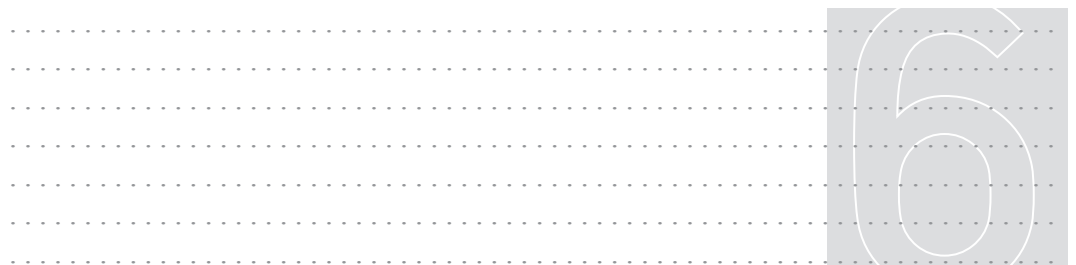

■ Capítulo 6

**El uso de saliva en estudios
de biodisponibilidad relativa**



La secreción salival es producida en el hombre por tres pares de glándulas denominadas parótidas, submaxilares y sublinguales. Estas glándulas están constituidas por acinos, cuyos productos se vuelcan en la luz de estas estructuras y drenan a través de conductos llamados intercalares. Los conductos intercalares de distintos acinos confluyen para formar conductos de mayor calibre, intralobulares e interlobulares, y finalmente los conductos excretores conforman un conducto único de mayor tamaño que termina en la cavidad bucal (Houssay et al., 1988).

Tanto los acinos como los conductos poseen una rica vascularización con densas redes capilares. La irrigación sanguínea de estas glándulas se inicia en la arteria carótida. Las arteriolas se capilarizan a nivel de las células de acinos y conductos (acinosas y ductales). La sangre proveniente de los capilares ductales se vierte en los capilares acinosos por medio de vénulas porta y de allí vuelve a la circulación sistémica por intermedio de vénulas (Jacobson, 1981).

La producción de saliva se origina en los acinos por filtración del plasma sanguíneo, por lo que a esa altura la composición electrolítica de la saliva es similar al ultrafiltrado del plasma que irriga la zona. Aunque el mecanismo es más complejo que una simple ultrafiltración (Guyton & Hall, 2006), la secreción de las células acinosas no difiere cuantitativamente del plasma sanguíneo, a excepción de moléculas no difusibles. Esta secreción primaria se convierte luego en hipotónica durante su paso por los conductos, a través de los cuales se producen movimientos de solutos pero no de agua, ya que las células ductales son impermeables al agua (Houssay et al., 1988).

El resultado de tales transferencias da como producto la saliva emitida a la cavidad bucal. Por día se secretan aproximadamente 1200 ml de saliva, la cual tiene un pH que varía entre 6,2 y 7,4. Se ha demostrado que el cambio de pH salival es totalmente dependiente del cambio en la velocidad de producción de saliva: el mayor valor de pH se observa cuando la secreción es mayor, debido a un aumento en el contenido de bicarbonato (Drobitch & Svensson, 1992).

La inervación de las glándulas salivales proviene del sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático. El estímulo secretorio más importante proviene del parasimpático, vía nervios glosofaríngeo y facial, y produce de manera simultánea vasodilatación, activación de los mecanismos de transporte de las células de los conductos y producción de una saliva abundante y acuosa. Por lo tanto aumenta la cantidad de saliva, como así también el flujo, ya que el mioepitelio que rodea los acinos y conductos se contrae por estímulo de la acetilcolina, produciendo la expulsión de la saliva hacia la boca. Por el contrario, la estimulación simpática (fibras posganglionares procedentes del ganglio cervical superior) se acompaña de vasoconstricción y de la producción de una saliva escasa y viscosa (Houssay et al., 1988).

En cuanto a la aparición de los principios activos, sólo la fracción no ligada de fármaco presente en el plasma es capaz de difundir a la saliva (Horning et al., 1977). Teóricamente, todos los mecanismos de transporte son aplicables para que los fármacos accedan desde la sangre a la saliva, pero hasta el momento la difusión pasiva por partición pH-dependiente ha sido el más aceptado y preponderante dentro del conjunto de procesos que cursan simultáneamente. Para algunos fármacos se ha aceptado también que su transferencia a la saliva tenga una contribución por transporte activo (Groth et al., 1974; Hayashi et al., 1988), utilizando bombas de eflujo que pueden incluso inducirse bajo diferentes circunstancias (Maldonado et al., 2011).

Para predecir el cociente de concentraciones saliva/plasma (S/P) puede aplicarse la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$S/P = \frac{1 + 10^{(pH_{saliva} - pKa)}}{1 + 10^{(pH_{plasma} - pKa)}} \cdot \frac{f_{plasma}}{f_{saliva}}$$

■ Ecuación 6-1

Esta ecuación corresponde a drogas ácidas (en el caso de drogas básicas, se deben cambiar los signos del exponente), donde f_{plasma} y f_{saliva} representan las fracciones de droga libre en plasma y saliva respectivamente. Como los pHs en plasma y saliva son similares, el cociente S/P es una buena estima de la fracción libre en plasma para ciertos principios activos, dado que el fármaco en saliva se halla libre ($f_{saliva} = 1$, ver Tabla 6-1).

■ **Tabla 6-1.** Algunos ejemplos de drogas cuyo cociente S/P representa una buena estimación de la fracción libre en plasma. El Litio se incluye como ejemplo de droga activamente transportada desde el plasma a la saliva (Horning et al., 1977)

| Droga | Plasma libre / total | Cociente saliva / plasma |
|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Aminopirina</i> | 0,85 | 0,80 |
| <i>Carbamazepina</i> | 0,24 – 0,33 | 0,37 |
| <i>Digoxina</i> | 0,77 | 0,78 |
| <i>Fenacetina</i> | 0,60 – 0,70 | 0,60 |
| <i>Fenitoína</i> | 0,10 – 0,14 | 0,09 – 0,11 |
| <i>Primidona</i> | 0,78 – 0,97 | 0,97 – 1,08 |
| <i>Teofilina</i> | 0,41 | 0,52 |
| <i>Acido Salicílico</i> | 0,20 – 0,55 | 0,03 – 0,04 |
| <i>Litio</i> | 1,00 | 2,20 – 2,30 |

La tabla anterior enumera los cocientes S/P informados para varias drogas junto con los cocientes entre la concentración libre/total en plasma para las mismas drogas. Cuando los valores de S/P coinciden con la relación libre/total en plasma, la concentración salival es una buena estima de la concentración de droga libre en plasma. El litio se incluye en la tabla como un ejemplo de droga que llega a la saliva por transporte activo y no por difusión pasiva.

Como la concentración final de un fármaco en saliva puede variar con la velocidad de producción de la misma (Stephen et al., 1980; Zuidema & van Ginneken, 1983), en los protocolos de trabajo siempre se debe aclarar la forma de obtención de las muestras salivales. Para aumentar el volumen de muestra, es frecuente estimular la salivación mediante la masticación de parafilm o mediante cristales de ácido cítrico sobre la lengua (Ritschel & Tompson, 1983).

En numerosas oportunidades, los investigadores han intentado justificar el uso de saliva como fluido biológico en estudios farmacocinéticos, biofarmacéuticos y/o clínicos, a partir de establecer correlaciones entre datos salivales y datos plasmáticos. De esa manera, la opinión acerca del uso de saliva se dividió en *a favor* y *en contra* según los resultados de las correlaciones fueran buenos o malos (Fagiolino, 1999).

Entre quienes afirmaron haber encontrado una buena correlación generalmente se incluyen quienes trabajaron con muestras obtenidas en fase de eliminación o luego de alcanzar el estado estacionario en dosis múltiples (Heim et al., 1980; Jonkman et al., 1981; Lee et al., 1996; Meffin et al., 1977; Plavsic et al., 1981; Shah & Riegelman, 1974; Thijssen et al., 1996). La correlación significativa saliva-plasma también fue informada cuando se estimuló la salivación (Blanchard et al., 1991; Blanchard et al., 1992; Knott et al., 1984; Siegel et al., 1990) o cuando se estudiaron sustancias endógenas (Shimada et al., 1995).

En tanto, los argumentos contrarios al uso de saliva se basaron en la alta variabilidad inter e intra individual del cociente S/P (Cardot et al., 1995; Danhof & Breimer, 1978; Uden et al., 1981), el cual es muy variable y más alto durante la fase de absorción del medicamento (Glynn & Bastain, 1973; Hold et al., 1995; Knop et al., 1975; Koup et al., 1975; Lowe & Dixon, 1983; Lowenthal et al., 1976; Smith et al., 1991). Si bien resulta aceptable que la relación S/P varíe entre distintos individuos, no sería adecuado que un mismo sujeto muestre cocientes S/P variables a lo largo del día o durante el intervalo de administración del medicamento.

Para algunos fármacos, también se ha encontrado que el cociente S/P es diferente según si se evalúa en dosis única o en dosis múltiple. En la mayoría de los casos, se encuentran S/P variables durante la fase de absorción y constantes en fase de eliminación o estado estacionario (estos dos últimos, no necesariamente iguales). Por otra parte, los perfiles de concentraciones salivales de fármacos en función del tiempo son altamente variables, mostrando varios picos que dificultan el cálculo de los parámetros farmacocinéticos y/o su interpretación (Figura 6-1).

