 0.1, 0.3, 0.6 y 1.0 mg/kg de cianamida en voluntarios sanos. Dicho estudio se ha llevado a cabo tanto con los parámetros hallados tras el tratamiento no compartimental como con los obtenidos tras el tratamiento compartimental de los datos experimentales. Los métodos estadísticos correspondientes utilizados para la comparación de dichos parámetros se especifican en el apartado 3.6.3.

3.6.2. ESTUDIO FARMACODINAMICO

Tal como se ha expuesto en el primer capítulo de la presente Memoria, y de acuerdo con la amplia bibliografía especializada sobre el tema, la cianamida es un inhibidor de la actividad de la aldehído-deshidrogenasa. Aprovechando la presencia de dicho enzima en eritrocitos sanguíneos se ha llevado a cabo un estudio farmacodinámico que ha consistido en analizar la inhibición de la actividad de la ALDH sanguínea por parte de la cianamida. Todo ello se ha realizado con el objeto no sólo de obtener información sobre la respuesta farmacológica del fármaco en estudio, en voluntarios sanos, y a tres niveles de dosis orales distintas (0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg), sino también con la intención de intentar estudiar la existencia de posibles correlaciones entre concentraciones plasmáticas de fármaco y respuesta farmacológica.

El estudio farmacodinámico se ha llevado a cabo únicamente en los voluntarios n° 7-10.

3.6.2.1. Estudio de la respuesta farmacológica

Los parámetros evaluados, para el estudio de la respuesta farmacológica de la cianamida, han sido:

- Los porcentajes de inhibición del enzima ALDH (%I) con respecto al valor de la actividad basal del mismo para cada uno de los tiempos de toma de muestra, para cuyo cálculo se ha utilizado la Ecuación 3.6 reseñada en el apartado 3.5.2.4.5 de la presente Memoria.
- La respuesta inhibidora máxima del enzima (I_{max}) para cada voluntario tras cada una de las tres dosis orales ensayadas.
- Las áreas bajo las curvas de porcentajes de inhibición del enzima (%I) en función del tiempo evaluadas entre 0 y 24 horas y entre 0 y 144 horas

después de la administración de cada una de las dosis de fármaco ensayadas.

El cálculo de dichas áreas se ha efectuado mediante el programa pKCALC, utilizando la aproximación trapezoidal.

El estudio de la relación entre concentraciones plasmáticas y porcentaje de inhibición de la actividad de la ALDH se ha realizado tras la dosis oral de 1 mg/kg.

La comparación estadística de los parámetros obtenidos tras las tres dosis orales de cianamida se ha efectuado mediante las pruebas pertinentes, detalladas en el apartado 3.6.3.

3.6.2.2. Ajustado de modelos cinético-dinámicos a los resultados experimentales

Una de las aportaciones más importantes de la farmacocinética, como disciplina aplicada que es, ha sido el profundizar en el estudio de la relación existente entre los niveles plasmáticos de los fármacos y las respuestas farmacológicas y/o toxicológicas de los mismos.

Varios son los modelos farmacodinámicos que se han propuesto para estudiar las relaciones existentes entre el efecto y las concentraciones de fármaco en su lugar de acción. Cuando el efecto farmacológico y la concentración de fármaco en la biofase pueden determinarse simultáneamente se pueden llevar a cabo ensayos con un amplio margen de concentraciones de fármaco con objeto de establecer, en condiciones óptimas, las posibles correlaciones entre la respuesta farmacológica y los niveles del fármaco.

Se han postulado varios modelos que relacionan los efectos con las concentraciones de fármaco en la biofase (Holford y Sheiner, 1981), tal como a continuación se expone:

Modelo lineal

Dicho modelo establece que cuando las concentraciones de fármaco son bajas con respecto a la concentración que provee el 50 % del efecto máximo, el efecto es proporcional a la concentración de fármaco. La expresión que permite predecir los efectos en función de las concentraciones de fármaco viene dada por la Ecuación 3.141.

$$E = S \cdot C \qquad \text{Ecuación 3.141}$$

siendo, E el efecto, S la pendiente que relaciona el efecto y las concentraciones y C la concentración de fármaco en la biofase.

