

Correlación entre modelos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* en estudios de absorción

Navarro-Fontestad Carmen *

González-Álvarez Isabel **

Casabó Vicente ***

Merino Virginia ****

Bermejo Marival *****

RESUMEN

Predecir la magnitud y la velocidad de absorción de una sustancia es crucial en el diseño de medicamentos. En este campo se han empleado distintas metodologías, como modelos *in vitro* o ensayos *in situ* o *in vivo* en animales. Este trabajo analiza modelos matemáticos empleados para estudiar la absorción intestinal y analizar la influencia de tensioactivos en la permeabilidad intestinal; predecir la fracción de dosis absorbida; caracterizar parámetros de absorción pasiva y activa; y establecer correlaciones entre parámetros obtenidos *in vitro* e *in situ*.

Cuanto más complejo es el modelo tanto mejor se correlaciona con los valores en humanos, pero resultan más difíciles de implementar. Los modelos *in vitro* resultan bastante adecuados para predecir la absorción cuando se produce por difusión pasiva, pero deficitarios cuando se produce por transporte activo. Se pone de manifiesto la necesidad de continuar desarrollando modelos que permitan el escalado a humanos (MED.UIS. 2008 21(1):17-31).

Palabras clave: Modelado matemático de la absorción. Predicción de la absorción. Modelos experimentales para la absorción. Correlaciones *in vitro-in vivo*.

INTRODUCCIÓN

La vía oral es la más usada y conveniente para los pacientes en la administración de fármacos, por este motivo predecir la velocidad y la magnitud de la absorción del fármaco desde el tracto gastrointestinal es un paso clave en el proceso de diseño y desarrollo de nuevos fármacos. Para optimizar la capacidad de absorción de cualquier fármaco nuevo es necesario aumentar el conocimiento sobre los factores que afectan a la absorción de los mismos. En este sentido, una herramienta útil para esta propuesta es el modelado matemático de los procesos de transporte.

Este trabajo de revisión incluye gran cantidad de resultados obtenidos por el grupo de investigación que lo presenta, cuyo campo de especialización se centra en estudio de la absorción de fármacos y xenobióticos en el tracto gastrointestinal de rata (por medio del empleo de una técnica *in situ* sin recirculación), así como a través de líneas celulares de carcinoma de colon Caco-2. Además, se ha

*MD Estudiante de doctorado. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Valencia. España.

**Técnico Superior de Investigación (posdoctorado). Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Valencia. España.

***Profesor Titular. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Valencia. España.

****Profesor Titular. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Valencia. España.

*****Profesor Titular. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Valencia. España.

Correspondencia: Dra. Bermejo. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. España. email: mbermejo@uv.es

Artículo recibido el 16 de julio de 2007 y aceptado para publicación el 7 marzo de 2008.

apoyado en una búsqueda bibliográfica en PubMed empleando como palabras clave las secuencias: *oral absorption prediction* e *intestinal absorption Caco-2 cells models*.

Se describirán brevemente algunos de los modelos biofísicos que han sido aplicados en el estudio de la absorción intestinal de fármacos y para predecir la influencia de los tensioactivos sobre la permeabilidad intestinal. En segundo lugar, se describirán los modelos para predecir la fracción absorbida *in vivo* tras la administración oral a partir de permeabilidades obtenidas en sistemas *in situ*, *in vitro* e *in vivo*. Finalmente, se mostrarán algunos ejemplos de métodos de modelado para caracterizar los parámetros de transporte pasivo y activo y la correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in situ*.

MODELOS BIOFÍSICOS DE ABSORCIÓN GASTROINTESTINAL

Los modelos biofísicos son herramientas útiles para el estudio de absorción de fármacos y establecer relaciones entre la permeabilidad intestinal de fármacos y descriptores moleculares. La metodología, que muchos grupos de investigación han aplicado, consiste en establecer correlaciones entre los valores de permeabilidad intestinal e índices fisicoquímicos como lipofilia y peso molecular. Estas relaciones son diferentes dependiendo del lugar de absorción en el

tracto gastrointestinal y de hecho, con ellos se han explicado las diferencias de absorción en función de las características fisiológicas particulares de cada segmento. En la Figura 1 está representado un modelo biofísico que describe el proceso de absorción de fármacos en la mucosa gástrica, el intestino delgado y el colon (Figura 1).

COLON

En el colon sólo la vía de absorción transcelular se considera relevante porque la vía paracelular está restringida debido al poco espacio intercelular. La relación entre las constantes de absorción en colon y la lipofilia de los xenobióticos se basa en la ecuación hiperbólica propuesta por Wagner^{1,2} (Ecuación 1).

$$k_a = \frac{k_m \cdot P^a}{B + P^a}$$

Ecuación 1.

En la ecuación 1 a y B son constantes o parámetros que dependen de las condiciones experimentales, la P representa cualquier índice de lipofilia y k_m es un parámetro que representa la asíntota o constante de absorción máxima en esa condición determinada. La constante de velocidad de absorción tiende a aumentar

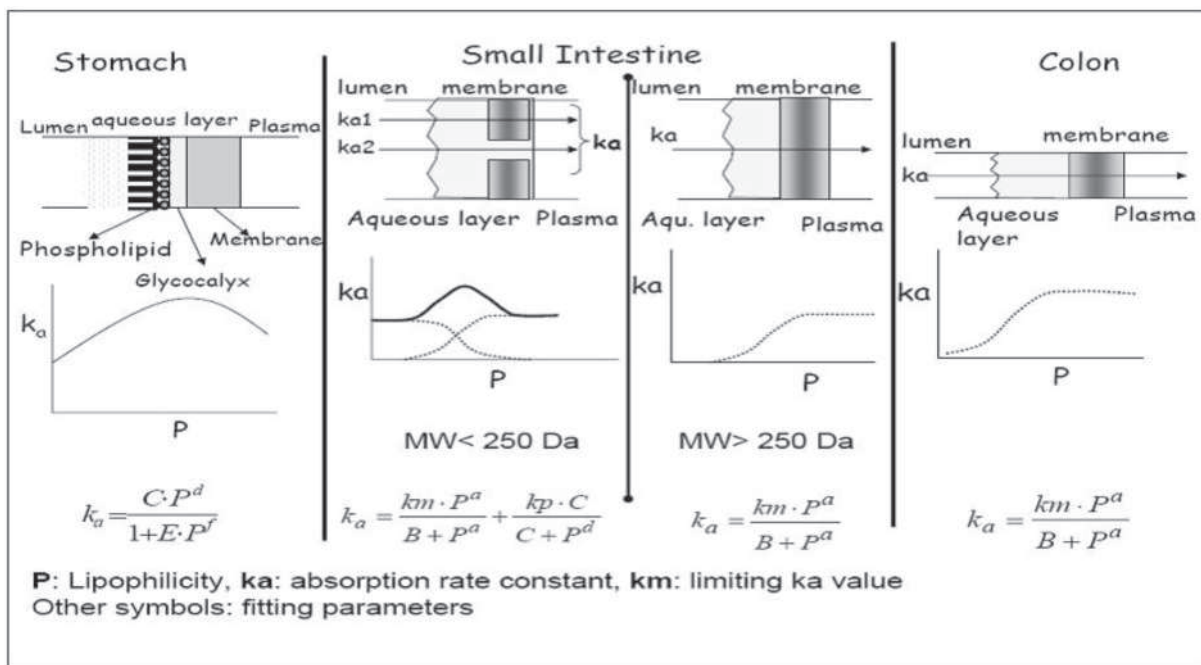


Figura 1. Resumen de los modelos biofísicos aplicados a la predicción de la absorción de fármacos a partir de la lipofilia en el tracto gastrointestinal.

con la lipofilia, pero la existencia de un paso limitante para la difusión estabiliza los valores de k_a para los miembros de mayor lipofilia de las series, los cuales pueden atravesar esta capa a una constante de absorción limitada, k_m . El paso limitante para los compuestos muy lipófilos es el paso a través de la capa acuosa situada en el lado luminal^{3,4}.

INTESTINO DELGADO

La absorción a través del epitelio intestinal para compuestos con un tamaño molecular inferior a 250 Da se describe con una ecuación hiperbólica doble^{5,6} (Ecuación 2).

$$k_a = k_1 + k_2 - \frac{k_m * P^a}{B - P^a} + \frac{k_p * C}{C + P^d}$$

Ecuación 2.

Estos compuestos son capaces de difundir a través de la membrana lipófila, de poros acuosos y/o del espacio intercelular formado por las uniones celulares. La constante de absorción global se describe como la suma de los valores de dos constantes de absorción, las cuales representan dos vías diferentes: el paso a través de la membrana lipídica y a través de los poros acuosos. B, C a y d son constantes que dependen de la técnica experimental utilizada, P es el parámetro de lipofilia, k_m y k_p son los valores asintóticos (constante de absorción máxima) obtenidos en el paso a través de la membrana y en la vía paracelular (y/o poros acuosos), respectivamente. Para los compuestos con un peso molecular superior a 250 Da el paso a través de poros acuosos es despreciable y por lo tanto se reduce la ecuación al modelo hiperbólico ya descrito para el colon.