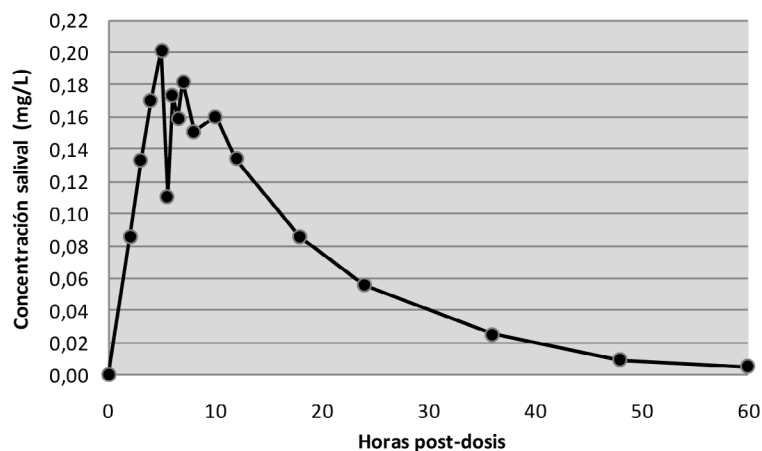


Figura 6-1. Concentración salival de Fenitoína (PHT) en función del tiempo en un voluntario sano luego de la administración de una cápsula conteniendo 100 mg de PHT

De acuerdo a lo señalado, existe gran controversia acerca del uso de saliva para el monitoreo de drogas, tanto durante estudios de BE como para monitoreos terapéuticos. La falta de un cociente S/P constante (y por lo tanto, la falta de correlación S/P) constituye el mayor inconveniente, en contraposición a las ventajas de su uso: mayor facilidad de extracción, método no invasivo, conveniente en pediatría, menores costos, posibilidad de monitoreo domiciliario, etcétera.

Una de las primeras teorías que se postuló para explicar los elevados cocientes S/P observados luego de la administración oral fue la que atribuía dicho resultado a la contaminación de la mucosa oral con el fármaco ingerido. Si bien la contaminación de la cavidad oral ciertamente representa una potencial causa de error, no explica por qué los cocientes S/P siguen siendo elevados cuando dicha contaminación es excluida o cuando la droga se administra por otra vía (rectal, por ejemplo). Otros autores también sugirieron que ciertas drogas podían ser secretadas de manera activa a la saliva, como procainamida, metoprolol y propranolol (Hold et al., 1995). Sin embargo, el transporte activo explicaría un elevado cociente S/P durante toda la curva (hasta la eliminación del fármaco del organismo), y no solamente durante la fase de absorción (Fagiolino, 1999). Finalmente, surgieron modelos que lograron explicar la variabilidad del cociente S/P, y en esta ocasión vamos a detallar dos de ellos: un modelo físico, propuesto por Posti en 1982 y uno farmacocinético, relacionado con el primero, desarrollado por Fagiolino y colaboradores en 1988.

Ambos se basan en la premisa de que las concentraciones plasmáticas de droga en arteria son mayores a las venosas mientras perdura el ingreso de una droga al organismo: luego de la administración oral, la droga absorbida ingresa en la sangre que fluye por el tracto gastrointestinal, hígado, corazón, circulación pulmonar y luego, vía aorta y otras arterias, se distribuye al resto del organismo. Entre los tejidos que irriga están las glándulas salivales, a las que llega sangre que sufrió muy poca capilarización (salvo en pulmón) y distribución de fármaco, por lo que va a tener una mayor concentración de principio activo. Si el equilibrio entre la fracción de droga libre (y por lo tanto, permeable) en sangre arterial y la droga en saliva se establece rápidamente, se observará un cociente S/P mayor durante el período de absorción.

Los experimentos con lidocaína en humanos llevados a cabo por Tucker y colaboradores (Tucker & Boas, 1971; Tucker & Mather, 1975) confirman lo anterior: la difusión capilar origina la disminución de las concentraciones de la droga en la vasculatura (Figura 6-2).

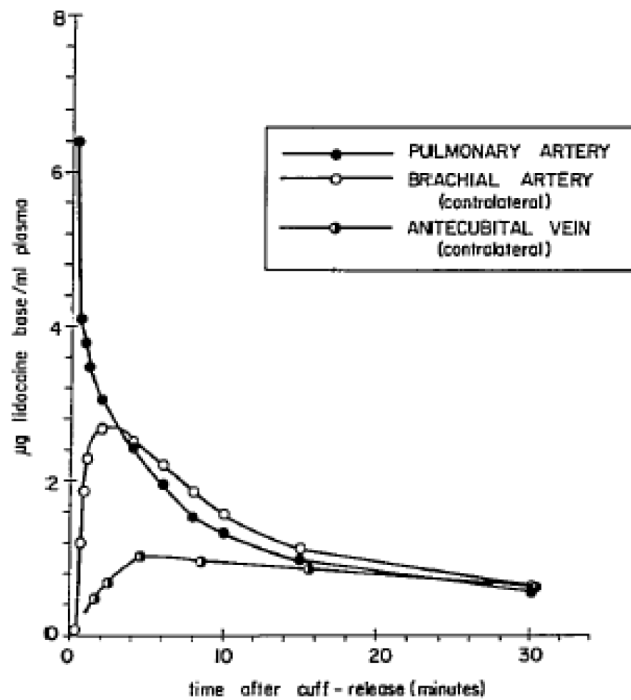


Figura 6-2. Niveles plasmáticos de lidocaína (μg lidocaína base/ml) en un voluntario luego del cese de administración (cuff-release) IV en uno de sus brazos de lidocaína HCl, 3 mg/kg, solución al 0.5% durante 45 minutos (Tucker & Boas, 1971). Pulmonary artery: arteria pulmonar. Brachial artery: arteria braquial (arteria del brazo contrario). Antecubital vein: vena ante-cubital (vena del brazo contrario)

En 1982, Lam & Chiou realizaron un experimento que consistía en inyectar procainamida por la vena yugular de conejos para determinar luego, y de forma simultánea, su concentración en la arteria carótida y la vena femoral (Lam & Chiou, 1982). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6-3, donde se observa que corroboran lo anterior y van más allá: las concentraciones arteriales de droga son mayores a las venosas mientras continúa el ingreso de droga al organismo: en cada ciclo circulatorio, la sangre venosa realimenta a la arterial con fármaco, y ésta además recibe el aporte exógeno de fármaco.

Sin embargo, finalizada la administración de procainamida, cuando las concentraciones comienzan a decaer, la relación arteria-vena se invierte, ya que el retorno de droga desde el sistema venoso al sistema arterial se ve disminuido por la pérdida de sustancia en los órganos eliminadores. Es importante notar aquí que a pesar de las diferencias arteria-vena descritas, las ABC resultantes de la integración de ambas curvas son idénticas.

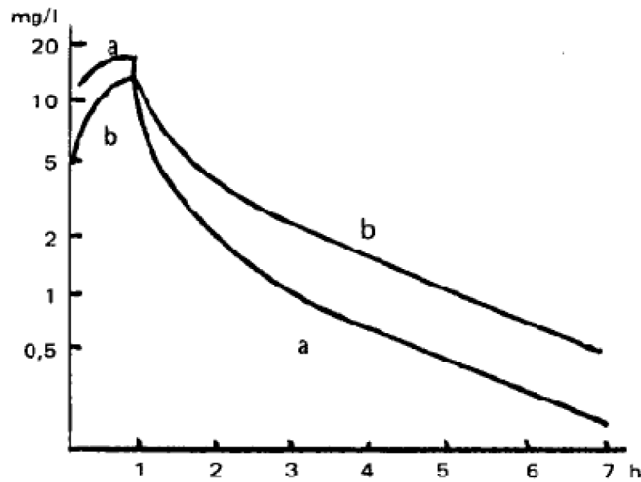


Figura 6-3. Niveles de procainamida (mg/L) en plasma de arteria (a) y vena (b), luego de la infusión de droga a 244 mg/h durante 54 minutos, en conejo (Fagiolino, 1999)

Modelo físico (Posti, 1982)

En primer lugar el autor postuló el modelo anatómico-fisiológico (Figura 6-4), luego de lo cual planteó una reducción del mismo hasta un modelo físico consistente en un recipiente homogéneo de volumen V y una bomba de circulación que retira e ingresa líquido al recipiente.

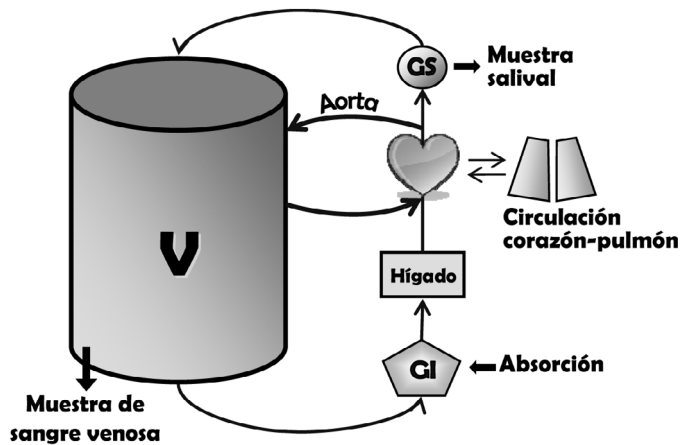
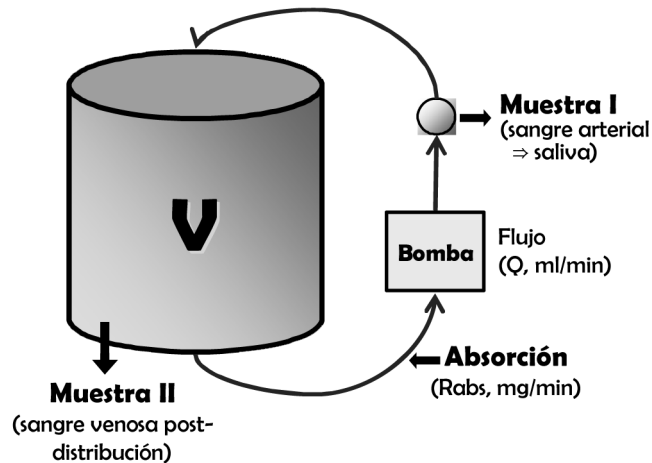


Figura 6-4. Esquema que representa la absorción y distribución en el organismo. Adaptado de Posti, 1982

El modelo físico simplificado (Figura 6-5) tiene un punto de ingreso de material externo (absorción, en la figura) y dos puntos de toma de muestra.



■ Figura 6-5. Esquema físico de absorción y recirculación. Adaptado de Posti, 1982

Condiciones del modelo:

- el volumen de fluido dentro de la bomba y el introducido con la droga son despreciables respecto al volumen del recipiente, V ;
- una sustancia es introducida desde el exterior al sistema a una velocidad R_{abs} (masa/tiempo). La bomba recircula el líquido con un caudal Q (volumen/tiempo);
- la concentración de la sustancia introducida es monitoreada en el punto de muestreo I (MI, a la salida de la bomba) y en el II (MII, dentro del recipiente homogéneo).