Modelo E_{max}

El modelo lineal es una simplificación del modelo conocido como E_{max} que describe de forma adecuada el efecto de un fármaco en un amplio rango de concentraciones. Dicho modelo se basa en la relación hiperbólica dada por la Ecuación 3.142,

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C}{CE_{50} + C} \qquad \text{Ecuación 3.142}$$

siendo E_{max} el efecto máximo y CE₅₀ la concentración que suministra un efecto igual al 50% del efecto máximo. Este modelo ha sido ampliamente utilizado en las cinéticas enzimáticas (Michaelis-Menten) y en la cinética de fijación a proteínas.

Cabe destacar que para algunos fármacos, las curvas de concentración-efecto no predicen con exactitud cuando se utiliza la función hiperbólica. Este

hecho fue observado ya por Hill en 1910 (Hill, 1910) en sus estudios de saturación de la hemoglobina por el oxígeno.

Modelo E_{\max} sigmoideo

Dicho autor demostró, de forma empírica, la utilidad de añadir un parámetro extra transformando la Ecuación 3.142 en la representativa del modelo E_{\max} sigmoideo dada por la Ecuación 3.143,

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C^n}{CE_{50} + C^n} \qquad \text{Ecuación 3.143}$$

siendo n el parámetro que modula la pendiente de la curva.

En muchos casos es prácticamente imposible determinar los niveles de fármaco en el lugar de su efecto, es decir en su biofase. Por este motivo, se utilizan, en su defecto, las concentraciones plasmáticas del fármaco. Esta sustitución puede hacerse sin mayores problemas en todos aquellos casos en los que se establece un rápido equilibrio entre las concentraciones plasmáticas de fármaco y sus concentraciones en biofase.

Es relativamente frecuente que exista un desfase entre la aparición de los niveles plasmáticos de fármaco y su acceso a la biofase con la subsiguiente respuesta farmacológica.

Con el fin de poder solventar adecuadamente este hecho, Holford y Sheiner (Holford y Sheiner, 1982) postularon modelos farmacocinético-farmacodinámicos en los que se contempla un compartimiento nexo de unión denominado compartimiento del efecto al que accede una discreta cantidad de fármaco susceptible de proveer concentraciones de fármaco en dicho compartimiento biofásico, que generen la correspondiente respuesta.

Material y Métodos

En la Figura 3.22 se representa un esquema general del modelo farmacocinético-farmacodinámico propuesto por Holford y Sheiner (Holford y Sheiner, 1982).

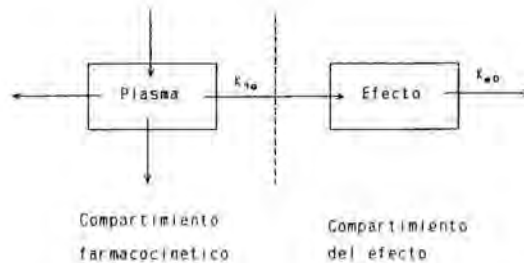


Figura 3.22. Esquema del modelo farmacocinético-farmacodinámico tomado de Holford y Sheiner (Holford y Sheiner, 1982)

Los modelos farmacocinético-farmacodinámicos utilizan un compartimiento del efecto como una extensión del modelo farmacocinético compartimental.

La velocidad de cambio de las cantidades de fármaco en el compartimiento del efecto viene dada por la ecuación diferencial que se detalla a continuación (Ecuación 3.144).

$$\frac{dA_e}{dt} = K_{1e} \cdot A_1 - K_{e0} \cdot A_e \quad \text{Ecuación 3.144}$$

en la que A_e es la cantidad de fármaco en el compartimiento del efecto, A_1 la cantidad de fármaco en el compartimiento central del modelo farmacocinético acoplado al compartimiento del efecto, y K_{1e} y K_{e0} las constantes de velocidad de entrada y salida, respectivamente a dicho compartimiento. El tipo de modelo farmacocinético utilizado puede ser irrelevante mientras describa adecuadamente la concentración de fármaco en el compartimiento central.