ESTÓMAGO

En esta situación se emplea una ecuación bilineal, debido a las capas de fosfolípidos y glicocáliz que preceden a la membrana lipídica. Del mismo modo que en el colon y en el intestino delgado, desde la luz intestinal hay en primer lugar una capa acuosa, pero además hay una capa fosfolipídica. Esta idea está de acuerdo con las teorías de Hills y cols⁷ quienes describieron un revestimiento lipídico de anfífilos naturales que protegen la mucosa gástrica. Esta capa de fosfolípidos está unida al glicocáliz por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Esta estructura se comporta como un sistema heterogéneo en términos de difusión de xenobióticos: una capa acuosa estática (hidrofílica), una capa de fosfolípidos (lipofílica), el

glicocáliz (hidrofílico), la membrana lipídica y el plasma acuoso que actúa como sumidero. Esta vía heterogénea produce una correlación bilineal⁸ (Ecuación 3).

$$k_a = \frac{C * P}{1 + E * P}$$

Ecuación 3.

Donde C, d, E y f son los parámetros que dependen de la técnica experimental utilizada y P es el parámetro de lipofilia.

INFLUENCIA DE LOS TENSIOSCTIVOS EN LA PERMEABILIDAD GASTROINTESTINAL

Los tensioactivos se incluyen como excipientes en muchas formulaciones de fármacos con el objetivo de mejorar la constante de disolución y aumentar la solubilidad del fármaco. Estos objetivos están basados en la capacidad de los tensioactivos de reducir la tensión superficial y el ángulo de contacto entre las partículas sólidas y el medio acuoso, mejorando así la capacidad de humectación del fármaco y aumentando la superficie disponible para la disolución del fármaco. Su influencia en la solubilidad total de los fármacos se relaciona con la inclusión de componentes poco solubles en el núcleo apolar de las micelas⁹.

En general, los tensioactivos aumentan la solubilidad y la constante de disolución, aunque el aumento de esta última es menos pronunciado debido a la baja difusión del fármaco englobado dentro de la micela¹⁰⁻¹⁷.

Por otra parte, estos aditivos farmacéuticos han sido bien caracterizados como posibles moduladores de la absorción. Sus efectos sobre la membrana intestinal, (es decir, sobre la permeabilidad del fármaco) son complejos y no están tan bien definidos. Muchos tensioactivos interactúan con las membranas de absorción potenciando la permeabilidad y facilitando la absorción intestinal de algunos fármacos disueltos, este efecto se hace particularmente aparente cuando la concentración de tensioactivo en la solución de fármaco es igual o menor que la Concentración Micelar Crítica (CMC). Sin embargo, si la concentración del mismo es mayor que su CMC, este efecto puede disminuir o incluso revertirse^{18,19}. En este sentido, la influencia de la lipofilia en la absorción intrínseca de los fármacos formulados en presencia de tensioactivos en concentraciones iguales o superiores a la CMC ha sido analizado en distintos trabajos²⁰⁻²². Esta sección del artículo resume cómo los modelos biofísicos previamente descritos son utilizados para explicar los

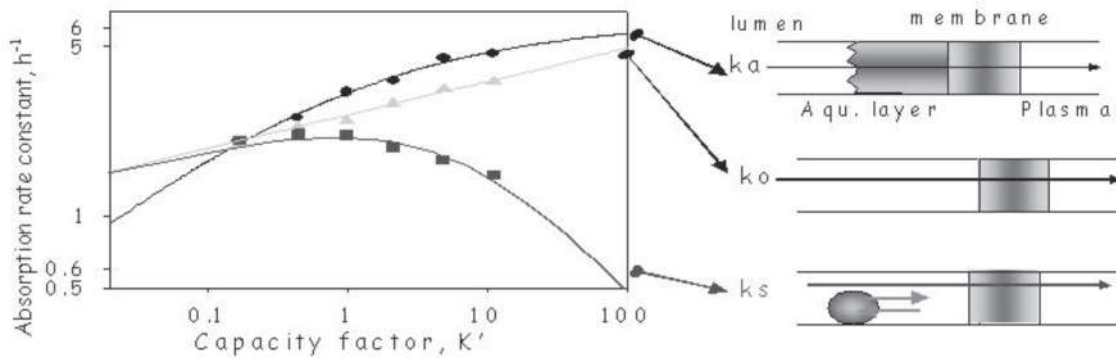


Figura 2. Correlación absorción-lipofilia obtenida en colon de rata para una familia de compuestos ácidos bajo diferentes condiciones: k_a y k_o son las constantes de velocidad de absorción calculados en ausencia y en presencia de lauril sulfato sódico por debajo de su CMC, respectivamente, y k_s a una concentración supramicelar. Adaptado de Garrigues et al²¹.

cambios de permeabilidad que aparecen en presencia de tensioactivos. Para explorar los efectos de los tensioactivos sobre el tracto gastrointestinal, se realizaron ensayos de absorción con familias de compuestos homólogos, o estructuralmente relacionados en ausencia y en presencia de tensioactivos y con el fármaco a estudiar en disolución. Los tensioactivos se utilizaron a dos concentraciones diferentes, una concentración menor que la CMC y otra superior a la CMC que corresponde a la Concentración Supramicelar (CSM). Este diseño experimental permitió diferenciar la influencia de los monómeros de tensioactivo del efecto de las micelas. El siguiente paso fue establecer correlaciones absorción-lipofilia en ausencia y en presencia del aditivo, para determinar los cambios ejercidos por éste.

Los ensayos se realizaron en estómago, intestino delgado y colon. Para establecer una hipótesis general adecuada para diferentes fármacos y tensioactivos, las investigaciones se realizaron incluyendo tensioactivos aniónicos, catiónicos y neutros, así como fármacos de carácter ácido, alcalino, neutro o anfótero²³⁻²⁶. Como podrá observarse a continuación, el resultado global sobre la constante de absorción de cada compuesto depende de su propia lipofilia y del tensioactivo.

Colon

En los ensayos con tensioactivos sintéticos a CMC, el mejor modelo para describir la relación entre la constante de absorción y la lipofilia corresponde a una relación exponencial²⁷ (Figura 2).

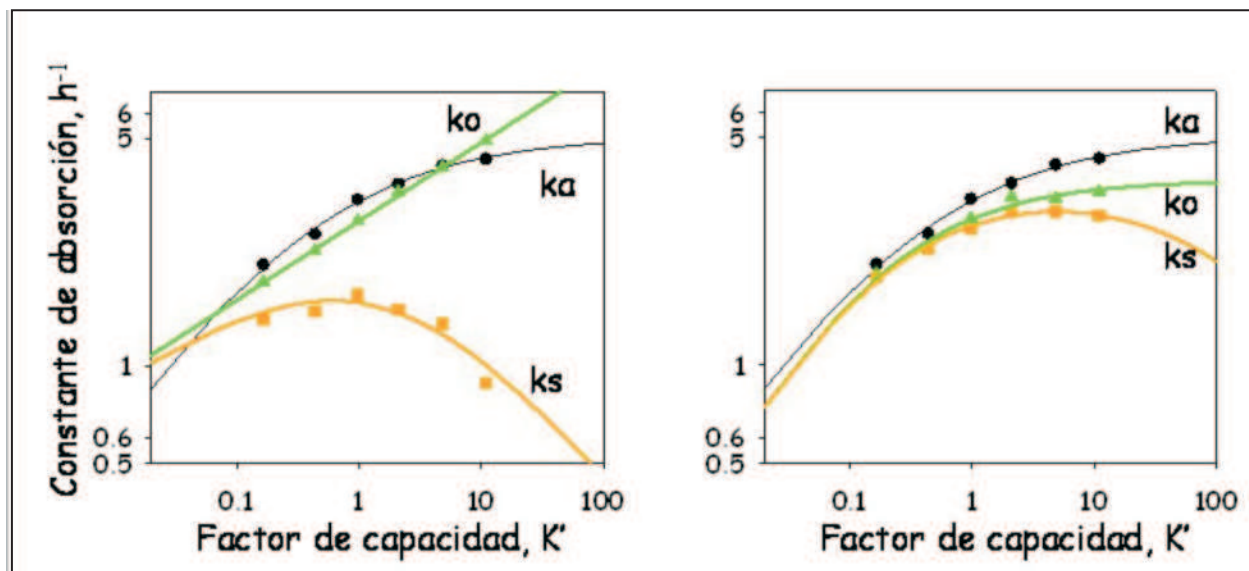


Figura 3. Relación absorción-lipofilia obtenida en colon de rata en presencia de polisorbato 80 y taurocolato sódico a sus CMC y a concentraciones supramicelares. Adaptado de Bermejo et al²².

