



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE
ATORVASTATINA EN POLLOS

Celia María González Ponce

2013

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a la realización de esta tesis, y especialmente:

A los directores de ella: los profesores Dr. Emilio Fernández Varón y el Dr. Ignacio Ayala de la Peña, por su ayuda, consejo y estímulo en la realización de la misma.

A la empresa Hijos de Juan Pujante y Avícola Levantina y al Departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de Murcia, por el apoyo que me ha prestado durante la realización de esta tesis.

A Jesús por ser un ejemplo en el que mirarme cada mañana y hacer que mi día a día tenga un sentido. A toda mi familia y en especial a mis padres, por su dedicación y cariño, tarea a la que se han dedicado sin importarles el resultado; a mi hermana Laura por su exigencia en ser cada día mejor y enseñarme como superar los obstáculos de la vida y a mi abuelo Julio por enseñarme la cara de la serenidad.

A Geles y su familia, por su cercanía, cariño y saber estar en los momentos que los he necesitado. A Evi por demostrarme lo bonito que puede ser el recomenzar de las personas valientes. A Alberto y Mari Sacra por sus ánimos y cariño para que este proyecto viera la luz

A mis profesoras del colegio: M^a Dolores, Maleni y Marisa por enseñarme a trabajar bien. A mis compañeros de trabajo del Servicio de Farmacia del Hospital Rafael Méndez por su apoyo diario para conseguir que mi trabajo sea un servicio para los demás.

A todas aquellas personas de las que no me olvido y que me ayudan cada día a ser mejor, a levantarme después de cada caída y a redondear mis aristas para llegar a mi alta meta.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN	5
2.1) Colesterol.....	6
2.2) Lipoproteínas.....	8
2.3) Descubrimiento y desarrollo de las estatinas	15
2.4) Mecanismo de acción de las estatinas.....	20
2.5) Farmacocinética de la atorvastatina	26
2.6) Efectos de la atorvastatina en la arteriosclerosis.....	28
2.6.1) LDL y efectos cardiovasculares	29
2.6.2) Vulnerabilidad de la placa y síndromes coronarios agudos .	31
2.6.3) Macrófagos	33
2.6.4) Células musculares lisas	34
2.6.5) LDL y aterotrombogenesis	35
2.6.6) Función endotelial	36
2.6.7) Concepto de estabilidad de la placa arteriosclerosa	37
2.6.8) Inflamación	39
2.6.9) Efectos de la composición de lípidos en la estabilidad de la placa	41
2.6.10) Proliferación de las CML y síntesis de colágeno	42
2.6.11) Factores trombóticos	44
2.6.12) Factores tisulares	45
2.6.13) Agregación plaquetaria	46
2.7) Efectos secundarios de las estatinas	47
2.8) Biomodelo animal	49
2.9) Aportaciones de nuestro grupo de investigación en el modelo experimental aviar	55
3. MATERIALES Y MÉTODOS	58
3.1) Material	59
3.1.1) Material fungible.....	59

3.1.2) Productos y reactivos	60
3.1.3) Instrumental.....	60
3.1.4) Software informático	62
3.2) Estudio matriz de evaluación del efecto de la atorvastatina en un biomodelo animal de pollo.....	62
3.3) Animales y dieta	63
3.4) Protocolo experimental	64
3.5) Técnicas analíticas	65
3.6) Validación de la técnica	66
3.7) Análisis farmacocinético	68
3.7.1) Análisis compartimental	68
3.7.2) Análisis no-compartimental	69
3.8) Métodos estadísticos	69
4. RESULTADOS.....	70
4.1) Administración de atorvastatina intravenosa al grupo control (A) ..	71
4.2) Administración de atorvastatina oral al grupo control (A)	83
4.3) Resultados analíticos de marcadores lipídicos del grupo B	96
5. DISCUSIÓN.....	97
5.1) Biomodelo animal	98
5.2) Administración intravenosa de atorvastatina en pollos	101
5.2.1) Modelo farmacocinético	101
5.2.2) Parámetros farmacocinéticos	105
5.2.2.1) Constantes de disposición rápida y lenta	105
5.2.2.2) Microconstantes	106
5.2.2.3) Semivida y tiempo medio de residencia	108
5.2.2.4) Volúmenes de distribución aparente	109
5.2.2.5) Área bajo la curva	109
5.2.2.6) Aclaramiento plasmático	110
5.3) Administración oral de atorvastatina en pollos	111
5.3.1) Modelo farmacocinético	111
5.3.2) Parámetros farmacocinéticos	113