Durante la absorción, las concentraciones de la sustancia son:

$$C_{MI} = C_{in} + C_2$$

■ Ecuación 6-2

$$C_{MII} = C_2$$

■ Ecuación 6-3

Donde C_{in} es la concentración incorporada por el proceso de absorción al momento de muestreo y C_2 es la concentración acumulativa en el recipiente. Es decir,

$$C_{in} = \frac{R_{abs}}{Q} = \frac{1}{Q} \cdot \frac{dA}{dt}$$

■ Ecuación 6-4

$$C_2 = \frac{\left(\int_0^t \frac{dA}{dt} \cdot dt \right)}{V} = \frac{A_{abs}}{V}$$

■ Ecuación 6-5

En las ecuaciones anteriores, A es la cantidad de droga en el recipiente y A_{abs} es la cantidad de droga introducida hasta el tiempo t. La dosis total (D_0) introducida es:

$$D_0 = \int_0^T \frac{dA}{dt} dt$$

■ Ecuación 6-6

Donde T es la duración total del proceso de absorción. Se puede ver de las Ecuaciones 6-2 y 6-3 que la diferencia de concentraciones es:

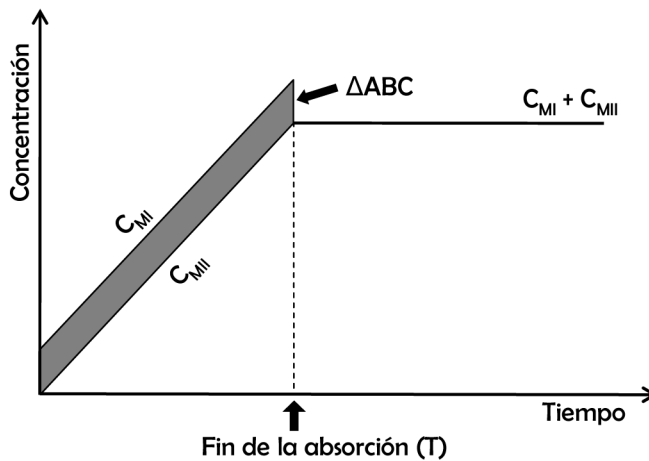
$$\Delta C = C_{MI} - C_{MII} = C_{in}$$

■ Ecuación 6-7

De las ecuaciones anteriores se ve que ΔC solo depende de R_{abs} y de Q, y tiende a cero cuando Q tiende a infinito o cuando R_{abs} tiende a cero (ahí $C_{MI} = C_{MII}$). La Figura 6-6 presenta las concentraciones en los distintos puntos del modelo físico descrito en función del tiempo. Cuando dichas curvas son integradas desde $t = 0$ hasta $t = T$, el ABC para la MI es mayor que el área correspondiente para MII, en una cantidad definida por la siguiente expresión (área sombreada):

$$\Delta ABC_{(0,T)} = \int_0^T \Delta C \cdot dt$$

■ Ecuación 6-8



■ Figura 6-6. Concentraciones de las muestras I y II del modelo físico durante y después de una absorción a velocidad constante. Adaptado de Posti, 1982

Reemplazando las ecuaciones 4, 6 y 7 en la ecuación 8 se llega a:

$$\Delta ABC_{(0,T)} = \frac{1}{Q} \cdot \int_0^T \frac{dA}{dt} \cdot dt = \frac{D_0}{Q}$$

■ Ecuación 6-9

La Ecuación 6-9 indica que ΔABC en la Figura 6-6 es directamente proporcional a la dosis introducida e inversamente proporcional al flujo promedio Q durante la absorción. Esta ecuación también indica que esa diferencia de área es independiente de la velocidad de absorción, la cual puede ser constante (como en la figura) o variable.

Si la sustancia introducida es eliminada del sistema a una velocidad R_{el} , durante el pasaje a través de la bomba de circulación, antes del punto de muestreo MI (ese punto de eliminación podría ser el de absorción en el modelo físico de la Figura 6-5), entonces, a un tiempo dado, la diferencia de concentraciones será:

$$\Delta C = \frac{(R_{abs} - R_{el})}{Q}$$

■ Ecuación 6-10

Por consiguiente, el $\Delta ABC = ABC_{MI} - ABC_{MI}$, para cualquier período de t_1 a t_2 , puede ser calculado mediante la ecuación general:

$$\Delta ABC_{(t_1,t_2)} = \frac{A_{abs(t_1,t_2)} - A_{el(t_1,t_2)}}{Q}$$

■ Ecuación 6-11

Donde A_{abs} representa la cantidad de droga introducida desde el tiempo t_1 al tiempo t_2 , y A_{el} es la cantidad eliminada de droga en el mismo período. De acuerdo con la Ecuación 6-6 y la Ecuación 6-11, la diferencia de área desde cero a T es:

$$\Delta ABC_{(0,T)} = \frac{D_0 - A_{el(0,T)}}{Q}$$

■ Ecuación 6-12

Donde $A_{el(0,T)}$ es la cantidad eliminada del sistema durante el proceso de absorción. La Ecuación 6-12 indica que la diferencia positiva de área generada desde 0 a T es directamente proporcional a la cantidad de sustancia presente en el sistema al tiempo T . Esta diferencia de área es compensada por otra igual, pero de signo negativo, durante el período que va de T (tiempo en el que finaliza la absorción) hasta infinito:

$$\Delta ABC_{(T,\infty)} = \frac{-[D_0 - A_{el(0,T)}]}{Q}$$

■ Ecuación 6-13

Dicho de otra manera, la diferencia de área desde tiempo cero hasta infinito es nula.

Las siguientes equivalencias biológicas pueden ser encontradas para el modelo físico presentado:

- el volumen V en la Figura 6-4 representa el volumen de distribución aparente de la droga en cuestión, y el plasma es considerado una parte de este compartimiento. Este volumen corresponde al del “recipiente homogéneo” de la Figura 6-5;
- la concentración de droga en sangre arterial, C_A , corresponde a C_{MI} en las ecuaciones anteriores y en la Figura 6-6. En este sentido, la sangre arterial debe entenderse como una mezcla de sangre venosa fluyendo desde diferentes tejidos y órganos, por lo que la concentración de droga en sangre arterial es una suma pesada de las concentraciones en sangre venosa fluyendo desde todos los órganos y tejidos, menos la posible concentración eliminada durante el pasaje por la circulación pulmonar;
- la concentración de droga en la sangre venosa pos-distribución desde un órgano no eliminador (extremidades, por ejemplo), C_V , corresponde a C_2 o C_{MI} en las ecuaciones anteriores y en la Figura 6-6;
- la concentración de droga en sangre arterial debida al proceso de absorción a un tiempo dado, C_{in} , corresponde a C_{in} del modelo físico.

Aplicando estas equivalencias en las ecuaciones previamente descriptas, se llega a que:

$$\Delta C = C_A - C_V = C_{in} = \frac{R_{abs}}{Q} = \frac{1}{Q} \cdot \frac{dA}{dt}$$

■ Ecuación 6-14

Donde R_{abs} o dA/dt es la velocidad de absorción y Q representa el factor de dilución y distribución (volumen/tiempo) en el organismo. Fisiológicamente, Q es aproximadamente equivalente al input cardíaco total (alrededor de 5000 ml/min en el hombre). Esta ecuación sugiere que hay una diferencia de concentración entre la sangre arterial y la sangre venosa durante el proceso de absorción. En todo momento, esta diferencia es dependiente solamente de la velocidad de absorción R_{abs} y del factor de dilución. La dosis total ($F \cdot D_0$) que ingresa al compartimiento vascular del organismo es:

$$F \cdot D_0 = \int_0^T \frac{dA}{dt} \cdot dt$$

■ Ecuación 6-15

Donde T es el tiempo que dura la absorción y F es la disponibilidad sistémica de la droga. Luego de una administración intravenosa, F es igual a 1, excepto que exista eliminación pulmonar.

Teniendo en cuenta el proceso de eliminación que sufre la droga de manera simultánea a la absorción, y por analogía con la Ecuación 6-12, se llega a que:

$$\Delta ABC_{(0,T)} = \frac{F \cdot D_0 - A_{el(0,T)}}{Q} = \frac{A_{(T)}}{Q}$$

■ Ecuación 6-16

Donde R_{el} es la velocidad de eliminación (masa/tiempo), $A_{el(0,T)}$ es la cantidad total eliminada durante el intervalo de tiempo de 0 a T y $A_{(T)}$ es la cantidad de droga en el organismo al tiempo T. Por último, las ecuaciones para el intervalo 0-infinito son:

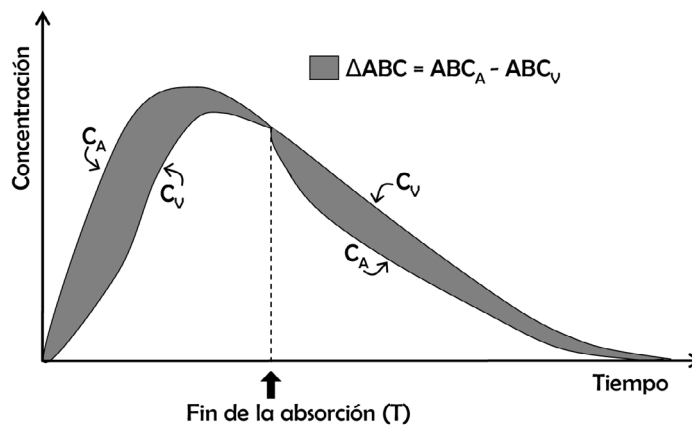
$$ABC_{A(0,\infty)} = ABC_{V(0,\infty)}$$

■ Ecuación 6-17

$$\Delta ABC_{(0,\infty)} = 0$$

■ Ecuación 6-18

Esta situación se ilustra esquemáticamente en la Figura 6-7.