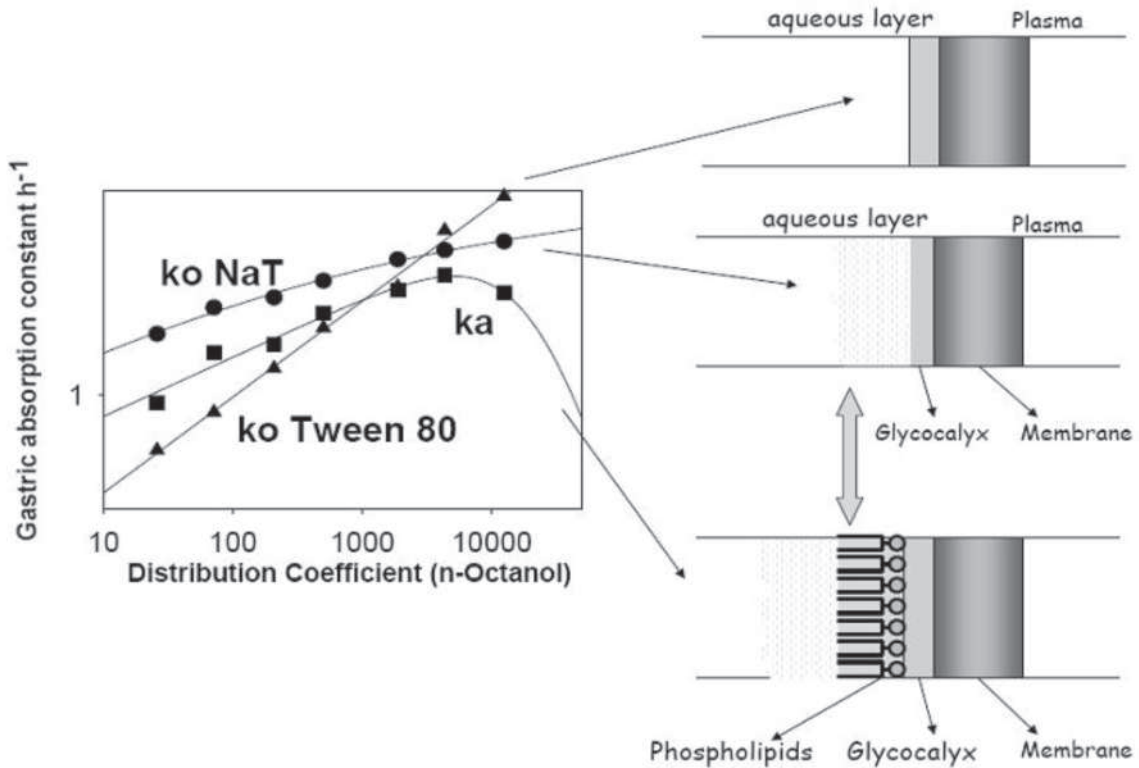


Figura 5. Correlaciones absorción-lipofilia obtenidas en estómago de rata para una serie de xenobióticos ácidos en ausencia de cualquier aditivo (k_a) y en presencia de taurocolato sódico (NaT) y Tween 80 a concentraciones por debajo de su CMC (k_o). Adaptado de Garrigues et al⁶.

La figura 2 muestra los resultados obtenidos en colon de rata con lauril sulfato sódico y una serie de ácidos fenil-alquil-carboxílicos. Se observa que las correlaciones entre k_a y P en ausencia de tensioactivos son hiperbólicas, sin embargo las correlaciones en presencia de CMC de tensioactivos sintéticos son siempre exponenciales, si bien con una pendiente (k_o) bastante pequeña. Si la concentración de

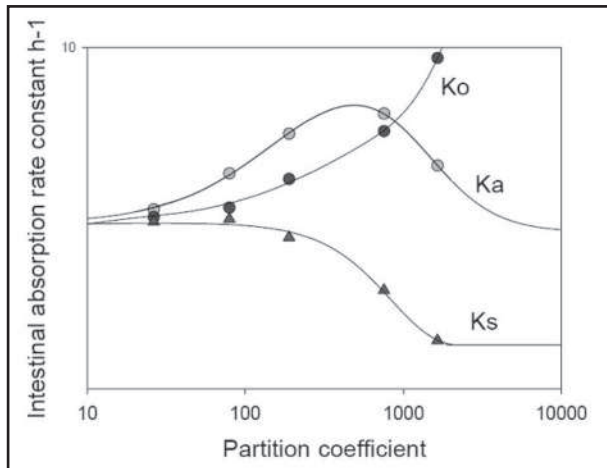


Figura 4. Correlaciones absorción-lipofilia obtenidas en intestino delgado de rata para una familia de aminas aromáticas en ausencia (k_a) y en presencia de tetradeciltrimetilamonio por debajo (k_o) y por encima (k_s) de su CMC. Adaptado de Garrigues et al²⁷.

tensioactivo es menor o igual que la CMC^{28,29} el efecto limitante sobre los valores de k_a ejercido por la capa acuosa estática desaparece, lo que implica que no se observa una k_m . Además, tiene lugar un segundo efecto que consiste en un aumento de la polaridad de la membrana por el tensioactivo. Como se puede observar en la figura 2, el cambio en la pendiente desde la ecuación hiperbólica a la exponencial puede conducir a un aumento de la constante de absorción pero también a una disminución en este parámetro, dependiendo de la lipofilia del compuesto considerado.

Los tensioactivos naturales como el taurocolato sódico y el glicolato sódico no son capaces de eliminar el carácter limitante de la capa acuosa de difusión adyacente a la membrana por el lado luminal^{30,31}. Por esta razón, en la administración de fármacos en presencia de estos tensioactivos naturales a concentraciones iguales a sus CMC, las correlaciones absorción-lipofilia siguen siendo hiperbólicas, como las obtenidas sin aditivos. En la figura 3 se observan las diferencias entre las correlaciones obtenidas en presencia de polisorbato 80 y taurocolato sódico (valores de k_o)^{28,29}.

El cambio en la polaridad de la membrana así como la eliminación del paso limitante de la capa acuosa

son efectos que, indudablemente, son producidos también por las moléculas de tensioactivo. Estos efectos son aparentemente enmascarados por la solubilización micelar, que está dominada por el reparto entre la micela y la fase acuosa. La fracción de fármaco solubilizado en las micelas no está disponible para la absorción. De tal modo que cuando se emplean concentraciones supramicelares de tensioactivo la correlación entre las constantes de absorción y parámetros de lipofilia pueden describirse con una ecuación bilineal, más o menos compleja dependiendo del tipo de tensioactivo empleado (natural o sintético, esto puede observarse con los valores de k_s en la figura 3).

Intestino

Un ejemplo de las correlaciones obtenidas en intestino delgado en ausencia y en presencia de Tetra-Decil-Trimetil-Amónio (TTAB) a concentración de 0,0125%, por debajo de la CMC y a concentración de 1%, por encima de la CMC, se representa en la figura 4²⁷. Como puede observarse, el efecto de ambas concentraciones de tensioactivo es significativo. Para este tipo de tensioactivos, cuando la concentración de tensioactivo igual o menor que la CMC se asume que el transporte paracelular no se ve modificado (k_2 en la ecuación 2), mientras que la constante de absorción a través de membrana, en lugar de ser hiperbólica pasa a ser exponencial, tal como sucede en colon. Cuando la concentración de tensioactivo es mayor que la CMC (CSM), tanto el paso a través de membrana lipófila como a través de poros se ve afectado por el reparto micela-fase acuosa, por lo que los dos sumandos de la ecuación 2 se transforman en dos bilineales.

Sin embargo, un tensioactivo natural como el taurocolato sódico no produjo ningún cambio significativo en las constantes de absorción de una serie de ácidos fenilalquil carboxílicos a su CMC y ejerció un efecto de solubilización casi insignificante a una concentración supramicelar²⁴.

Estómago

En presencia de tensioactivos por debajo de su CMC, las correlaciones obtenidas en estómago pueden ser exponenciales (tensioactivos sintéticos) o hiperbólicas (tensioactivos naturales). Ambas correlaciones están representadas en la figura 5 (valores k_o) junto a la correlación obtenida en ausencia de aditivos (k_a). En general, hemos observado un aumento global y significativo en todas las constantes de velocidad de absorción. Este hecho sugiere la posibilidad de que los tensioactivos destruyan la barrera hidrófoba,

conduciendo a la exposición de la mucosa gástrica al ambiente ácido. Una vez la capa de fosfolípidos ha sido retirada, la membrana lipídica representa la principal resistencia a la difusión en presencia de tensioactivos sintéticos, puesto que éstos reducen de manera efectiva la resistencia acuosa, ello conduce a una relación exponencial; sin embargo, en presencia de tensioactivos naturales, la capa acuosa permanece intacta y las correlaciones son hiperbólicas. Esta diferencia puede observarse claramente en la figura 5⁶. La capacidad para eliminar la capa de fosfolípidos podría explicar la actividad ulcerogénica del taurocolato sódico y otras sales biliares y tensioactivos sintéticos.

Todos estos resultados podían resumirse del siguiente modo:

1. Los tensioactivos farmacéuticos parecen anular el efecto limitante de la capa acuosa estática en la difusión del soluto.
2. Los tensioactivos farmacéuticos aumentan la polaridad de la membrana, haciéndola más permeable para sustancias altamente hidrofílicas. Este efecto es el responsable de la baja pendiente de las relaciones exponenciales.
3. Cuando un tensioactivo sintético es añadido a concentración supramicelar, los efectos anteriores permanecen casi completamente enmascarados por la solubilización micelar de los xenobióticos. Las correlaciones son bilineales como resultado del proceso de reparto de los solutos entre los núcleos micelares y la solución acuosa.
4. Los tensioactivos naturales no muestran la capacidad de anular la resistencia de la capa acuosa.
5. La potencial solubilización de los tensioactivos naturales es más baja que la observada para los tensioactivos farmacéuticos.