5.3.2.1) Tiempos de vida media, MRT y MAT	113
5.3.2.2) Tiempo máximo y concentración máxima	114
5.3.2.3) Constante de absorción y semivida de absorción ..	114
5.3.2.4) Área bajo la curva y biodisponibilidad	115
5.4) Comparación entre administraciones	116
5.4.1) Semivida en la fase terminal	116
5.4.2) Tiempo medio de residencia	117
5.4.3) Área bajo la curva	118
5.5) Descenso de los perfiles lipídicos en pollos tratados con atorvastina	120
6. CONCLUSIONES	122
7. RESUMEN	125
8. SUMMARY	128
9. BIBLIOGRAFIA	131
10. ABREVIATURAS	154

Introducción

El objetivo de la farmacocinética consiste en estudiar la evolución temporal de las concentraciones y cantidades de fármaco y sus metabolitos en fluidos orgánicos, tejidos y excrementos, así como su respuesta farmacológica, y construir modelos adecuados para interpretar los datos obtenidos. Los datos se procesan empleando modelos matemáticos a los que se ajustan las concentraciones, las cantidades de fármaco o sus metabolitos en la totalidad del organismo, o en alguna de sus partes. Las ecuaciones así obtenidas sirven para formular predicciones acerca de los resultados que se obtendrían con tratamientos medicamentosos, ya que la respuesta farmacológica viene determinada por la cantidad de fármaco que accede a los lugares de acción, y este acceso está condicionado por la concentración sanguínea del fármaco.

Desde hace bastantes años la arteriosclerosis y la enfermedad cardiovascular asociada a ella, ha sido uno de los temas más importantes de investigación biomédica, debido al importante aumento de la morbi-mortalidad y al conocimiento de los distintos factores de riesgo implicados en su producción y desarrollo.

Uno de los principales factores de riesgo y potencialmente modificable, es la hipercolesterolemia. A principios de los noventa, con la introducción de las estatinas como fármacos hipolipemiantes se produjo un gran avance en el control de los lípidos, lo que permitió conseguir una significativa reducción en la mortalidad total y cardiaca.

Actualmente no existe discusión alguna en cuanto a la conveniencia de administrar fármacos hipolipemiantes (sobre todo estatinas) como mecanismo de prevención primaria con dos o más factores de riesgo y secundaria en la enfermedad cardiovascular. Los distintos estudios puestos en marcha actualmente tienen como uno de sus objetivos discernir cuál es la mejor estatina, basándose en el grado de reducción

de los niveles de colesterol y en la posibilidad de regresión de la placa de arteriosclerosis y en la disminución de los eventos cardíacos agudos.

Estudios previos en el modelo experimental que utilizamos en nuestro grupo de trabajo, pollos alimentados con dieta aterogénica, lo han validado como modelo para el estudio de arteriosclerosis, pero no hemos caracterizado este modelo desde el punto de vista farmacocinético tras la administración de las estatinas. Para ello se realizó el estudio en pollos alimentados con una dieta rica en colesterol, a los que se les administró 10 mg de atorvastatina por vía intravenosa y oral. En los tiempos establecidos se procedió a la extracción de sangre y medición de los niveles del fármaco existente en ella, necesarios para la realización del estudio farmacocinético.

Con las concentraciones de atorvastatina en sangre se procedió a realizar una comparativa estadística comprobando la normalidad de la muestra, realizándose posteriormente el estudio farmacocinético para definir el comportamiento del fármaco en la sangre del modelo animal.

Así mismo se procedió a evaluar el efecto de la atorvastatina en el biomodelo animal del pollo al que se le induce la enfermedad mediante una dieta hiperlipémica utilizando para ello los marcadores lipídicos sanguíneos.

Considerando todo lo expuesto hasta el momento, nos hemos planteado en la siguiente memoria estudiar la farmacocinética de atorvastatina en este biomodelo con el fin de alcanzar los siguientes objetivos:

1. Determinación de los parámetros farmacocinéticos de atorvastatina tras la administración intravenosa y oral a pollos de la raza White Leghorn, progenitores Broilers sanos recibiendo una dieta sana normal.
2. Proposición de un régimen de dosificación de atorvastatina para el biomodelo animal del pollo al que se le induce la enfermedad mediante una dieta hiperlipémica, evaluando los distintos parámetros farmacocinéticos obtenidos.

Revisión bibliográfica

El fármaco objeto de nuestro estudio, la atorvastatina, actúa indirectamente sobre el metabolismo del colesterol, molécula responsable de diversas patologías cardiovasculares.

2.1.- COLESTEROL

El colesterol es un compuesto alicíclico cuya estructura está compuesta por un núcleo ciclopentanofenantreno con cuatro anillos fusionados, un sólo grupo hidroxilo en posición C3 y una cadena hidrocarbonada ramificada de ocho carbonos unidos al anillo D en la posición 17. Estructura que se ve reflejada en la figura 1.