Se asume que la constante K_{1e} , que conecta el compartimiento central con el compartimiento del efecto, posee un valor mucho menor que la constante farmacocinética de velocidad más pequeña (Sheiner, 1979).

La expresión que permite conocer la cantidad de fármaco en el compartimiento del efecto, tras un bolus intravenoso de un fármaco de acuerdo con una cinética monocompartimental viene dada por la Ecuación 3.145,

$$A_e = \frac{K_{1e} \cdot D}{K_{e0} - K} \cdot [e^{-K \cdot t} - e^{-K_{e0} \cdot t}] \quad \text{Ecuación 3.145}$$

siendo K la constante de velocidad de eliminación del fármaco.

La concentración de fármaco en el compartimiento del efecto se obtiene al dividir el valor de A_e por el volumen de distribución del compartimiento del efecto V_e tal como se expresa en la Ecuación 3.146,

$$C_e = \frac{A_e}{V_e} \quad \text{Ecuación 3.146}$$

Cuando se alcanza la situación de equilibrio estacionario, las velocidades de transferencia entre los compartimientos central y del efecto se igualan y por consiguiente el aclaramiento de la salida de fármaco del compartimiento efecto se iguala al aclaramiento de entrada a partir del compartimiento central obteniéndose la igualdad que se describe en la Ecuación 3.147,

$$K_{1e} \cdot V_1 = K_{e0} \cdot V_e \quad \text{Ecuación 3.147}$$

siendo V_1 el volumen de distribución del compartimiento central.

Despejando V_e de la Ecuación 3.147 se obtiene la Ecuación 3.148,

$$V_e = \frac{K_{1e} \cdot V_1}{K_{e0}} \quad \text{Ecuación 3.148}$$

Reemplazando el valor de V_e en la Ecuación 3.145, expresada en concentraciones, se obtiene la expresión representativa de las concentraciones de fármaco en el compartimiento del efecto, que se detalla a continuación (Ecuación 3.149).

$$C_{e,t} = \frac{K_{1e} \cdot D \cdot K_p}{V_1 \cdot (K_{e0} - K)} \cdot [e^{-K \cdot t} - e^{-K_{e0} \cdot t}] \quad \text{Ecuación 3.149}$$

En nuestro caso concreto, se han aplicado los modelos farmacocinético-farmacodinámicos tras la administración oral de la cianamida y por consiguiente siguiendo un razonamiento análogo al expuesto anteriormente, las ecuaciones que permiten predecir las concentraciones de dicho fármaco en el compartimiento del efecto para los modelos monocompartimental (Ecuación 3.150) y bicompartimental (Ecuación 3.151) son las que se detallan a continuación,

$$C_{e,t} = \frac{F \cdot D \cdot K_{e0} \cdot K_a \cdot K_p}{V_1} \cdot \left[\frac{e^{-K \cdot t}}{(K_a - K) \cdot (K_{e0} - K)} + \frac{e^{-K_a \cdot t}}{(K - K_a) \cdot (K_{e0} - K_a)} + \frac{e^{-K_{e0} \cdot t}}{(K - K_{e0}) \cdot (K_a - K_{e0})} \right]$$

Ecuación 3.150

$$C_{e_t} = \frac{F \cdot D \cdot K_a \cdot K_{e0} \cdot K_p}{V_1} \cdot \left[\frac{(K_{21} - \alpha) \cdot e^{-\alpha t}}{(\beta - \alpha) \cdot (k_a - \alpha) \cdot (k_{e0} - \alpha)} + \frac{(K_{21} - \beta) \cdot e^{-\beta t}}{(\alpha - \beta) \cdot (K_a - \beta) \cdot (K_{e0} - \beta)} \right] + \left[\frac{(K_{21} - K_d) \cdot e^{-K_d t}}{(\alpha - K_d) \cdot (\beta - K_d) \cdot (k_{e0} - K_d)} + \frac{(K_{21} - K_{e0}) \cdot e^{-K_{e0} t}}{(\alpha - K_{e0}) \cdot (\beta - K_{e0}) \cdot (K_a - K_{e0})} \right]$$