Las posibles razones para el diferente comportamiento de los tensioactivos naturales serían:

- a) Los tensioactivos naturales conducen a valores de tensión superficial mayores que los correspondientes a la misma concentración de un tensioactivo sintético.
- b) La capacidad de anular la resistencia de la capa acuosa podría estar relacionada con los valores de tensión superficial.
- c) Las micelas de sales biliares son más pequeñas y más rígidas que las micelas de tensioactivos sintéticos.
- d) La potencial solubilización de las sales biliares se aumenta en presencia de lecitinas y ácidos grasos.

Por ejemplo, la constante de absorción obtenida en presencia de micelas de taurocolato y glicolato sódicos mezclados con lecitina para una serie de ácidos fue significativamente menor que la obtenida en presencia de micelas simples de las mismas sales biliares^{30,31}.

Estos efectos descritos de los tensioactivos sobre la permeabilidad de la membrana han sido observados por otros autores utilizando una hipótesis diferente. Rege et al³² estudiaron la actividad de inhibición de tensioactivos no-iónicos sobre la secreción de fármacos sustrato de glicoproteína-P y la relación entre la inhibición y la fluidez de la membrana. *Tween* 80 y *Cremofor* inhibieron la glicoproteína-P (gp-P). Estos efectos de inhibición podrían estar relacionados con la capacidad de estos tensioactivos de fluidificar las bicapas lipídicas celulares. A su vez, el mecanismo de fluidificación podría estar relacionado con el aumento de la polaridad de la membrana que habíamos observado con los tensioactivos sintéticos en nuestros experimentos, y que también han sido recogidos por otros autores como posible explicación del efecto de inhibición de los tensioactivos sobre la glicoproteína-P en la barrera hemato-encefálica³³.

Además de estos efectos ya discutidos, la conclusión fundamental de nuestro trabajo es que los tensioactivos naturales y sintéticos se comportan de forma diferente. Cuando estas clases de aditivos se usan en la formulación de un fármaco, debería considerarse su posible influencia sobre la permeabilidad de la membrana y efecto en la absorción de dicho fármaco.

MODELADO Y PREDICCIÓN DE LA FRACCIÓN ABSORBIDA A PARTIR DE VALORES DE PERMEABILIDAD

La solubilidad de los fármacos y la velocidad de disolución, así como la permeabilidad a través de la membrana intestinal pueden ser identificadas como

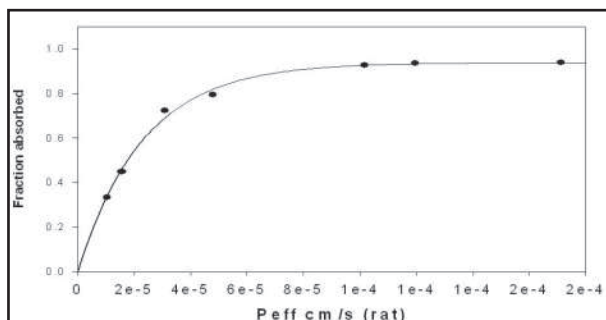


Figura 6. Correlación entre la biodisponibilidad in vivo en rata, F , basada en las relaciones entre las AUC oral/iv y las permeabilidades intestinales, P_{eff} obtenidas en ratas *in situ*. Adaptado de Merino V et al³⁴

parámetros clave en una nueva entidad química para llegar a conducir a un compuesto de interés. Estos factores constituyen aspectos fundamentales del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica que ha sido desarrollado como una herramienta moderna para acelerar el proceso de desarrollo de fármacos. Se han planteado diferentes hipótesis para predecir la permeabilidad intestinal y la fracción oral absorbida de un fármaco en solución libre y para el mismo desde una forma de dosificación, incorporando en los modelos los procesos de disolución y liberación. Esta sección se centra en las estimaciones para predecir la fracción oral absorbida a partir de los valores de permeabilidad obtenidos usando diferentes sistemas experimentales. En este sentido, la fracción absorbida predicha corresponde al valor potencial máximo en ausencia de cualquier otro factor limitante como podrían ser la solubilidad o el tiempo de disolución.

Una aproximación que se puede realizar para calcular la fracción absorbida es considerar el intestino delgado como un compartimento desde el cual el fármaco desaparece siguiendo un proceso de primer orden.

En los ensayos de absorción que se realizan *in situ* A_r es la cantidad de compuesto ensayado remanente en el fluido luminal a cualquier tiempo, t , y A_0 la cantidad inicial (es decir, la dosis total perfundida), se puede escribir con la ecuación 4.

$$A_r = A_0 * e^{-k_a * t}$$

Ecuación 4.

En la cual, si se resta cada miembro a A_0 , se obtiene la ecuación 5; y si cada término se divide por A_0 , se obtiene la ecuación 6, donde A_r/A_0 es la fracción de la dosis inicial remanente en el fluido luminal. $1 - A_r/A_0$ representa la fracción de compuesto absorbido, F_a , asumiendo que no existe pérdida presistémica.

$$A_0 = A_r - A_0 * e^{-k_a * t}$$

Ecuación 5.

$$F_a = 1 - \frac{A_r}{A_0} = 1 - e^{-k_a * t}$$

Ecuación 6.

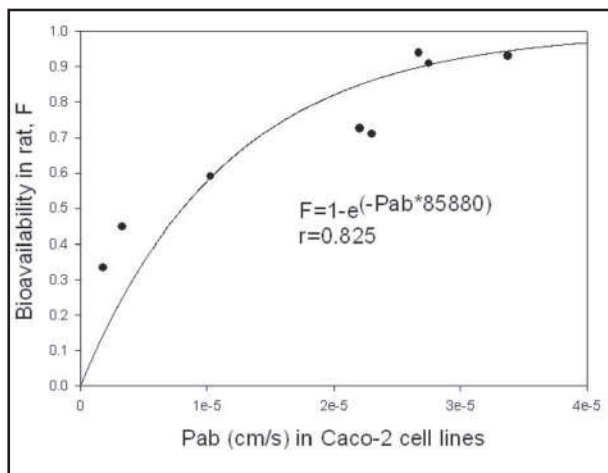


Figura 7. Correlación entre las biodisponibilidades *in vivo* en rata, F, basadas en la relación entre las AUC oral/iv, y las permeabilidades apical-basolateral obtenidas en líneas celulares Caco-2.

PREDICCIÓN DE LA FRACCIÓN DE DOSIS ABSORBIDA A PARTIR DE DATOS *IN VITRO* E *IN SITU*

Las constantes de absorción y los valores de permeabilidad obtenidos a través de diferentes sistemas, es decir, *in vitro* e *in situ*, son determinados finalmente con el objetivo de predecir la fracción de dosis que se absorberá a través del intestino cuando el fármaco sea administrado por vía oral. Para usar los datos obtenidos en estos sistemas es necesario validarlos correctamente. Esta sección revisa el significado de los parámetros representativos de la absorción determinada con diferentes técnicas para predecir la absorción de fármacos *in vivo* en ausencia de cualquier paso limitante como la disolución o la solubilidad, por medio de los modelos descritos previamente. En particular, se ha estudiado la constante de absorción obtenida con un ensayo *in situ* sin recirculación, la permeabilidad a través de líneas celulares Caco-2 y los modelos PAMPA.

Predicción a partir de la constante de absorción *in situ* con técnicas experimentales sin recirculación

Como se ha explicado anteriormente, la constante de absorción *in situ* (k_a) puede obtenerse fácilmente utilizando una técnica experimental *in situ* sin recirculación. Hemos demostrado, utilizando una serie de siete fluoroquinolonas, que a partir de la k_a es posible predecir la fracción de dosis que se absorbería cuando se administrara esos fármacos por vía oral³⁴.

La ecuación usada para predecir la fracción de dosis absorbida *in vivo* (desde una disolución), F_a , de un fármaco o candidato a fármaco perteneciente a una serie, por medio de una simple determinación de su

constante de absorción intestinal intrínseca *in situ* (k_a) en ratas anestesiadas se describe en la ecuación 7.

$$F_a = 1 - e^{-k_a T}$$

Ecuación 7.

En la cual T es el tiempo de absorción, calculado por regresión no lineal entre la biodisponibilidad absoluta determinada desde curvas de niveles plasmáticos *in vivo*, obtenida tras una administración oral de los compuestos ensayados en disolución, y la k_a de esos mismos compuestos. Debe destacarse que esta expresión sólo es aplicable a compuestos que se absorben por difusión y que no sufren efectos de primer paso. Los compuestos que se absorben activamente (al menos en parte) a lo largo de la membrana del enterocito, así como aquellos que se secretan activa y sustancialmente al fluido luminal desde la membrana o incluso desde el citoplasma de las células (es decir, que son sustrato de glicoproteína-P) no deberían ser usadas para tales simplificaciones. Para los compuestos estudiados la fracción de dosis absorbida *in vivo* coincide con la biodisponibilidad oral (F), ya que se absorben pasivamente y no sufren metabolismo de primer paso. El ajustado de los valores de F y k_a 34-37 determinados para las siete quinolonas condujo a una estimación del tiempo de absorción T de $0,93 \pm 0,06$ h. La figura 6 muestra gráficamente la correlación. La Figura 6 muestra los valores predichos de F, usando en la ecuación 7, por medio del procedimiento de correlación que excluye un elemento de la correlación con objeto de predecir su biodisponibilidad (“dejar un elemento fuera”). Para todos los compuestos ensayados la predicción es bastante buena. Los valores de F predichos se correlacionan muy bien con los determinados *in vivo* a partir de las curvas de niveles plasmáticos.