■ Figura 6-7. Concentraciones de droga en sangre arterial y venosa durante y después de una absorción, esquemáticamente. Adaptado de Posti, 1982

Basándonos en la hipótesis presentada, se puede reemplazar la concentración arterial (C_A) por la concentración de droga en saliva (C_{sal}) en todas las ecuaciones a partir de la Ecuación 6-14. Sin embargo, antes de hacerlo la concentración de droga medida en saliva debe ser corregida por el cociente S/P (constante, en estado estacionario, donde $R_{abs} = R_{el}$ y $\Delta C = 0$).

$$C_{sal} = \frac{C_{sal}(\text{medida})}{S/P(\text{est.estac.})}$$

■ Ecuación 6-19

El cociente S/P en estado estacionario refleja las características de distribución de la droga entre plasma y saliva.

El modelo descrito hasta aquí explica por qué el cociente S/P aumenta durante la fase de absorción hasta llegar a un máximo, luego de lo cual decrece y se estabiliza en la fase de eliminación. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las ecuaciones derivadas sólo se aplican al modelo físico propuesto de absorción-recirculación, el cual corresponde al modelo farmacocinético típico de un compartimiento. Las verdaderas condiciones anatómico-fisiológicas pueden ser muy diferentes de esta situación hipotética. Las propiedades fisico-químicas de la droga determinan si la misma se distribuirá a la saliva y en qué proporción, al igual que el estado clínico y fisiológico de pacientes y/o voluntarios.

Modelo Farmacocinético (Fagiolino et al., 1988)

El modelo compartimental propuesto (Figura 6-8) comparte con el anterior la hipótesis de que los solutos difunden a la saliva provenientes de la sangre arterial. El mismo incluye el sitio de absorción, desde donde la droga se absorbe (con una constante de velocidad K_a), un compartimiento vascular desde la zona de absorción hasta la zona capilar que irriga las glándulas salivales (I en la figura), el resto de la vasculatura y tejidos bien perfundidos (compartimento 1 en la figura), un compartimento periférico tisular al cual difunde la sustancia (2 en la figura) y el compartimento salival representado con el número 3.

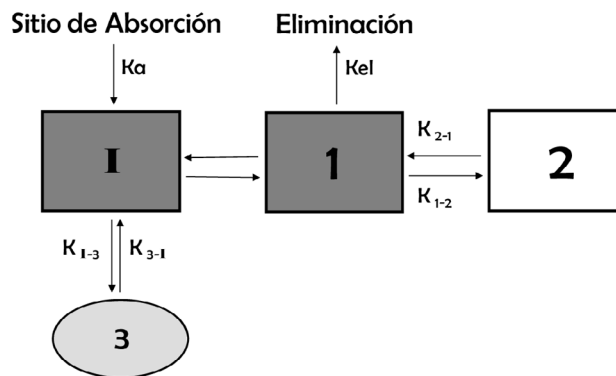


Figura 6-8. Modelo farmacocinético de absorción y distribución en saliva y resto del organismo. Adaptado de Fagiolino, 1990

Dado que el modelo consta de cinco compartimentos, considerando el que corresponde al sitio de absorción, las ecuaciones matemáticas que describen la evolución en el tiempo de las concentraciones de droga en cada compartimento también tendrán cinco términos exponenciales. Por ejemplo, para los compartimentos 1 y 3:

$$C_1 = P_a \cdot e^{-k_a \cdot t} + P_1 \cdot e^{-L_1 \cdot t} + P_2 \cdot e^{-L_2 \cdot t} + P_3 \cdot e^{-L_3 \cdot t} + P_4 \cdot e^{-L_4 \cdot t}$$

■ Ecuación 6-20

$$C_3 = S_a \cdot e^{-k_a \cdot t} + S_1 \cdot e^{-L_1 \cdot t} + S_2 \cdot e^{-L_2 \cdot t} + S_3 \cdot e^{-L_3 \cdot t} + S_4 \cdot e^{-L_4 \cdot t}$$

■ Ecuación 6-21

En orden de introducir ciertas simplificaciones, se pueden hacer diversas consideraciones cinéticas en el balance de masa del sistema:

- el término exponencial en L1 tendrá muy poca significación en el tiempo, decayendo a cero en forma casi instantánea;
- el compartimento 1 no se ve afectado por la pérdida o ganancia de sustancia desde el compartimento 3 (saliva);
- por el contrario, analizado desde el compartimento 3 el intercambio mencionado sí es importante.

De esta manera, las Ecuaciones 6-20 y 6-21 pueden reescribirse de la siguiente forma:

$$C_1 = P_a \cdot e^{-k_a t} + P_3 \cdot e^{-L_3 t} + P_4 \cdot e^{-L_4 t}$$

■ Ecuación 6-22

$$C_3 = S_a \cdot e^{-k_a t} + S_2 \cdot e^{-L_2 t} + S_3 \cdot e^{-L_3 t} + S_4 \cdot e^{-L_4 t}$$

■ Ecuación 6-23

Al igual que la mayoría de las ecuaciones empleadas en farmacocinética, las expresiones anteriores se logran resolver mediante el método de las transformadas de Laplace. Dicha resolución escapa al objetivo del presente trabajo por lo que no será detallada aquí. El resultado que nos interesa en este análisis es que, si se realiza el cociente entre C_3 y C_1 (C_3/C_1), el mismo es variable en el tiempo hasta alcanzar la fase L4 de eliminación, cuando se estabiliza en el valor constante:

$$\frac{C_3}{C_1} = \frac{k_{3-1} \cdot (J_2 - L_4) \cdot (J_1 - L_4) \cdot F}{k_{1-1} \cdot (k_{2-1} - L_4) \cdot (L_2 - L_4)}$$

■ Ecuación 6-24

Donde F es la fracción de droga libre en plasma, L_3 y L_4 son las constantes α y β que aparecen en los desarrollos clásicos de farmacocinética y J_1 y J_2 son expresiones (también constantes) generadas a partir de las constantes de velocidad del modelo (k_{1-1} , k_{1-2} , k_{e1} , etc).

Sin embargo, existen situaciones que ninguno de estos dos modelos logran satisfacer como condiciones especiales fisiológicas (por ejemplo, la modificación de los flujos sanguíneos relativos, como sucede durante el ejercicio), fisiopatológicas y cronofisiológicas de la función cardiovascular. El propio autor de este modelo propuso posteriormente un modelo fisiológico-farmacocinético, adaptando el modelo farmacocinético clásico a la fisiología circulatoria. Mediante dicho modelo se logra que los cambios en los flujos sanguíneos se manifiesten en cambios farmacocinéticos de las drogas, que son reconocidos pero no contemplados por el modelo clásico (Fagiolino et al., 1996).

Sobre la base de lo discutido hasta aquí, resulta comprensible que la saliva sea más sensible al ingreso de fármaco que el plasma venoso. La gran dilución a nivel capilar, por difusión al intersticio, no permite detectar los pequeños cambios en la concentración plasmática venosa de la droga provenientes de la absorción. En cambio, el bajo

volumen del sistema circulatorio arterio-capilar detectará rápidamente una pequeña cantidad absorbida y, en consecuencia, durante la fase de absorción se observarán mayores concentraciones de droga en saliva (en el caso de drogas de rápido equilibrio saliva-plasma) que en vena, ya que la saliva es un intermedio entre arteria y vena.

De esta manera, en el caso de principios activos para los que la disolución es el factor limitante del proceso de absorción (drogas poco solubles y/o formas farmacéuticas de liberación controlada), es posible realizar un seguimiento del perfil de liberación del fármaco a partir de la forma farmacéutica mediante monitorización en saliva: cada pulso de absorción será detectado por un alto cociente S/P.

Por último, resta establecer la idoneidad de la saliva para la determinación de la biodisponibilidad relativa de dos medicamentos. Para ello, recordemos primero que bajo condiciones lineales el área total bajo la curva de concentraciones venosas vs. tiempo es directamente proporcional a la dosis disponible, $F \cdot D_0$. Por otro lado, a partir de la Ecuación 6-17 y de la hipótesis sangre arterial/saliva presentada por ambos modelos, se puede concluir que el $ABC_{sal(0,\infty)}$ calculada a partir de las concentraciones salivales de droga también es directamente proporcional a la dosis disponible, $F \cdot D_0$. Por lo tanto, dicho valor de área puede ser empleado de manera equivalente al área de la curva de concentraciones venosas para determinar la biodisponibilidad relativa de distintas formulaciones de una droga. La concentración máxima en saliva, sin embargo, se obtendrá a un tiempo menor que la respectiva concentración máxima en sangre venosa.

En el presente capítulo se analizan los resultados previamente obtenidos de Fenitoína (Cap. 3) y Carbamazepina (Cap. 4) de manera de aportar a la discusión anterior y demostrar la veracidad de nuestra quinta y última hipótesis:

La saliva es un fluido biológico apto y adecuado para su monitoreo en estudios de biodisponibilidad relativa (BDR) que, a diferencia de la sangre venosa comúnmente utilizada, refleja la fracción de droga libre farmacológicamente activa en el organismo.

Análisis de datos

6.1 Carbamazepina (CBZ)

En el presente análisis se compararon, mediante los datos de disolución in vitro, datos obtenidos in vivo en plasma y saliva. Los datos salivales son los resultantes del ensayo descrito en la sección 4.3, es decir, datos tomados en ocho voluntarios sanos, de ambos sexos, para cuatro productos diferentes de CBZ 200 mg. Por otro lado, los datos plasmáticos fueron obtenidos de la bibliografía: para ello se emplearon cuatro trabajos previamente publicados, todos consistentes en estudios de BDR de productos de CBZ de liberación inmediata, con plasma como fluido biológico, representando un total de 14 formulaciones ensayadas (Jung et al., 1997; Kovacevic et al., 2009; Meyer et al., 1992; Olling et al., 1999). Los datos se pudieron correlacionar adecuadamente mediante un dato común a todos: el porcentaje disuelto a los 30 minutos de todos los productos en las condiciones establecidas por la USP.