Ecuación 3.151

Una vez obtenidos los valores de concentración de fármaco en el compartimiento del efecto a cualquier tiempo t, es decir C_{e_t} , estos se incorporan a los modelos farmacodinámicos E_{max} y E_{max} sigmoideo mediante las Ecuaciones 3.152 y 3.153 respectivamente, de forma que puede conocerse el efecto a esos mismos tiempos (E_t).

$$E_t = \frac{E_{max} \cdot C_{e_t}}{CE_{50} + C_{e_t}} \qquad \text{Ecuación 3.152}$$

$$E_t = \frac{E_{max} \cdot C_{e_t}^n}{CE_{50} + C_{e_t}^n} \qquad \text{Ecuación 3.153}$$

En el presente trabajo a se han ajustado diversos modelos farmacocinético-farmacodinámicos a los datos experimentales de niveles plasmáticos de cianamida obtenidos tras la administración oral de dicho fármaco a voluntarios sanos, a las dosis de 0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg y del decurso de la respuesta farmacológica (% de inhibición de la actividad ALDH eritrocitaria).

Concretamente, se han ajustado a los datos experimentales (pares de valores de concentración plasmática-tiempo y respuesta farmacológica-tiempo),

los modelos farmacocinéticos abiertos de uno y dos compartimientos así como los modelos farmacodinámicos E_{max} y E_{max} sigmoideo.

Así pues, en resumen, los modelos farmacocinético-farmacodinámicos que se han utilizado, han sido los siguientes:

- Modelo monocompartimental con absorción de primer orden (Ecuación 3.150) acoplado al modelo E_{max} (Ecuación 3.152).
- Modelo monocompartimental con absorción de primer orden (Ecuación 3.150) acoplado al modelo E_{max} sigmoideo (Ecuación 3.153).
- Modelo bicompartimental con absorción de primer orden (Ecuación 3.151) acoplado al modelo E_{max} (Ecuación 3.152).
- Modelo bicompartimental con absorción de primer orden (Ecuación 3.151) acoplado al modelo E_{max} sigmoideo (Ecuación 3.153).

Los modelos anteriormente citados se han ajustado mediante la subrutina KA1E y KA2E del programa MKmodel (Holford N., 1990).

En la Ecuación 3.150 el valor de K se parametrizó utilizando el cociente Cl/V y en la Ecuación 3.151 el valor de K_{21} se parametrizó mediante la expresión que a continuación se indica,

$$K_{21} = \frac{\alpha \cdot \beta \cdot V_c}{Cl}$$

Ecuación 3.154

3.6.3. METODOS ESTADISTICOS

Tal como ya se ha mencionado en apartados previos, el tratamiento estadístico llevado a cabo, en la presente Memoria, utilizando el paquete estadístico SPSS, ha consistido en:

1. Comparación entre los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración vía intravenosa de las dosis de 1, 2 y 4 mg/kg de cianamida al perro, y de las dosis de 0.1, 0.3, 0.6 y 1.0 mg/kg a voluntarios sanos, ya sea mediante tratamiento compartimental o bien no compartimental. Dichos análisis han permitido el estudio de la linealidad cinética.
2. Comparación entre los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración vía intravenosa de las dosis de 0.1, 0.3, 0.6 y 1.0 mg/kg de cianamida a voluntarios sanos, ya sea mediante tratamiento compartimental o bien no compartimental. Dichos análisis han permitido el estudio de la linealidad cinética.
3. Comparación entre los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración vía oral de las dosis de 0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg de cianamida a voluntarios sanos, después del tratamiento no compartimental de los datos experimentales.
4. Comparación, dentro de un mismo grupo de dosificación, entre los mismos parámetros farmacocinéticos obtenidos tras el tratamiento no compartimental y tras el tratamiento compartimental de los datos experimentales, en el perro y en voluntarios sanos.