Estas consideraciones son válidas usando ratas Wistar como modelo experimental. Debido a que la mayoría de procesos de absorción intestinal en ratas y en humanos parecen similares, puede ser viable usar, con menos modificaciones (es decir, el valor T), los datos de k_a *in situ* para hacer las predicciones de absorción en humanos.

Predicción a partir de las permeabilidades a través de líneas celulares Caco-2

Las líneas celulares Caco-2 han sido propuestas por diferentes autores como buenas técnicas para estudiar la permeabilidad de candidatos a fármacos, especialmente si pueden ser secretados activamente en el intestino por transportadores MDR. Desde nuestro punto de vista, esta línea celular puede ser

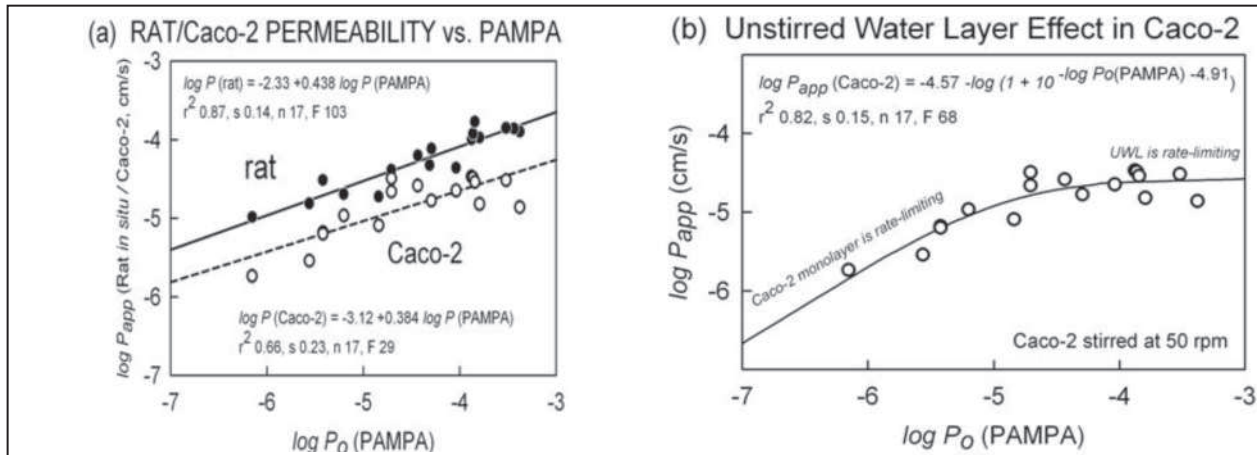


Figura 8. (a) Logaritmo del coeficiente de permeabilidad aparente *in situ* en rata (símbolos negros) y en Caco-2 (símbolos blancos) frente al logaritmo de los coeficientes de permeabilidad intrínsecos basados en las membranas PAMPA. (b) Efecto de la capa acuosa estática en los datos de Caco-2. Adaptada de Bermejo M et al³⁸.

utilizada no sólo para identificar transportadores implicados en la absorción de un fármaco, sino también para predecir, en líneas generales, la probable absorción de un candidato a fármaco.

El primer paso en esta dirección fue correlacionar los valores de permeabilidad obtenidos en las líneas celulares Caco-2 (dirección apical-basolateral, Pab) con la fracción de dosis absorbida *in vivo* en rata. Para este proyecto se estudiaron ocho fluoroquinolonas y los resultados encontrados en las líneas celulares Caco-2 fueron comparados con los obtenidos *in vivo* en rata. La permeabilidad de las quinolonas en las líneas celulares Caco-2 se evaluó a diferentes concentraciones iniciales, para poder identificar no linealidades en el proceso de absorción. Para algunas de ellas se observó que un sistema de secreción trabajaba en dirección contraria a la difusión pasiva; por esta razón el valor de permeabilidad utilizado para las correlaciones, en caso de detectar secreción, fue el obtenido a la concentración más alta de quinolona, la cual corresponde con la saturación del proceso de secreción.

La ecuación ajustada a los datos fue similar a la usada para los datos *in situ* se muestra con la ecuación 8.

$$F_a = 1 - e^{-P_{ab} \cdot \lambda}$$

Ecuación 8.

Donde λ es un parámetro del ajustado que no tiene equivalencia con ningún parámetro fisiológico, ya que las disoluciones estaban expuestas a la membrana a dosis infinitas durante los ensayos de permeación. Los resultados se resumen en la figura 7. Como se puede

observar, la correlación es significativa. Sin embargo, la biodisponibilidad de los compuestos más hidrófilos (norfloxacino y ciprofloxacino) es infraestimada por sus permeabilidades en líneas celulares Caco-2. El error medio de predicción de este modelo es más alto que el obtenido en los datos *in situ*.

PREDICCIÓN A PARTIR DE LOS SISTEMAS *IN VITRO* PAMPA

Los ensayos de permeabilidad en membranas artificiales paralelas (PAMPA, Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) fueron introducidos en 1998 para predecir permeabilidades *in vivo*. Desde entonces han ido ganando un interés considerable en la industria farmacéutica 38-44. Este método utiliza una capa de fosfolípidos sobre un filtro que actúa como soporte, de modo que se distinguen dos compartimentos acuosos, que permiten mimetizar la situación en la que se produce la difusión pasiva de moléculas pequeñas, no complicada por mecanismos activos. Debido a su velocidad, bajo coste y versatilidad, es un complemento particularmente útil a los modelos de permeabilidad celular, tales como Caco-2.

Las membranas artificiales se preparan dispersando un 20% (p/v) de solución de lecitina en dodecano (pION Inc., PN 110669) sobre un disco de microfiltro de 125 μm de espesor (y 0.45 μm de diámetro de poro). El sistema completo se agita adecuadamente para simular correctamente las situaciones *in vivo*, es decir, para obtener un espesor de la capa acuosa estática (CAE) de 30-100 μm ^{45,46}.

La capacidad de este sistema para predecir la absorción fue estudiada con diecisiete derivados de fluoroquinolonas.

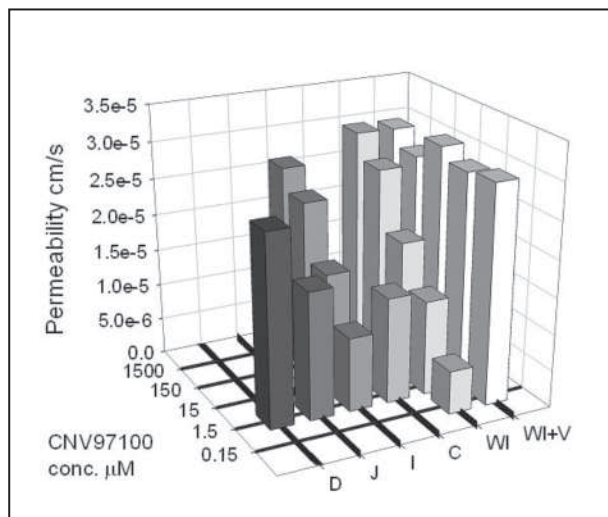


Figura 9. Permeabilidad en rata de CNV97100 en los diferentes segmentos intestinales a diferentes concentraciones iniciales y en presencia de verapamilo. D: Duodeno, J: Yeyuno, I: Íleon, C: Colon, WI: Intestino completo, WI+V: Intestino completo con verapamilo

Los resultados de permeabilidad intrínseca obtenidos en los sistemas PAMPA se compararon con los obtenidos por métodos *in vitro* más tradicionales, líneas celulares Caco-2, así como con modelos *in situ* en rata, los cuales ya han demostrado una buena capacidad para predecir la absorción oral *in vivo*, como se ha mencionado previamente⁴⁷.

Para establecer las correlaciones, los coeficientes de absorción obtenidos *in situ*, k_a (h⁻¹), fueron transformados en valores de permeabilidad (cm/s).

Para los experimentos en líneas celulares Caco-2, la permeabilidad efectiva calculada (P_{app} , cm/s) fue determinada como se ha descrito previamente (este valor corresponde con la permeabilidad en la dirección apical-basolateral, P_{ab}).

Los resultados obtenidos, resumidos en la figura 8, demuestran que las medidas PAMPA pueden predecir satisfactoriamente los datos *in vivo*, basándonos en la comparación entre ensayos de permeabilidad en ratas *in situ*, Caco-2 y PAMPA.

El primer paso fue explorar una relación lineal entre sistemas. En la Figura 8 (a) se muestra la regresión lineal P_{app} rata-PAMPA (línea continua) y la correlación entre Caco-2 y PAMPA (línea discontinua). Ambas correlaciones son estadísticamente significativas. Sin embargo, una revisión profunda de los datos de Caco-2 en la figura 8 (b) sugiere una relación hiperbólica, coherente con la obtenida por otros autores³⁸ y atribuible a la existencia de una capa acuosa estática. De modo que

corrigiendo los valores de permeabilidad obtenidos en los sistemas PAMPA al tener en cuenta el efecto de la capa acuosa estática las relaciones mejoran sensiblemente.