El objetivo fue, mediante el análisis de una correlación *in vitro/in vivo*, presentar nueva evidencia a favor del uso de saliva como fluido biológico en estudios de BDR. Esta es una metodología de trabajo que, además de ser original, evita repetir estudios en humanos que ya han sido realizados anteriormente, mediante el uso de datos publicados en lugar de nuevos resultados experimentales (World Medical Association, 2004). Esta metodología sería una primera aproximación al estudio de la capacidad de la saliva para reemplazar al plasma en los estudios de BDR de una droga determinada. Es un método rápido y sencillo para obtener evidencia a favor del uso de muestras salivales en este tipo de estudios, pero de ninguna manera es lo suficientemente robusto para resolver ese interrogante por sí solo.

La droga empleada, Carbamazepina (CBZ), cumple con los requisitos para ser monitoreada en saliva con niveles aceptables de variabilidad (Drobitch & Svensson, 1992; Pynnonen, 1977; Rosenthal et al., 1995) y, al mismo tiempo, se encuentra disponible mucha información bibliográfica acerca de su comportamiento biofarmacéutico, tanto *in vitro* como *in vivo*. También es una droga interesante para estudiar ya que en numerosas investigaciones se han establecido correlaciones saliva-plasma de CBZ, tanto en pacientes (MacKichan et al., 1981; Mennickent et al., 2007; Rosenthal et al., 1995; Rylance et al., 1977; Westenberg et al., 1977) como en voluntarios sanos (Dickinson et al., 1985; Paxton & Donald, 1980; Pynnonen, 1977).

Datos bibliográficos

Luego de una exhaustiva búsqueda bibliográfica, se seleccionaron cuatro artículos que presentan estudios de BDR de comprimidos de CBZ de liberación inmediata, a la vez que incluyen estudios de disolución *in vitro* empleando LSNa 1% como medio de disolución. La Tabla 6-2 resume las características básicas de estos cuatro trabajos.

■ **Tabla 6-2.** Características principales de los estudios de BDR y de disolución *in vitro* presentados en las cuatro fuentes bibliográficas seleccionadas

| | Meyer et al. (1992) | Jung et al. (1997) | Kovacevic et al. (2009) | Olling et al. (1999) |
|---|------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------|
| Estudios de Biodisponibilidad Relativa - IN VIVO | | | | |
| Productos ensayados | 4 | 4 | 2 | 4 |
| Dosis administrada | 200 | 400 | 400 | 400 |
| Voluntarios | 24 | 12 | 18 | 16 |
| Edad (años) | 21 - 35 | 20 - 30 | 29 - 37 | 20 - 38 |
| Peso (kg) | 61 - 93 | 60 - 80 | 70 - 81 | 49 - 88 |
| Estudios de Disolución - IN VITRO | | | | |
| Método | USP 31 ^a | USP 31 ^a | USP 31 ^a | USP 31 ^a |
| Unidades ensayadas | 6 | 12 | 6 | 9 |

^a Lauril Sulfato de Na 1%, 900 ml, Aparato 2 USP, 75 rpm, 37 ± 0.5°C (USP 31/NF 24, 2008)

Datos *in vivo*

Los datos obtenidos en saliva son los resultantes del ensayo descrito en la sección 4.3. La Tabla 6-3 resume los valores medios de los parámetros farmacocinéticos en saliva al tiempo que presenta los parámetros farmacocinéticos en plasma obtenidos de las fuentes bibliográficas citadas.

Tabla 6-3. Valores medios de los parámetros farmacocinéticos (\pm SD) obtenidos en saliva (experimental, ver sección 4.3) y plasma (bibliográficos). Tanto la denominación de los productos como las posiciones decimales son las usadas por los respectivos autores

| <i>Datos en saliva</i> | | | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | Productos | | | |
| | A ^a | B | C | D |
| ABC ₀₋₈₄ hs (mg.h/L) | 27,61 \pm 6,66 | 20,80 \pm 7,77 | 28,49 \pm 5,24 | 27,26 \pm 5,91 |
| ABC _{0-inf} (mg.h/L) | 35,76 \pm 10,27 | 26,23 \pm 9,89 | 39,34 \pm 15,14 | 34,38 \pm 8,94 |
| Cmax (mg/L) | 0,68 \pm 0,18 | 0,50 \pm 0,22 | 0,97 \pm 0,21 | 0,90 \pm 0,18 |
| Tmax (h) | 6,8 \pm 2,8 | 9,3 \pm 6,8 | 4,1 \pm 1,8 | 5,7 \pm 1,9 |
| Ke (h ⁻¹) | 0,020 \pm 0,005 | 0,022 \pm 0,005 | 0,021 \pm 0,008 | 0,024 \pm 0,007 |
| <i>Datos plasmáticos</i> | | | | |
| | Productos | | | |
| | | | | |
| Meyer et al. (1992) | 1 (N = 24) ^b | 2 (N = 24) | 3 (N = 23) | 4 (N = 23) |
| ABC ₀₋₁₆₉ hs (mg.h/L) | 134,8 \pm 20,2 | 80,9 \pm 38,8 | 154,2 \pm 27,8 | 104,5 \pm 31,4 |
| ABC _{0-inf} (mg.h/L) | 143,5 \pm 21,5 | 86,5 \pm 40,6 | 162,2 \pm 32,4 | 111,7 \pm 32,4 |
| Cmax (mg/L) | 1,89 \pm 0,38 | 1,15 \pm 0,71 | 2,69 \pm 0,48 | 1,40 \pm 0,55 |
| Tmax (h) | 15,9 \pm 8,1 | 13,6 \pm 10,1 | 8,3 \pm 6,0 | 19,6 \pm 15,3 |
| Jung et al. (1997) | K (N = 12) ^c | C (N = 12) | J (N = 12) | A (N = 12) |
| ABC ₀₋₁₂₀ hs (mg.h/L) | 296,0 \pm 30,7 | 316,0 \pm 27,7 | 368,0 \pm 25,5 | 331,0 \pm 25,7 |
| ABC _{0-inf} (mg.h/L) | NI | NI | NI | NI |
| Cmax (mg/L) | 4,24 \pm 0,92 | 4,81 \pm 1,04 | 5,98 \pm 0,57 | 5,98 \pm 0,83 |
| Tmax (h) | 15,8 \pm 7,3 | 14,6 \pm 9,1 | 8,6 \pm 6,1 | 8,5 \pm 5,9 |
| Kovacevic et al. (2009) | Referencia ^a (N = 18) | Test (N = 18) | | |
| ABC ₀₋₁₄₄ hs (mg.h/L) | 211,37 \pm 52,97 | 220,42 \pm 55,94 | | |
| ABC _{0-inf} (mg.h/L) | 259,15 \pm 63,97 | 259,03 \pm 69,02 | | |
| Cmax (mg/L) | 4,34 \pm 1,24 | 4,74 \pm 1,27 | | |
| Tmax (h) | 9,7 \pm 4,5 | 8,6 \pm 2,8 | | |
| Olling et al. (1999) | D (N = 16) ^c | B (N = 16) | C (N = 16) | A (N = 16) |
| ABC ₀₋₉₆ hs (mg.h/L) | 249 \pm 61 | 253 \pm 73 | 253 \pm 53 | 198 \pm 48 |
| ABC _{0-inf} (mg.h/L) | 295 \pm 59 | 294 \pm 84 | 292 \pm 69 | 246 \pm 61 |
| Cmax (mg/L) | 4,5 \pm 0,8 | 5,9 \pm 1,6 | 6,1 \pm 1,6 | 3,2 \pm 1,0 |
| Tmax (h) | 11,0 \pm 5,2 | 5,6 \pm 5,9 | 3,6 \pm 4,1 | 16,0 \pm 6,5 |

NI: No informado en el artículo original

^aProducto de referencia, Tegretol 200 mg, Novartis

^bProducto de referencia, Tegretol 200 mg, Geigy Pharmaceuticals

^cProducto de referencia, Tegretol 200 mg, Ciba Geigy

Datos *in vitro*

Los datos *in vitro* correspondientes a los productos ensayados en saliva también fueron presentados previamente, en la sección 2.1. De todas maneras, la Figura 6-9 muestra nuevamente los perfiles superpuestos de los cuatro productos de CBZ 200 mg ensayados en LSNa 1% (N = 12).

Los perfiles de liberación *in vitro* de los productos de CBZ ensayados en plasma se pueden encontrar en los trabajos correspondientes. Sin embargo, vale la pena destacar aquí que el porcentaje medio disuelto a los 30 minutos para el producto de referencia (Tegretol en todos los casos) fue muy similar entre todos los artículos citados entre sí y respecto al valor obtenido en este trabajo. Los cinco valores estuvieron dentro del rango 68-72%, con una media (\pm SD) de 70% (\pm 1,2).

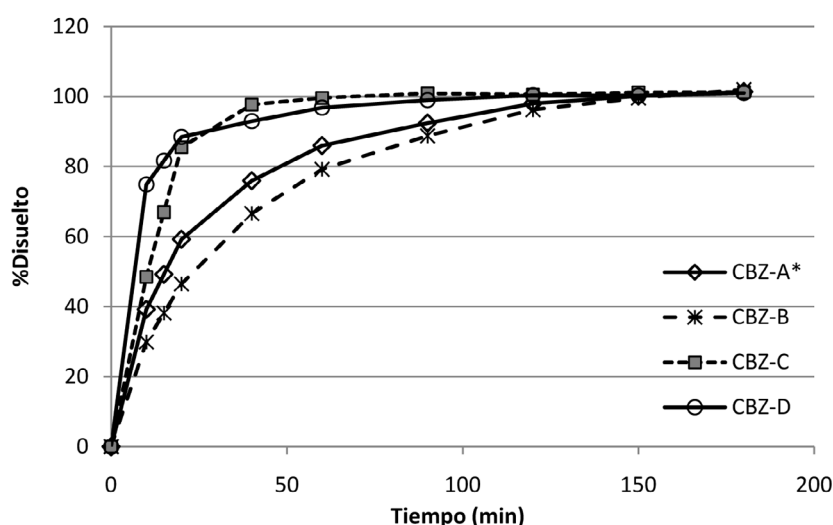


Figura 6-9. Perfiles de disolución (N = 12) en Lauril Sulfato de Sodio 1% de los cuatro productos de CBZ 200 mg, comprimidos de liberación inmediata, ensayados en saliva (ver secciones 2.1 y 4.3). El asterisco denota al producto de referencia (Tegretol, Novartis)

Correlaciones *in vitro/in vivo*

Los principales parámetros farmacocinéticos promedio (T_{max} , C_{max} y ABC_{0-t}) obtenidos en los estudios de BDR usando plasma como fluido monitoreado (Jung et al., 1997; Kovacevic et al., 2009; Meyer et al., 1992; Olling et al., 1999) como así también los obtenidos en este trabajo, donde la saliva fue el fluido biológico, fueron correlacionados con el porcentaje de CBZ disuelto a los 30 minutos. Este tiempo fue elegido para las correlaciones ya que era el único tiempo de muestreo que todos los trabajos presentaban en común.