Material y Métodos

5. Comparación entre los parámetros de respuesta farmacológica (porcentaje de inhibición máxima (I_{max}), así como de área bajo la curva de porcentajes de inhibición de la actividad de la ALDH en función del tiempo, de 0 a 24 horas y de 0 a 144 horas) obtenidos tras la administración de las tres dosis orales (0.3, 1.0 y 1.5 mg/kg) de cianamida a voluntarios sanos.

En la Tabla 3.16 se resumen los tipos de diseños considerados en cada uno de los casos.

En el caso de datos independientes, la comparación estadística de los distintos parámetros farmacocinéticos se ha efectuado en primer lugar mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), previa determinación de la homogeneidad de las varianzas mediante el test F de Barlett-Box. La comparación entre grupos correspondiente cada uno de ellos a una dosis distinta, se ha realizado mediante el test de comparación múltiple de Scheffé.

En el caso de datos apareados, la comparación estadística de los distintos parámetros farmacocinéticos así como de aquellos resultantes del estudio farmacocinámico se ha efectuado en primer lugar mediante un análisis de varianza de dos vías, previa determinación de la homogeneidad de las varianzas mediante el test F de Barlett-Box. La comparación entre grupos correspondiente cada uno de ellos a una dosis distinta, se ha realizado mediante un test t de Student-Fisher de datos apareados.

En aquellos casos en que las varianzas no han resultado ser homogéneas, la comparación estadística se ha llevado a cabo mediante un análisis no paramétrico, concretamente en el caso del perro se ha aplicado una prueba no paramétrica para datos apareados (test de Friedmann) mientras que en voluntarios la comparación se ha efectuado mediante una prueba no paramétrica para datos independientes (test H de Kruskal-Wallis) tras las dosis intravenosas y mediante el test de Friedmann tras las dosis orales del fármaco; Tras el ensayo

de Friedmann se ha aplicado la prueba T de Wilcoxon para averiguar que grupos eran significativamente distintos en aquellos casos en que se han hallado diferencias significativas, mientras que tras la prueba de Kruskal-Wallis ello se ha averiguado con la prueba U-Mann-Whitney.

Respecto a la comparación estadística de los mismos parámetros obtenidos tras el tratamiento compartimental y no compartimental para cada uno de los grupos de dosificación en las distintas especies, esta se ha efectuado mediante la prueba t-Student Fisher de comparación de medias para datos apareados.

Tabla 3.16. *Tipos de diseños considerados en los tests estadísticos.*

Especie	Vía	Dosis (mg/kg)	Diseño
Perro	i.v.	1, 2, 4	Datos apareados
Voluntarios sanos	i.v.	0.1, 0.3, 0.6, 1.0	Datos independientes
	p.o.	0.3, 1.0, 1.5	Datos apareados

3.7. Bibliografía

Boxenbaum H.G., Riegelman S., Elashoff R.M. Statistical estimations in pharmacokinetics. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **2**, 123-148 (1974).

Chennavasin P., Johnson R.A., Brater D.C. Variability in derived parameters of furosemide pharmacokinetics. *J. Pharmacokin. Biopharm.* **9**, 623-633 (1981).

Clements J.A., Prescott L.F. Data point weighting in pharmacokinetic analysis: intravenous paracetamol in man. *J. Pharm. Pharmac.* **28**, 707-709 (1976).

Cutler D.J. Theory of the mean absorption time, an adjunct to conventional bioavailability studies. *J. Pharm. Pharmacol.* **30**, 476-478 (1978).

Daniel C., Wood F.S. Fitting equations to data. Ed. Wiley, New York (1971).

DeMaster E.G., Shirota F.N., Nagasawa H.T. The metabolic activation of cyanamide an inhibitor of aldehyde dehydrogenase is catalysed by catalase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122(1)**, 358-365 (1984).