Como se puede observar, las medidas PAMPA pueden predecir los datos *in vivo* de fluoroquinolonas forma satisfactoria, tanto como los obtenidos por cultivos celulares, Caco-2. Por este motivo, pueden ser herramientas complementarias, rápidas en la determinación de la absorción de una potencial molécula candidata a fármaco, en las fases tempranas del proceso de desarrollo.

CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE TRANSPORTE ACTIVO

Cuando un transportador saturable está envuelto en el proceso de absorción, la permeabilidad no es un valor constante sino que es dependiente de la concentración del sustrato. En este caso es necesario caracterizar los parámetros del proceso mediado por transportadores, la constante de Michaelis-Menten (K_m) relacionada con la afinidad del sustrato por el transportador y V_m , la máxima velocidad de transporte. Si ocurre simultáneamente un proceso de difusión pasiva y uno de transporte activo, es necesario evaluar la contribución de cada proceso en el transporte. En la siguiente sección se describe un ejemplo de cómo caracterizar los parámetros de absorción en dos sistemas experimentales y cómo correlacionarlos.

ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS *IN SITU*

Se obtuvieron los valores de permeabilidad de CNV97100, un derivado de ciprofloxacino, en

Tabla 1. Parámetros estimados del transporte de CNV97100 en intestino delgado completo, duodeno, yeyuno e íleon. EE: Error estándar. CV%: Coeficiente de variación. Los ensayos fueron realizados sin utilizar ningún inhibidor⁴⁸.

Parámetros	Valor	EE	CV%
P_{diff} cm/s ¹	$2,96 \cdot 10^{-5}$	$5,88 \cdot 10^{-7}$	1,98
V_m Total Nmol/(cm ² ·s)	$1,91 \cdot 10^{-4}$	$3,63 \cdot 10^{-6}$	19,03
V_mD Nmol/(cm ² ·s)	$8,79 \cdot 10^{-5}$	$1,67 \cdot 10^{-6}$	19,03
V_mY Nmol/(cm ² ·s)	$1,98 \cdot 10^{-4}$	$3,77 \cdot 10^{-6}$	19,03
V_mI Nmol/(cm ² ·s)	$2,86 \cdot 10^{-4}$	$5,43 \cdot 10^{-6}$	19,03
K_m (µM)	12,74	2,43	20,8

VmTOTAL: velocidad máxima en intestino delgado completo. **VmD:** máxima velocidad máxima en duodeno; **VmY:** velocidad máxima en yeyuno; **VmI:** velocidad máxima en íleon. **VmD, VmY, y VmTOTAL** son parámetros secundarios calculados a partir de **VmI** (el CV% es el mismo).

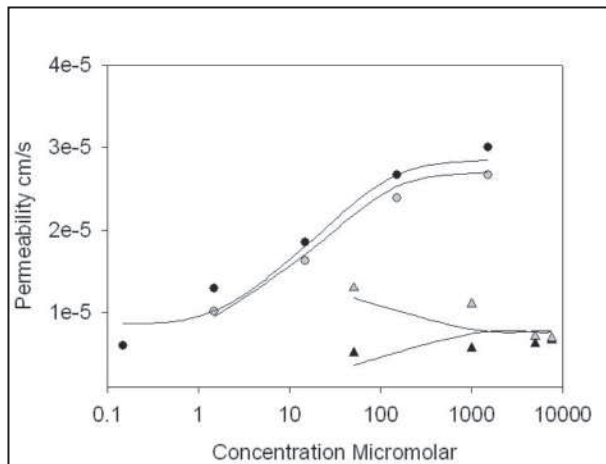


Figura 10. Permeabilidad de CNV97100 en intestino delgado completo (círculos negros) e íleon (círculos grises) y en células Caco-2 (A-B, triángulos negros y B-A triángulos grises). Las líneas son los valores obtenidos mediante las ecuaciones 31, 32 y 33.

diferentes segmentos del intestino delgado de rata. El compuesto estaba en disolución y el pH de los líquidos de perfusión en cada segmento fue el mismo. La permeabilidad fue más baja en el segmento terminal del intestino delgado de acuerdo con el nivel más alto de expresión de glicoproteína-P. Para confirmar que el transportador saturable estaba presente, se realizaron ensayos a diferentes concentraciones de la quinolona en el íleon y también en el intestino delgado completo. En ambos casos se encontró una relación no lineal entre permeabilidad y concentración, con valores de permeabilidad mayores a mayor concentración, atribuible a la saturación del transportador de secreción⁴⁹.

Los valores de permeabilidad obtenidos en los diferentes segmentos y a diferentes concentraciones iniciales se muestran en la figura 9.

Los datos de intestino delgado completo, duodeno, yeyuno e íleon fueron analizados simultáneamente. Para ello, fue necesario partir de los siguientes supuestos:

- a) La permeabilidad por difusión pasiva es la misma a lo largo del tracto gastrointestinal, puesto que los experimentos se realizaron al mismo valor de pH luminal.
- b) La afinidad del sustrato por el transportador (Km) es la misma en todos los segmentos del intestino.
- c) La velocidad de secreción máxima (Vm) depende del nivel de expresión del transportador de secreción (glicoproteína-P). Se tomó como valor basal el nivel de expresión en íleon (VmI). Los valores de velocidad máxima en duodeno (VmD) y yeyuno (VmY) fueron calculados a partir del valor basal y un factor de corrección (Ef), basado en la

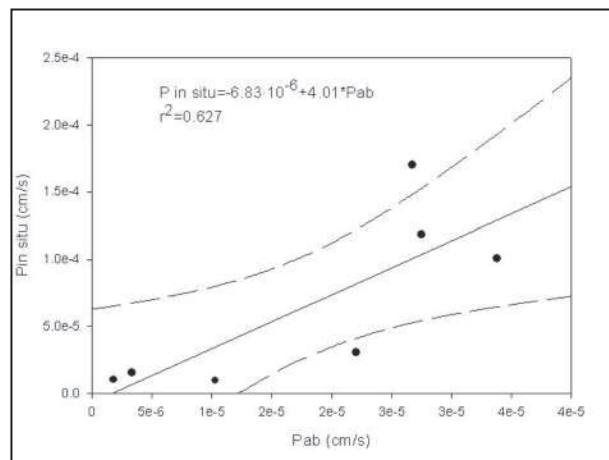


Figura 11. Permeabilidad in situ frente a permeabilidades apical-basolateral *in vitro*

expresión cuantitativa de mRNA-MDR1 obtenida en ratas Wistar por Takara et al⁴⁸. De este estudio se obtuvo los niveles de expresión a lo largo del intestino delgado: en duodeno (primeros 10 cm, desde el fin del estómago hasta el ligamento de Treitz) es 3,25 veces más bajo que en íleon (últimos 45 cm) y en yeyuno es 1,44 veces más bajo que en íleon. Así, Ef en el duodeno es de 1/(3,25) y Ef en íleon 1/(1,44).

El modelo cinético es el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales, la ecuación 9 y 10 donde C_i representa la concentración inicial de CNV97100, P_{diff} la permeabilidad por difusión pasiva, y K_m es la constante de Michaelis-Menten. R representa el radio efectivo y describe la relación volumen/superficie. El subíndice a se refiere al intestino completo y x está referido al segmento en cuestión: D para duodeno, Y para yeyuno, e I para íleon. La velocidad máxima fue estimada como el producto del valor basal (en íleon) y el factor de expresión (Ef) para los otros segmentos.

Tabla 2. Parámetros de la correlación *in vitro*-*in situ* de CNV97100 ⁴⁹.

Parámetros	Estima	EE	CV%
P_{diff} cm/s ¹	$7,71 \cdot 10^{-6}$	$5,98 \cdot 10^{-7}$	7,76
V_m Total Nmol/(cm ² ·s)	$9,06 \cdot 10^{-5}$	$2,82 \cdot 10^{-5}$	31,15
K_m (μM)	16,23	5,50	33,29
SF	3,53	0,30	8,57
Ef	3,02	1,13	37,49
r^2	0,965		
SCR	$4,01 \cdot 10^{-11}$		
AIC	-394,98		

Para el intestino delgado completo, la velocidad máxima fue tomada como el promedio ponderado de todos los segmentos. Los parámetros de transporte están resumidos en la tabla 1 junto con los índices de bondad de ajuste.

$$\frac{dC_i}{dt} = -\left(\frac{2}{R_a} * P_{diff}\right) * C_i + \frac{2}{R_a} * \frac{V_{mTotal} * C_i}{K_m + C_i}$$

Ecuación 9.

$$\frac{dC_i}{dt} = -\left(\frac{2}{R_x} * P_{diff}\right) * C_i + \frac{2}{R_x} * \frac{V_{mx} * C_i}{K_m + C_i}$$

Ecuación 10.

CORRELACIONES IN VITRO-IN SITU

La misma quinolona, CNV97100, fue usada para realizar ensayos bidireccionales en células Caco-2 con el fin de obtener las permeabilidades apical-basolateral (Pab) y basolateral-apical (Pba) a diferentes concentraciones iniciales. Se examinó la relación entre los valores de permeabilidad de CNV97100 obtenidos previamente *in situ* en rata e *in vitro* en Caco-2 (en ambos sistemas la permeabilidad paracelular de CNV97100 se consideró insignificante). Los sistemas difieren en la superficie efectiva de absorción y en el nivel de expresión de transportadores de secreción. Aunque el nivel de expresión de glicoproteína-P en Caco-2 es similar al nivel de expresión en íleon de rata, el modelo permite diferencias entre los sistemas (Ef).