Antes de realizar las correlaciones, los valores de C_{max} y ABC_{0-t} fueron normalizados dividiéndolos por el valor correspondiente al producto de referencia, Tegretol (Test/Ref). De esa manera se logró volver consistentes todos los datos bibliográficos de plasma con los datos salivales aquí obtenidos, ya que se trata de dos fluidos biológicos donde se esperan diferentes valores para C_{max} y ABC_{0-t} (ya que el cociente S/P para esta droga difiere de la unidad) [Ecuación 6-19].

Esta normalización también se hizo porque la dosis recibida por los voluntarios en cada estudio no siempre fue la misma. Para las correlaciones se usó ABC_{0-t} y no AB_{CO-inf} ya que este último, a diferencia del primero, no fue informado en todos los trabajos (Tabla 6-3). En el caso de Tmax no se realizó ninguna normalización ya que el tiempo para alcanzar Cmax es extremadamente dependiente del esquema de muestreo.

En todos los casos, el punto correspondiente al producto de referencia, para el cual $C_{max} \text{ Test}/C_{max} \text{ Ref} = 1$ y $ABC_{0-t} \text{ Test}/ABC_{0-t} \text{ Ref} = 1$ como valor de y (eje de ordenadas) fue incluido en las correlaciones de Cmax y ABC_{0-t} respectivamente, con el % Disuelto medio a los 30 min obtenido para todos los productos de referencia (70%) como valor de x (eje de abscisas). La Tabla 6-4 muestra las correlaciones resultantes, tanto las obtenidas con datos plasmáticos como las correspondientes a datos salivales (por separado).

Tabla 6-4. Correlaciones lineales entre cada parámetro farmacocinético (Tmax, Cmax y ABC_{0-t}) vs. % Disuelto en 30 min, empleando los datos plasmáticos -bibliográficos- y los datos experimentales de saliva. La correlación de Tmax es directa, mientras que los otros dos parámetros fueron previamente normalizados por el valor obtenido para el producto de referencia, Tegretol ($C_{max} \text{ Test}/C_{max} \text{ Ref}$ y $ABC_{0-t} \text{ Test}/ABC_{0-t} \text{ Ref}$)

| | Plasma (N = 14 para Tmax, N = 11 para Cmax y ABC) | Saliva (N = 4) |
|---|--|------------------|
| Tmax vs. % Disuelto en 30 min | | |
| Pendiente (b) ± 95% IC | -0,1420 ± 0,0633 | -0,1187 ± 0,1253 |
| Ordenada (a) ± 95% IC | 21,50 ± 4,58 | 15,74 ± 9,98 |
| R^2 | 0,6653 | 0,8925 |
| Cmax Test/ Cmax Ref vs. % Disuelto en 30 min | | |
| Pendiente (b) ± 95% IC | 0,0080 ± 0,0039 | 0,0179 ± 0,0069 |
| Ordenada (a) ± 95% IC | 0,5319 ± 0,2830 | -0,2822 ± 0,5452 |
| R^2 | 0,7079 | 0,9843 |
| ABC Test/ ABC Ref vs. % Disuelto en 30 min | | |
| Pendiente (b) ± 95% IC | 0,0044 ± 0,0025 | 0,0058 ± 0,0139 |
| Ordenada (a) ± 95% IC | 0,6482 ± 0,1804 | 0,4901 ± 1,1064 |
| R^2 | 0,6476 | 0,6167 |

Una vez obtenidos los tres pares de rectas (para cada parámetro, en cada fluido) se realizó a cada par una prueba estadística para verificar su semejanza: ensayo de coincidencia de dos líneas rectas, *Coincidence of two general straight lines* (Green & Margerison, 1978). Dicho test estadístico permite decidir, con un determinado nivel de confianza, si dos conjuntos de datos (plasma y saliva, en nuestro caso) pueden ser asociados a la misma recta. Como hipótesis nula (H_0) se asume que las dos pendientes y las dos ordenadas no presentan diferencias significativas. Para los tres parámetros ensayados, no se pudo rechazar H_0 ($p > 0,05$).

Por lo tanto, se establecieron tres nuevas correlaciones: 1) Tmax; 2) $C_{max} \text{ Test}/C_{max} \text{ Ref}$ y 3) $ABC_{0-t} \text{ Test}/ABC_{0-t} \text{ Ref}$; vs. % Disuelto en 30 min, pero en esta ocasión utilizando tanto los datos plasmáticos como salivales en la misma recta. La Figura

6-10 muestra las correlaciones obtenidas tanto cuando se consideraron solamente los datos plasmáticos (rectas a la izquierda de la figura, correspondientes a los datos de la primer columna en la Tabla 6-4) como con los datos saliva/plasma combinados (rectas a la derecha).

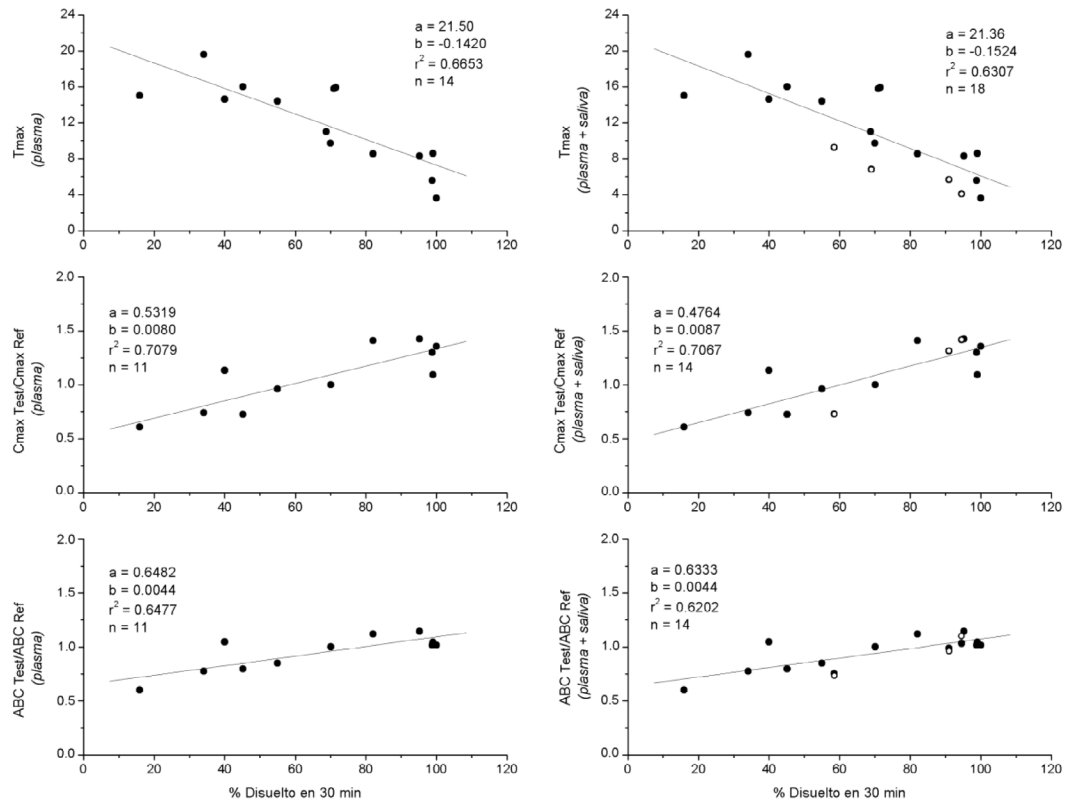


Figura 6-10. Correlaciones entre los parámetros farmacocinéticos y %Disuelto en 30 min. Los gráficos del lado izquierdo incluyen solamente datos plasmáticos (círculos cerrados) mientras que los de la derecha incluyen también los datos en saliva (círculos abiertos representan a los puntos salivales)

Resulta interesante analizar la variabilidad de los datos obtenidos, ya que suele adjudicarse una mayor dispersión a los datos salivales. En este caso, la Tabla 6-5 muestra que los rangos de coeficientes de variación (%CV) obtenidos en saliva son similares a los de plasma para cada parámetro farmacocinético. La tercera columna de la tabla presenta los %CV obtenidos en un estudio de BDR de comprimidos de CBZ 400 mg, también realizado en saliva (Vázquez et al., 1993).

Tabla 6-5. Rangos obtenidos para los coeficientes de variación (%CV) de los parámetros farmacocinéticos estudiados tanto en saliva como en plasma

| | Rango de %CV en saliva obtenidos en este trabajo (4 productos) | Rango de %CV en plasma (Jung et al., 1997; Kovacevic et al., 2009; Meyer et al., 1992; Olling et al., 1999) (14 productos) | Rango de %CV en saliva (Vázquez et al., 1993) (2 productos) |
|-------------------------------|--|--|---|
| ABC _{0-t} (mg.h/L) | 18,4 – 37,4 | 6,9 – 48,0 | 22,2 – 33,4 |
| ABC _{0-inf} (mg.h/L) | 26,0 – 38,5 | 15,0 – 46,9 ^a | NI |
| C _{max} (mg/L) | 20,0 – 44,0 | 9,5 – 61,7 | 31,9 – 43,6 |
| T _{max} (h) | 33,3 – 73,1 | 32,6 – 113,9 | 55,8 – 90,0 |

^a El rango incluye solo 10 productos ya que el parámetro no fue reportado por uno de los autores
 NI: No informado en el artículo original

A partir de las correlaciones mostradas en la Figura 6-10 se puede concluir que en estudios de BDR la saliva resulta equiparable al plasma, ya que los datos salivales obtenidos en el estudio de la sección 4.3 pudieron ser combinados con los datos plasmáticos encontrados en una única regresión lineal. Dicho de otra manera, no se pudo encontrar evidencia suficiente para afirmar que ambos juegos de datos (saliva-plasma) puedan considerarse diferentes, con un nivel de significación de 0,05. Por lo tanto, T_{max}, C_{max} y ABC_{0-t} se correlacionan de la misma manera con los datos *in vitro*, independientemente de si fueron calculados con datos plasmáticos, salivales o con ambos combinados.