Dunne A. JANA: A new iterative polyexponential curve stripping program. *Comput. Methods Programs Biomed.* **20**, 269-275 (1985)

Dunne A. An iterative curve stripping technique for pharmacokinetic parameter estimation. *J. Pharm. Pharmac.* **38**, 97-101 (1986).

Francis R.J. ELSMOS an extended least squares modelling system in FORTRAN IV for mini-or-micro-computer implementation. *Comput. Methods Programs Biomed.* **18**, 43-50 (1984).

Gibaldi M., Perrier D. Pharmacokinetics, 2^a Ed. Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol 15. Marcel Dekker, New York (1982).

Gomeni R., Gomeni C. IGPHARM: Interactive graphic package for pharmacokinetic analysis. *Comput. Biomed. Res.* **11**, 345-361 (1978).

Gomeni R. SIPHAR'S MANUAL version 4.0 SIMED, Creteil (1991).

Gouyette A. Pharmacokinetics: Statistical moment calculations. *Arzneim. Forsch./ Drug Res.* **33(I)**, 173-176 (1983).

Hartley O. The modified Gauss-Newton method for the fitting of nonlinear regression functions by least squares. *Technometrics* **3**, 269-280 (1961).

Helander A., Tottmar O. Cellular distribution and properties of human blood aldehyde dehydrogenase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **10**, 71-76 (1986).

Helander A., Tottmar O. Assay of human aldehyde dehydrogenase activity by high-performance liquid chromatography. *Alcohol* **4**, 121-125 (1987).

Helander A., Tottmar O. Effects of disulfiram, cyanamide and 1-aminocyclopropanol on the aldehyde dehydrogenase activity in human erythrocytes and leucocytes. *Pharmacol. Toxicol.* **63**, 262-265 (1988).

Hill A.V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* **40**, iv-vii (1910).

Holdford N. MKMODEL. An extended least Squares Modelling Program. Elsevier, Biosoft, Amsterdam (1990).

Holford N., Sheiner L. Understanding the dose-effect relationship: Clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. *Clin. Pharmacokinet.* **6**, 429-453 (1981).

Holford N., Sheiner L. Kinetics on pharmacologic response. *Pharmac. Ther.* **16**, 143-166 (1982).

International Committee for standarization in haematology of the European society of haematology. Recommendations and requirements for haemoglobinometry in human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **17**, 617-620 (1965).

Johnson E.L., Reynolds D.L., Wright D.S., Pachla L.A. Biological sample preparation and data reduction concepts in pharmaceutical analysis. *J. Chromatogr. Sci.* **26**, 372-379 (1988).

Karnes H.T., Shiu G., Shah V.P. Validation of Bioanalytical Methods. Review. *Pharm. Res.* **8**(4), 421-426 (1991).

Karol M.D. Short communication mean residence time and the meaning of AUMC/AUC. *Biopharm. Drug Dispos.* **11**, 179-181 (1990).

Long G.I., Winefordner J.D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* **55**, 712A (1983).

Loo J.C.K., Riegelmann S. New method for calculating the intrinsic absorption rate of drugs. *J. Pharm. Sci.* **57**(6), 918-928 (1968).

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).

Maldener G. Requirements and Tests for HPLC Apparatus and Methods in Pharmaceutical Quality Control. *Chromatographia* **28**(1/2), 85-88 (1989).

Marquardt D.W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **11**, 431-444 (1963).

Martinez-Lanao J., Dominguez-Gil A. Modelos matemáticos en Farmacocinética. *Cien. Ind. Farm.* **6**, 209-216 (1987).

Metzler C.M. Extended least squares (ELS) for pharmacokinetic models. *J. Pharm. Sci.* **76**(7), 565-571 (1987).

Metzler C.M., Weiner D.L. PCNONLIN versión 3.1. Statistical Consultants, Inc. (1992).