El tratamiento conjunto de los datos se realizó utilizando las ecuaciones 11, 12 y 13; donde P^{eff} representa la permeabilidad experimental, P_{diff} el componente de difusión pasiva, S_f es el factor de corrección del área y E_f un factor de corrección para el nivel de expresión de glicoproteína-P en células Caco-2 e intestino delgado.

El resultado del tratamiento simultáneo del lote de datos de intestino completo (permeabilidades *in situ* e *in vitro*) se muestra en la figura 10. Los parámetros obtenidos están resumidos en la tabla 2.

En las monocapas celulares las permeabilidades experimentales observadas a cada concentración se calculan como el flujo efectivo, es decir, la cantidad de compuesto transportado por unidad de tiempo y unidad de área. El área utilizada para los cálculos corresponde a la del inserto. Como las células forman una monocapa en el inserto, este valor de área no tiene en cuenta el incremento de superficie debido a la presencia de microvilli.

$$Apical-Basal P_{eff} = P_{diff} \frac{E_f * V_m}{K_m + C}$$

Ecuación 11.

$$Basal-Apical P_{eff} = P_{diff} + \frac{E_f * V_m}{K_m + C}$$

Ecuación 12.

$$Rata P_{eff}^{Rata} = S_f * \left(P_{diff} - \frac{V_m}{K_m + C}\right)$$

Ecuación 13.

Por otra parte, en el diseño experimental para los ensayos *in situ* en rata se midió la evolución de la concentración frente al tiempo, reflejando la desaparición del fármaco desde el lumen, debido al proceso de absorción. Las permeabilidades se calculan a partir de los valores de las constantes de velocidad de absorción obtenidos, utilizando la relación área/volumen. Para este cálculo, en realidad se usa el área del cilindro geométrico (A) en lugar de la superficie disponible debido a los pliegues de Kerkring, villi y microvilli (A multiplicado por S_p, donde A es la superficie del cilindro geométrico y S_f es el factor de aumento de la superficie debido a los pliegues y los villi). De este modo, si se usa una estimación de la superficie intestinal que es menor que el valor real, el valor de permeabilidad experimental en rata se sobreestima, es decir, que ya incluye S_f (Ecuación 14).

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{2}{R} * S_f * P_{eff} * C_i + \frac{2}{R} * P_{eff}^{Rata} * C$$

$$P_{eff}^{Rata} = S_f * P_{eff}$$

Ecuación 14.

Este es uno de los motivos para obtener valores de permeabilidad en rata o humanos que suelen ser de 5 a 10 veces más altos que los correspondientes valores en células Caco-2.

En primer lugar se usó este modelo matemático para correlacionar las permeabilidades *in vitro* e *in situ* de grepafloxacin y ciprofloxacino 50, y el factor de corrección del área S_f obtenido fue de alrededor de cuatro, que se asemeja a los resultados obtenidos por otros autores⁵¹. Esta diferencia se explica por las diferencias en la superficie de absorción en los modelos *in situ* frente a los *in vitro*, porque este último presenta microvilli, pero no villi ni pliegues.

Una vez obtenidos estos resultados comparando sólo dos compuestos, se amplió el número de elementos de la correlación a todas las quinolonas incluidas en la figura 6, y el factor de corrección del área no experimentó ninguna modificación (Figura 11). A pesar de que este modelo ha sido construido utilizando supuestos muy simplistas, los resultados son prometedores y demuestran que un buen modelado ayuda a identificar los parámetros críticos del sistema y cómo el comportamiento del sistema cambia desde el nivel *in vitro* al *in situ*⁵⁰. Es un hecho importante que con esta correlación se supo que la principal diferencia entre ambos sistemas es el área efectiva real para el transporte. Sin embargo, el modelo está lejos de ser perfecto, ya que es probable que haya más diferencias entre ambos sistemas experimentales, como diferente resistencia paracelular o diferentes niveles de expresión del transportador, que expliquen las diferencias en los parámetros obtenidos.

CONCLUSIONES

Existe gran número de modelos experimentales para predecir a absorción oral, desde modelos *in vitro* como las membranas artificiales paralelas PAMPA y cultivos celulares intestinales hasta experimentos en animales *in situ* e *in vivo*. La correlación con datos en humanos es generalmente mejor con los modelos más complejos pero, por supuesto, los primeros sistemas tienen una puesta a punto y desarrollo más rápidos. Por este motivo es de suma importancia desarrollar modelos *in vitro* para predecir resultados en humanos. Los resultados que se han presentado en esta revisión ponen de manifiesto que estos sistemas *in vitro* y algunos de los modelos matemáticos que se aplican permiten estimar correctamente la capacidad de absorción de compuestos que se absorben mediante difusión pasiva aunque se necesitan más investigaciones para mejorar la capacidad de predicción de estos sistemas cuando intervienen procesos mediados por transportadores; en este caso, el desarrollo de modelos mecanicísticos que incluyan variables fisiológicas relevantes podrían ser útiles.

SUMMARY

In vitro, *in situ* and *in vivo* correlations in drug absorption.

Predicting drug rate and extent from the gastrointestinal tract is a key step in the process of new drug design and development. To predict oral absorption different approaches, like *in vitro* methods or *in situ* or *in vivo* animal experiments, have been used. We will analyse some of the mathematical models that have been applied: (a) to study intestinal drug absorption and the influence of surfactants on intestinal permeability, (b) to predict oral fraction absorbed, (c) to characterize active and passive transport parameters, and (d) correlations between *in vitro* and *in situ* results.

More complex models lead to better correlations with human values, but these systems have a lower throughput, so there is a need to develop models that allow scaling up from the *in vitro* data. *In vitro* systems perform well for estimating passive diffusion absorption but more research is necessary with regard to carrier-mediated absorption processes (MED.UIS. 2008;21(1):17-31).

Key words: Mathematical modelling of absorption. Absorption prediction. Experimental models for absorption. *In vitro-in vivo* correlations.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wagner JG, Sedman AJ. Quantitation rate of gastrointestinal and buccal absorption of acidic and basic drugs based on extraction theory. *J Pharmacokin Biopharm* 1973;1:23-50.
2. Wagner JG. Absorption models. In Wagner JG, editor *Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics*, ed., Hamilton, Illinois: Drug Intelligence Publications. 1975. p 203-29.
3. Ho NFH, Park JY, Morozovich W, Higuchi WI. Design of Biopharmaceutical properties through pro-drugs and analogs. EB Roche ed. APHA Washington. 1977. p35.
4. Higuchi WI. Ho NFH, Park JY, Komiya I. Drug absorption. MTP Press ed. Edinburg: LF Prescott, WS Nimmo. 1981. p 35.
5. Pla-Delfina JM, Moreno J. Intestinal absorption-partition relationships: a tentative functional nonlinear model. *J Pharmacokin Biopharm* 1981;9;(2):191-215.
6. Martin-Villodre A, Pla-Delfina JM, Moreno J, Perez-Buendia D, Miralles J, Collado EF, Sanchez-Moyano E, del Pozo A. Studies on the reliability of a bihyperbolic functional absorption model I. Ring-substituted anilines. *J Pharmacokin Biopharm* 1986;14;(6):615-33.
7. Hills BA, Butler BD, Lichtenberger LM. Gastric mucosal barrier: hydrophobic lining to the lumen of the stomach. *Am J Physiol* 1983;244;(5):G561-568.
8. Garrigues TM, Perez-Varona AT, Climent E, Bermejo MV, Martin-Villodre A, Pla-Delfina JM. Gastric absorption of acidic xenobiotics in the rat: Biophysical interpretation of an apparently atypical behaviour. *Int J Pharm* 1990;64:127-38.
9. Attwood D, Florence AT. *Surfactant systems, their chemistry, pharmacy and biology*. Ed., London: Chapman & Hall Ed. 1983.
10. Sun W, Larive CK, Southard MZ. A mechanistic study of danazol dissolution in ionic surfactant solutions. *J Pharm Sci* 2003;92;(2):424-35.
11. Rao VM, Lin M, Larive CK, Southard MZ. A mechanistic study of griseofulvin dissolution into surfactant solutions under laminar flow conditions. *J Pharm Sci* 1997;86;(10):1132-7.
12. Li P, Zhao L. Solubilization of flurbiprofen in pH-surfactant solutions. *J Pharm Sci* 2003;92;(5):951-6.
13. Li P, Patel H, Tabibi SE, Vishnuvajjala R, Yalkowsky SH. Evaluation of intravenous flavopiridol formulations. *PDA J Pharm Sci Technol* 1999;53;(3):137-40.
14. Jinno J, Oh D, Crison JR, Amidon GL. Dissolution of ionizable water-insoluble drugs: the combined effect of pH and surfactant. *J Pharm Sci* 2000;89;(2):268-74.