En el caso de C_{max} y ABC_{0-t}, el sesgo de la saliva se elimina al estandarizar los datos respecto de la formulación de referencia, y se obtiene de esa manera una distribución al azar de los puntos correspondientes a la saliva a lo largo de la recta de regresión (Figura 6-10). El caso de T_{max} es diferente, porque si bien las varianzas obtenidas para plasma y saliva permiten –estadísticamente– agrupar a los datos en una única correlación, puede verse en la Figura 6-10 que todos los puntos correspondientes a saliva se ubican por debajo de la recta de regresión resultante.

Esto confirma el modelo anatómico-fisiológico presentado al inicio de este capítulo, según el cual las concentraciones salivales se equilibran instantáneamente con las arteriales en los capilares sanguíneos, produciendo de esa manera mayores valores que los que suelen medirse en sangre venosa (Fagiolino, 1999; Posti, 1982). Esto no solo explica el mayor cociente S/P que suele encontrarse durante la fase de absorción, sino también por qué se obtienen menores valores de T_{max} cuando se trabaja con saliva.

Cabe destacar respecto a la Figura 6-10 que, en el gráfico correspondiente a T_{max} vs. % Disuelto en 30 min, el punto con el menor valor de x (% Disuelto en 30 min = 15.9%) fue extraído del trabajo de Meyer y colaboradores, y los mismos autores declaran en el artículo original que dicho punto posiblemente sea un outlier (Meyer et al., 1992).

Otro hecho experimental interesante que refleja lo que sucede durante la fase de absorción está dado por los mayores valores del cociente S/P que se obtienen trabajando con C_{max} en comparación con los que se obtienen si se usa el parámetro ABC_{0-inf} para los cálculos. Como se observa en la Tabla 6-6, empleando sólo los resultados corres-

pondientes al producto de referencia y calculando los cocientes entre ABC_{0-inf} en saliva respecto al mismo parámetro en plasma (normalizados por la dosis si fuera necesario), se obtuvo un valor medio \pm SD de $0,257 \pm 0,021$, el que representa una buena estimación del valor para el cociente S/P = 0,250 esperado para CBZ (*Clarke's analysis of drugs and poisons*, 2004). Sin embargo, cuando dicho cálculo se repite con el parámetro C_{max} el valor obtenido es $0,324 \pm 0,025$.

Tabla 6-6. Cocientes S/P de los parámetros ABC_{0-inf} y C_{max} para el producto de referencia (el valor obtenido para Tegretol en la sección 4.3 dividido por el valor correspondiente en los artículos citados, para ABC_{0-inf} o C_{max} respectivamente)

| | Cocientes S/P para el producto de referencia | |
|--------------------------------|--|--------------------|
| | ABC_{0-inf} | C_{max} |
| Meyer <i>et al.</i> (1992) | 0,249 | 0,360 |
| Jung <i>et al.</i> (1997) | NI | 0,321 ^a |
| Kovacevic <i>et al.</i> (2009) | 0,276 ^a | 0,313 ^a |
| Olling <i>et al.</i> (1999) | 0,242 ^a | 0,302 ^a |
| <i>Media</i> | 0,257 | 0,324 |
| <i>SD</i> | 0,021 | 0,025 |

NI: No informado en el artículo original

^a Fue necesario normalizar por la dosis

Queda claro que la evidencia presentada hasta aquí a favor del uso de saliva en estudios de BDR es dependiente de los resultados del estudio de disolución *in vitro*, ya que dichos valores son los que permitieron establecer la correlación saliva-plasma presentada. Sin embargo, numerosos estudios apoyan la validez de este enfoque: excelentes correlaciones *in vivo/in vitro* (IVIVC) se han encontrado para CBZ, tanto entre parámetros *in vivo* con *in vitro* (nivel C) (Jung *et al.*, 1997; Lake *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 1992) como incluso correlaciones de nivel A, es decir, punto a punto (Kovacevic *et al.*, 2009; Sathe *et al.*, 1997; Veng-Pedersen *et al.*, 2000). Más aún, dichas correlaciones nivel A fueron establecidas usando el mismo medio y condiciones de disolución que las aquí presentadas, y han sido la base de propuestas para considerar a la CBZ como posible candidata para una bioexención (Kovacevic *et al.*, 2009), a pesar de la falta de acuerdo acerca de la posibilidad de bioexenciones para drogas pertenecientes a otras clases distintas de la clase I del BCS (alta solubilidad, alta permeabilidad) como la CBZ, clase II (Lindenberg *et al.*, 2004).

Si bien serán necesarios más estudios antes de que la saliva sea ampliamente aceptada como fluido biológico de monitoreo, el trabajo aquí presentado es un paso en esa dirección y, no menos importante, una aproximación bioética a la cuestión. Se ha obtenido una correlación relevante entre datos de CBZ medidos en saliva con datos medidos en plasma, a pesar de ser éstos últimos obtenidos de la literatura. Y, lógicamente, la correlación mejora cuando se utilizan datos experimentales obtenidos de manera simultánea (MacKichan *et al.*, 1981; Paxton & Donald, 1980; Pynnonen, 1977; Rosenthal *et al.*, 1995; Rylance *et al.*, 1977; Westenberg *et al.*, 1977). Por lo tanto, si

en presencia de tantas posibles fuentes de variación se encuentra una correlación estadísticamente significativa, son grandes las probabilidades de que dicha correlación sea aún mejor cuando se empleen datos experimentales, libres de tanta variabilidad.

6.2 Fenitoína (PHT)

En el caso de los datos salivales presentados en el Capítulo 3, no es posible la aplicación de la metodología descrita en la sección 6.1 para CBZ, ya que no se cuenta con el denominador común de los datos de disolución *in vitro*. Por lo tanto, sólo se realizó una comparación cualitativa entre los datos salivales obtenidos y datos plasmáticos, que al igual que para CBZ se obtuvieron de fuentes bibliográficas.

Para esto, se seleccionaron dos trabajos: un estudio realizado por Melikian y colaboradores, que presenta valores de los parámetros farmacocinéticos de PHT en plasma calculados luego de realizar un estudio de BDR con 11 productos comerciales de cápsulas conteniendo PHT 100 mg en voluntarios sanos (Melikian et al., 1977), y otro estudio de Schumaker y Metzler, en el que se realiza una BEI siguiendo un diseño 4x2, en 26 voluntarios sanos y con dos suspensiones de PHT 125 mg (Schumaker & Metzler, 1998). Debido a la diferencia de dosis, los resultados de este estudio se normalizaron a 100 mg para poder realizar comparaciones (en la zona de concentraciones obtenidas el comportamiento farmacocinético de la PHT puede asumirse lineal).

La Tabla 6-7 resume algunos de los principales resultados de dichos estudios, junto con algunos de los datos salivales obtenidos en el presente trabajo.

Tabla 6-7. Parámetros farmacocinéticos de PHT. Las primeras filas corresponden al estudio de BDR que Melikian y col. realizaron sobre 11 formulaciones de cápsulas conteniendo PHT 100 mg en plasma de voluntarios sanos (datos promedio de 6 voluntarios y la SD entre paréntesis) (Melikian et al., 1977). A continuación se presentan los datos de otro estudio de BDR en plasma realizado por Schumaker y Metzler, en el que se analizaron dos suspensiones de PHT en 26 voluntarios (con administraciones replicadas) [Schumaker y Metzler, 1998]. Por último se incluyeron los datos salivales ya presentados en la sección 3.2 (promedio de 24 voluntarios)

| Producto | Tmax (h) | Cmax (mg/L) | ABC _{0-t} |
|--|-----------|-------------|--------------------|
| <i>Datos plasmáticos (Melikian et al., 1977)</i> | | | |
| 1 | 5,2 (0,9) | 1,11 (0,15) | 32,61 (4,97) |
| 2 | 5,7 (1,1) | 0,93 (0,11) | 30,08 (4,80) |
| 3 | 3,7 (0,9) | 1,33 (0,08) | 35,73 (4,41) |
| 4 | 3,4 (0,7) | 1,32 (0,17) | 35,79 (6,60) |
| 5 | 4,4 (0,6) | 1,40 (0,10) | 34,39 (2,23) |
| 6 | 4,1 (0,6) | 1,27 (0,09) | 32,85 (4,74) |
| 7 | 2,7 (0,6) | 1,21 (0,09) | 30,84 (3,27) |
| 8 | 3,4 (0,4) | 1,39 (0,11) | 38,28 (2,95) |
| 9 | 2,6 (0,5) | 1,44 (0,14) | 32,89 (3,43) |
| 10 | 3,5 (0,5) | 1,32 (0,12) | 35,61 (2,84) |
| 11 | 6,0 (1,1) | 1,06 (0,09) | 34,23 (3,29) |

| Datos plasmáticos (Schumaker & Metzler, 1998)* | | | |
|---|-------------|---------------|---------------|
| <i>Ref 1</i> | NI | 1,60 (0,40) | 44,57 (18,52) |
| <i>Ref 2</i> | NI | 1,56 (0,35) | 44,43 (15,47) |
| <i>Test 1</i> | NI | 1,66 (0,43) | 44,07 (16,68) |
| <i>Test 2</i> | NI | 1,75 (0,41) | 44,02 (16,86) |
| Datos salivales (ver sección 3.2) | | | |
| <i>Prod-F₁</i> | 4,73 (1,67) | 0,206 (0,026) | 3,68 (0,60) |
| <i>Prod-F₂</i> | 3,79 (0,72) | 0,204 (0,022) | 3,78 (0,72) |
| <i>Prod-G₁</i> | 3,94 (1,45) | 0,209 (0,026) | 3,81 (0,73) |
| <i>Prod-G₂</i> | 3,92 (1,23) | 0,210 (0,028) | 3,66 (0,67) |

* Los datos originales corresponden a dos suspensiones conteniendo 125 mg de PHT, por lo que los valores de C_{max} y ABC fueron normalizados a 100 mg
NI: no informado en el trabajo original

En primer lugar, se observa que los valores de variabilidad obtenidos en saliva son del orden (o a veces menores) de los correspondientes al plasma. La Tabla 6-8 presenta los coeficientes de variación de los parámetros C_{max} y ABC_{0-t} en plasma y saliva, de manera de poder evaluarlos comparativamente. Otra prueba de la baja variabilidad de los datos salivales fue que, si recordamos los resultados de PHT en la sección 3.2, el parámetro C_{max} cumplió con el criterio de BE en todos los casos (BEI y BEM), a pesar de que el ANAVA realizado había encontrado diferencias significativas entre las C_{max} de las dos formulaciones estudiadas.