Motulsky H.J., Ransnas L.A. Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and non mathematical review. *FASEB J.* **1**, 365-374 (1987).

Nelder J.A., Mead R. A simplex method for function minimization. *Comput. J.* **7**, 308-313 (1965)

Peck C.C., Sheiner L.B., Nichols A.I. The problem of choosing weights in nonlinear regression analysis of pharmacokinetic data. *Drug Metab. Rev.* **15**(182), 133-148 (1984).

Perrier D., Mayersohn M.J. Noncompartmental determination of the steady-state volume of distribution for any mode of administration. *J. Pharm. Sci.* **71**, 372-373 (1982).

Petterson H., Totmar O. Aldehyde dehydrogenases in rat brain. Subcellular distribution and properties. *J. Neurochem.* **38**, 477-487 (1982).

Pruñonosa J., Obach R., Vallés J.M. Determination of cyanamide in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **377**, 253-260 (1986).

Rawles J.W., Rhodes D.L., Potter J.J., Mezey E. Characterization of human erythrocyte aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 1077-1082 (1987).

Riegelman S., Collier P. Application of Statistical Moment Theory to the Evaluation of "in vivo" Dissolution Time and Absorption Time. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **8**, 509-534 (1980).

Rocci M.L., Jusko W.J. LAGRAN program for area and moments in pharmacokinetic analysis. *Comput. Progr. Biomed.* **16**, 203-216 (1983).

Segura P. Tratamiento de datos y análisis de error con microordenador o calculadora. Promociones Publicaciones Universitarias, Barcelona (1985).

Shah V.P., Midha K.K., Dighe S. et al. Analytical methods validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Sci.* **81**(3), 309-312 (1992).

Sheiner L.B. Analysis of pharmacokinetic data using parametric models: 1-Regression models. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **12**(1), 93-118 (1984).

Sheiner L.B., Stanski D.R., Vozeh S., Miller R., Ham J. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: Application to d-tubocurarine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **25**(3), 358-371 (1979).

Shirota F.N., Nagasawa H.T, Kwon C.H., DeMaster E.G. N-acetylcyanamide, the major urinary metabolite of cyanamide in rat, rabbit, dog and man. *Drug Metab. Dispos.* **12** (3), 337-344 (1984).

Shumaker R.C. pKCALC: A BASIC interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. *Drug Metab. Rev.* **17**, 341-348 (1986).

Spendley W., Hext G.R., Himsforth F.R. Sequential applications of simplex designs in optimization and evolutionary operation. *Technometrics* **4**, 441 (1962).

SPSS/PC+. Advanced statistics for the IBM/XT/AT. SPSS Inc. Chicago (1986).

Material y Métodos

Tottmar S.O.C., Petterson H., Kiessling K.H. The subcellular distribution properties of aldehyde dehydrogenases in rat liver. *Biochem. J.* **135**, 577-586 (1973).

Tse F.L.S., Jaffe J.M. Preclinical drug disposition. A laboratory handbook. Drugs and the pharmaceutical sciences. Vol. 46, Marcel Dekker Inc. New York (1991).

Wagner J.G. Fundamentals of clinical pharmacokinetics. Drug Intelligence Publications Inc. Hamilton Illinois (1975).

Wagner J.G., Nelson E. Percent absorbed time plots derived from blood level and for urinary excretion data. *J. Pharm. Sci.* **52**, 610-611 (1963).

Yamaoka K., Nakagawa T., Uno T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equation. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **6**, 165-175 (1978a).

Yamaoka K., Nakagawa T., Uno T. Statistical Moments in Pharmacokinetics. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **6**, 547-558 (1978b).

Yeh K.C., Kwan K.C. A comparison of numerical integrating algorithms by trapezoidal Lagrange and spline approximation. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **6**, 79-88 (1978).

Yeh K.C., Small R.D., Winchell G.A. Pharmacokinetic evaluation of stable piecewise cubic polynomials as numerical integration functions. *J. Pharm. Sci.* **76**, S104 (1987).