15. Crison JR, Weiner ND, Amidon GL. Dissolution media for *in vitro* testing of water-insoluble drugs: effect of surfactant purity and electrolyte on *in vitro* dissolution of carbamazepine in aqueous solutions of sodium lauryl sulfate. *J Pharm Sci* 1997;86;(3):384-8.
16. Crison JR, Shah VP, Skelly JP, Amidon GL. Drug dissolution into micellar solutions: development of a convective diffusion model and comparison to the film equilibrium model with application to surfactant-facilitated dissolution of carbamazepine. *J Pharm Sci* 1996;85;(9):1005-11.
17. Alkhamis KA, Allaboun H, Al-Momani WY. Study of the solubilization of gliclazide by aqueous micellar solutions. *J Pharm Sci* 2003;92;(4):839-46.
18. Malik SN, Canaham DH, Gouda MW. Effect of surfactants on absorption through membranes III: effects of dioctyl sodium sulfosuccinate and poloxalene on absorption of a poorly absorbable drug, phenolsulfonphthalein, in rats. *J Pharm Sci* 1975;64;(6):987-90.
19. Gibaldi M, Feldman S. Mechanisms of surfactant effects on drug absorption. *J Pharm Sci* 1970;59;(5):579-89.
20. Pla Delfina JM, Perez-Buendia MD, Casabo VG, Peris-Ribera JE, Sanchez-Moyano E, Martin-Villodre A. Absorption-partition relationships for true homologous series of xenobiotics as a possible approach to study mechanisms of surfactants on absorption I. Aromatics amines in rat colon. *Int J Pharm* 1987;37:49-64.
21. Garrigues TM, Perez-Varona AT, Bermejo MV, Martin-Villodre A. Absorption-partition relationships for true homologous series of xenobiotics as a possible approach to study mechanisms of surfactants on absorption IV. Phenylacetic acid derivatives and anionic surfactants. *Int J Pharm* 1992;79:135-40.
22. Bermejo MV, Perez-Varona AT, Segura-Bono MJ, Martin-Villodre A, Pla-Delfina JM, Garrigues TM. Compared effects of synthetic and natural bile surfactants on xenobiotic absorption I. Studies with polysorbate and taurocholate in rat colon. *Int J Pharm* 1991;69:221-3.
23. Martinez-Coscolla A, Miralles-Loyola E, Garrigues TM, Sirvent MD, Salinas E, Casabo VG. Studies on the reliability of a novel absorption-lipophilicity approach to interpret the effects of the synthetic surfactants on drug and xenobiotic absorption. *Arzneimittelforschung* 1993;43;(6):699-705.
24. Fabra-Campos S, Climent E, Sanchis-Cortes A, Pla-Delfina JM. Compared effects of synthetic and natural bile acid surfactants IV. Studies with taurocholate in the rat small intestine. *Int J Pharm* 1994;107:197-207.
25. Fabra-Campos S, Real JV, Gomez-Meseguer V, Merino M, Pla-Delfina JM. Biophysical absorption models for phenyl-alkyl acids in the absence and in the presence of surfactants. Studies in the rat small intestine. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1991;3:32-42.
26. Collado EF, Fabra-Campos S, Peris-Ribera JE, Casabo VG, Martin-Villodre A, Pla-Delfina JM. Absorption-partition relationships for true homologous series of xenobiotics as a possible approach to study mechanisms of surfactants on absorption II. Aromatics amines in rat small intestine. *Int J Pharm* 1988;44:187-96.
27. Garrigues TM, Climent E, Fabra-Campos S, Perez-Buendia MD, Martin-Villodre A, Pla-Delfina JM. Absorption-partition relationships for true homologous series of xenobiotics as a possible approach to study mechanisms of surfactants on absorption III. Aromatics amines and cationic surfactants. *Int J Pharm* 1989;57:189-96.
28. Poelma FG, Tukker JJ, Crommelin DJ. Intestinal absorption of drugs. I: The influence of taurocholate on the absorption of dantrolene in the small intestine of the rat. *J Pharm Sci* 1989;78;(4):285-9.
29. Kimura T, Inui K, Sezaki H. Differences in effects on drug absorption between dihydroxy and trihydroxy bile salts. *J Pharmacobiodyn* 1985;8;(7):578-85.
30. Segura-Bono MJ, Garrigues TM, Merino V, Bermejo MV. Compared effects of synthetic and natural bile surfactants on xenobiotic absorption III. Studies with mixed micelles. *Int J Pharm* 1994;107:159-66.
31. Garrigues TM, Segura-Bono M, Bermejo MV, Merino V, Pla-Delfina JM. Compared effects of synthetic and natural bile surfactants on xenobiotic absorption II. Studies with sodium glycocholate to confirm hypothesis. *Int J Pharm* 1994;107:209-17.
32. Rege BD, Kao JP, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci* 2002;16;(4-5):237-46.
33. Batrakova EV, Li S, Vinogradov SV, Alakhov VY, Miller DW, Kabanov AV. Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299;(2):483-93.
34. Sanchez-Castaño G, Ruiz-Garcia A, Banon N, Bermejo M, Merino V, Freixas J, Garrigues TM, Pla-Delfina JM. Intrinsic absolute bioavailability prediction in rats based on *in situ* absorption rate constants and/or *in vitro* partition coefficients: 6-fluoroquinolones. *J Pharm Sci* 2000;89;(11):1395-403.
35. Ruiz-Garcia A, Bermejo M, Merino V, Sanchez-Castaño G, Freixas J, Garrigues TM. Pharmacokinetics, bioavailability and absorption of flumequine in the rat. *Eur J Pharm Biopharm* 1999;48;(3):253-8.
36. Merino V, Freixas J, Bermejo M, Garrigues TM, Moreno J, Pla-Delfina JM. Biophysical models as an approach to study passive absorption in drug development: 6-fluoroquinolones. *J Pharm Sci* 1995;84;(6):777-82.
37. Bermejo M, Merino V, Garrigues TM, Pla Delfina JM, Mulet A, Vizet P, Trouiller G, Mercier C. Validation of a biophysical drug absorption model by the PATQSAR system. *J Pharm Sci* 1999;88;(4):398-405.
38. Youdim KA, Avdeef A, Abbott NJ. *In vitro* trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. *Drug Discov Today* 2003;8;(21):997-1003.

39. Kansy M, Fischer H, Kratzat K, Senner F, Wagner B, Parrilla I. High-throughput artificial membrane permeability studies in early lead discovery and development. In Testa B. van der Waterbeemd H, Folkers G, Guy R. editor Pharmacokinetics Optimization in Drug Research, Verlag Helvetica Chimica Acta/Wiley-VCH ed., Zürich/Weinheim. 2001. p 447-64.
40. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem* 1998;41;(7):1007-10.
41. Faller B, Wohnsland F. Physicochemical parameters as tools in drug discovery and lead optimization. In Testa B. van der Waterbeemd H, Folkers G, Guy R. editor Pharmacokinetics Optimization in Drug Research, Verlag Helvetica Chimica Acta/Wiley-VCH ed., Zürich/Weinheim. 2001. p 257-74.
42. Avdeef A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr Top Med Chem* 2001;1;(4):277-351.
43. Avdeef A. High-throughput measurements of permeability profiles. In van der Waterbeemd H, Lennernas H, Artursson P. editor Drug Bioavailability Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability, Wiley-VCH ed., Weinheim. 2003. p 46-70.
44. Avdeef A. Absorption and Drug Development. Solubility, Permeability, Charge State. Wiley-Interscience ed., New York. 2003.
45. Lennernas H. Human intestinal permeability. *J Pharm Sci* 1998;87;(4):403-410.
46. Ruell JA, Tsinman KL, Avdeef A. PAMPA- a drug absorption *in vitro* model. 5. Unstirred water layer in iso-pH mapping assays and pKa(flux)- optimized design (pOD-PAMPA). *Eur J Pharm Sci* 2003;20;(4-5):393-402.
47. Bermejo M, Avdeef A, Ruiz A, Nalda R, Ruell JA, Tsinman O, Gonzalez I, Fernandez C, Sanchez G, Garrigues TM, Merino V. PAMPA- a drug absorption *in vitro* model 7. Comparing rat *in situ*, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *Eur J Pharm Sci* 2004;21;(4):429-441.
48. Takara K, Ohnishi N, Horibe S, Yokoyama T. Expression profiles of drug-metabolizing enzyme CYP3A and drug efflux transporter multidrug resistance 1 subfamily mRNA in small intestine. *Drug Metab Dispos* 2003;31;(10):1235-39.
49. Gonzalez-Alvarez I, Fernandez-Teruel C, Casabo-Alos VG, Garrigues TM, Polli JE, Ruiz-Garcia A, Bermejo M. *In situ* kinetic modeling of intestinal efflux in rats: functional characterization of segmental differences and correlation with *in vitro* results. *Biopharm Drug Dispos* 2007;28;(5):229-39.
50. Rodriguez-Ibañez M, Sanchez-Castaño G, Montalar-Montero M, Garrigues TM, Bermejo M, Merino V. Mathematical modeling of *in situ* and *in vitro* efflux of ciprofloxacin and grepafloxacin. *Int J Pharm* 2006;307;(1):33-41.
51. Stewart BH, Chan OH, Lu RH, Reyner EL, Schmid HL, Hamilton HW, Steinbaugh BA, Taylor MD. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple *in vitro* and *in situ* models: relationship to absorption in humans. *Pharm Res* 1995;12;(5):693-9.