Tabla 6-8. Coeficientes de Variación (media y rango entre corchetes) de los parámetros C_{max} y ABC_{0-t} calculados con datos plasmáticos obtenidos de dos fuentes bibliográficas y con datos salivales experimentales (sección 3.2)

| | Datos plasmáticos (Melikian et al., 1977) | Datos plasmáticos (Schumaker & Metzler, 1998) | Datos Salivales (experimentales, sección 3.2) |
|--------------------------------|---|---|---|
| CV de C_{max} | 9,19 [6,02 - 13,51] | 19,31 [17,96 - 20,50] | 12,25 [11,02 - 13,15] |
| CV de ABC_{0-t} | 10,91 [6,04 - 18,44] | 30,50 [27,86 - 33,24] | 18,26 [16,35 - 19,17] |

Por otro lado, si se calculan los cocientes entre los valores salivales y plasmáticos (S/P) de los parámetros farmacocinéticos presentados en la Tabla 6-7, se obtienen los valores que se muestran en la Tabla 6-9. Si se observan los datos de la primera columna, correspondientes a los datos plasmáticos tomados del estudio de Melikian y colaboradores, se ve que cuando el cálculo del cociente S/P se realiza con el parámetro ABC_{0-t}, el valor obtenido es una buena estimación del valor teórico esperado S/P = 0,10 para PHT (Goodman & Gilman, 2006; Clarke's analysis of drugs and poisons, 2004). Sin embargo, cuando dicho cálculo se repite pero con el parámetro C_{max} el valor obtenido es mayor. Considerando ahora la segunda columna, se observa que la tendencia

es la misma, si bien los cocientes obtenidos son menores para ambos parámetros. No debemos olvidar que los datos plasmáticos de dicha columna corresponden al estudio de Schumaker y Metzler, realizado con suspensiones de 125 mg de PHT.

Tabla 6-9. Cocientes saliva/plasma (S/P) calculados con los datos previamente presentados en la Tabla 6-7, para C_{max} y ABC_{0-t}. Los valores informados son el promedio ± SD (el rango entre corchetes) obtenido al hacer los cocientes entre todas las formulaciones

| | <i>S/P</i> (datos plasmáticos de <i>Melikian et al., 1977</i>) | <i>S/P</i> (datos plasmáticos de <i>Schumaker & Metzler, 1998</i>) |
|--------------------------|---|---|
| C_{max} | 0,168 ± 0,023 [0,141 – 0,226] | 0,126 ± 0,006 [0,116 – 0,135] |
| ABC_{0-t} | 0,110 ± 0,008 [0,096 – 0,127] | 0,084 ± 0,002 [0,082 – 0,091] |

Conclusiones parciales

Numerosos autores han resaltado la utilidad e idoneidad de la saliva como fluido biológico en aplicaciones tan diversas como el monitoreo terapéutico (Drobitch & Svensson, 1992; Hofman, 2001), los estudios farmacocinéticos y/o de BDR (Ritschel & Tompson, 1983), en la ciencia forense y hasta como un medio donde detectar sustancias ilegales (Aps & Martens, 2005; Kaufman & Lamster, 2002). De particular interés ha sido últimamente la aplicación del monitoreo en saliva de sustancias endógenas, como hormonas esteroideas y peptídicas, anticuerpos e incluso marcadores de la inflamación o de procesos tumorales (Groschl et al., 2008). Sin embargo, este fluido continúa sin lograr la total aceptación por parte de la comunidad científica, principalmente en cuanto a su aplicación en estudios de BDR.

La mayoría de las drogas ingresa a la saliva por difusión pasiva. Cuando se trabaja con voluntarios sanos o pacientes para quienes puede asumirse una función fisiológica normal de la cavidad oral, las variables que influyen sobre ese tipo de transporte son el pH, pKa, lipofilia, carga, peso molecular y la configuración espacial, los niveles de droga libre circulando por el plasma, la dosis y el clearance de la droga, el flujo de saliva y la concentración de proteínas y enzimas en saliva, capaces de unir o metabolizar a la droga (Aps & Martens, 2005; Rasmussen, 1964; Vining & McGinley, 1986).

Son candidatas para su determinación en saliva todas aquellas drogas que sean no-ionizables o que al menos se encuentren sin ionizar dentro del rango de pH salival, como PHT y CBZ (entre muchas otras). Ambas drogas pertenecen al grupo de drogas neutras lipofílicas, y por lo tanto su solubilidad en un medio lipídico es posiblemente el factor determinante de su capacidad para difundir a la saliva, siendo el pH un factor de menor importancia (Faigle et al., 1976; Pynnonen, 1977). Y la relevancia del pH disminuye aún más si recordamos que, como se mencionó al inicio del presente capítulo, el flujo salival es el único factor determinante de los cambios de pH observados en saliva (Drobitch & Svensson, 1992). Se ha demostrado que CBZ no es afectada por los cambios en el flujo de la saliva (McAuliffe et al., 1977; Rosenthal et al., 1995).

Respecto de la unión a proteínas, puede considerarse despreciable su efecto en saliva, ya que normalmente no se encuentra unión de drogas a proteínas salivales (Ritschel & Tompson, 1983). Sin embargo, diferencias en la tasa de unión a proteínas plasmáticas pueden resultar en un aumento tanto de la variabilidad inter como intra-individual de un estudio de BDR. La concentración total de droga en plasma es más sensible que la concentración libre (y, por lo tanto, la salival) a los cambios en la unión a proteínas (Fagiolino, 1999; MacKichan et al., 1981). De todas maneras, el diseño cruzado clásico de la bioequivalencia presenta la ventaja de permitir que cada sujeto incluido en el estudio actúe como su propio control, y de esa forma se disminuye considerablemente la variabilidad inter individual (Zapater & Horga, 1999), que suele ser considerablemente mayor a la intra individual para la mayoría de las drogas. Más aún, Miles y colaboradores han estudiado la variabilidad intra individual de las concentraciones salivales de CBZ, PHT y Fenobarbital en voluntarios sanos, concluyendo que no era clínicamente significativa (Miles et al., 1991). Nuestros resultados apoyan esto en contraposición a la creencia usual de la mayor dispersión esperada en saliva: tanto en el caso de PHT como de CBZ las variabilidades encontradas fueron del orden (o incluso menores) a las reportadas con datos plasmáticos.

Otro inconveniente que surge del hecho de que la saliva sea altamente sensible al ingreso de droga al organismo es la multiplicidad de picos que aparecen en los perfiles C_{sal} vs. tiempo, dada la posible absorción pulsátil desde el sitio de administración. En un estudio de BDR, tales ingresos de sustancia pueden ocurrir a tiempos no muestreados en una forma farmacéutica y sí muestreados en la otra, o incluso alternarse aleatoriamente en los distintos individuos participantes del estudio, lo que origina datos de concentración y tiempo altamente variables. Este punto puede dificultar el análisis estadístico de los perfiles, pero también puede ser mejorado notablemente con un adecuado esquema de muestreo, como se hizo en el Capítulo 3 durante el ensayo con PHT.

Creemos, entonces, que para aquellas drogas capaces de ser determinadas en saliva las desventajas que suelen adjudicarse a este fluido no parecen compensar las considerables ventajas que posee.

- Es un método no invasivo: permite obtener un gran número de muestras sin los riesgos asociados a las extracciones sanguíneas (infección, contaminación cruzada entre pacientes, irritación y/o aparición de hematomas).
- Genera mayor aceptación y cumplimiento en los pacientes.
- Resulta ideal para poblaciones pediátricas, psiquiátricas o bajo ciertas condiciones de estrés.
- Ofrece la posibilidad de muestreo domiciliario, sin necesidad de supervisión médica.
- No requiere entrenamiento ni equipamiento especial para quien toma la muestra.
- Permite disminuir los costos por muestra, lo que favorece la realización de estudios/monitoreos sobre grandes poblaciones, como así también de estudios que requieren múltiples muestreos, incluso durante la noche.
- Las concentraciones salivales son un reflejo de las concentraciones libres en plasma, responsables del efecto farmacológico.
- En el caso de medicamentos concomitantes, edad avanzada o ciertos estados patológicos, en los que puede existir desplazamiento de la unión a proteínas o donde el porcentaje unido puede encontrarse alterado, las concentraciones salivales poseerán mayor significancia clínica.

Por lo tanto, a partir de los resultados discutidos aquí surge que la saliva se constituye como un fluido comparable al plasma en cuanto a su aplicabilidad en estudios de BDR. Las concentraciones salivales de droga no sólo cumplen con los requisitos necesarios para su uso clínico y biofarmacéutico, sino que presentan ventajas adicionales ya que, comparadas con las concentraciones venosas, correlacionan mejor con la fracción de droga libre que fluye por los capilares, más representativa de la concentración responsable del efecto terapéutico en la biofase (Fagiolino, 1999; Ritschel & Tompson, 1983). Y como las concentraciones de droga en los capilares, y en muestras de saliva obtenidas con estimulación, están íntimamente relacionadas con los niveles arteriales (Posti, 1982), la biodisponibilidad sistémica de una droga será determinada de manera más adecuada mediante el muestreo en saliva que en sangre venosa post-capilarización.