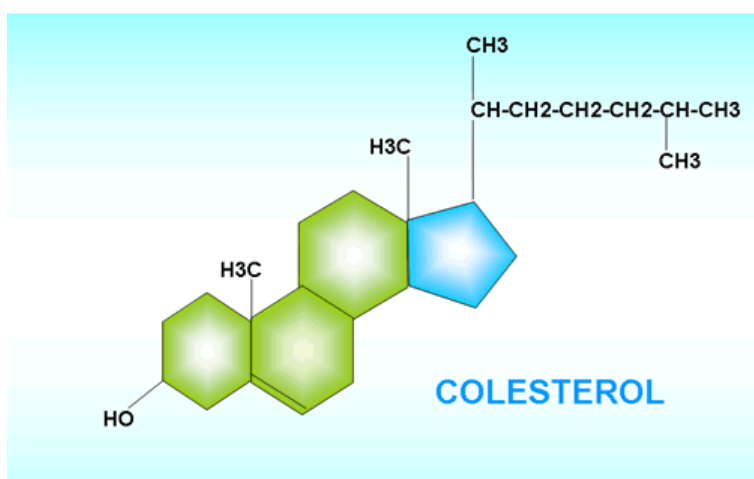


Fig. 1.- Estructura molecular del colesterol.

Es un lípido muy poco soluble en agua por lo que su altísima solubilidad en sangre se debe a la presencia de lipoproteínas plasmáticas que tienen la capacidad de fijarlo y por tanto de solubilizar grandes cantidades de colesterol. Solamente el 30 % del colesterol circulante se presenta de forma libre, el resto (70 %) se presenta unido a las lipoproteínas en forma de ésteres de colesterol, en las que un ácido graso (normalmente el ácido linoleico) está unido al grupo hidroxilo en C3.

El colesterol está presente en la dieta de todas las personas y se absorbe lentamente desde el tubo digestivo a linfa. Es muy liposoluble y levemente hidrosoluble, y es capaz de formar ésteres con los ácidos grasos, como hemos mencionado anteriormente, así encontramos el 70% del colesterol del plasma.

Junto al colesterol que se absorbe cada día en el tubo digestivo, colesterol exógeno, se forma una cantidad incluso mayor en las células del cuerpo, llamado colesterol endógeno. Aunque la biosíntesis “de novo” tiene lugar en todas las células, esta capacidad es mayor en ciertos tejidos, especialmente hígado, intestino, corteza suprarrenal y tejidos reproductores (ovarios, testículos y placenta). Casi todo el colesterol endógeno que circula en las lipoproteínas del plasma se forma en el hígado, teniendo todas las células del cuerpo capacidad de síntesis de colesterol, lo que es compatible con el hecho de que muchas de las estructuras membranosas de las células estén compuestas en parte de esta sustancia.

Para el transporte de la molécula a lo largo del organismo humano se sintetizan las lipoproteínas, encargadas principalmente del transporte de lípidos.

2.2.- LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas del plasma son complejos en los cuales los lípidos y las proteínas están en una relación relativamente fija. Transportan lípidos insolubles en agua entre los diversos órganos por medio de la sangre, en forma de partículas relativamente pequeñas cuyo diámetro y peso permanece constante.

Son partículas esféricas con los lípidos menos polares, como triglicéridos y ésteres de colesterol, contenidos en el centro hidrófobo; los lípidos más polares, como los fosfolípidos y el colesterol libre, forman una monocapa superficial junto con apolipoproteínas anfipáticas. Cada lipoproteína contiene una o más apolipoproteínas, que proporcionan estabilidad estructural y que sirven como ligandos para receptores celulares que determinan el destino metabólico de partículas individuales, o actúan como cofactores para enzimas implicadas en el metabolismo de las lipoproteínas.

Junto a los quilomicrones (producidos por el intestino, son muy ricos en triglicéridos de origen exógeno, y pobres en colesterol libre y fosfolípidos), que son en sí mismos lipoproteínas grandes, existen cuatro clases principales de lipoproteínas, clasificadas por sus densidades medidas en la ultracentrífuga:

- 1) Lipoproteínas de muy baja densidad, (VLDL). Son suficientemente grandes para dispersar la luz, y cuando hay una cantidad excesiva de VLDL, el plasma es turbio. Contienen concentraciones elevadas de triglicéridos, siendo éstos principalmente de origen endógeno (hepático), y concentraciones moderadas de colesterol y fosfolípidos.

- 2) Lipoproteínas de densidad intermedia, (IDL). Son lipoproteínas de muy baja densidad de las que se ha extraído una gran parte de los triglicéridos, de forma que las concentraciones de colesterol y fosfolípidos están aumentadas.
- 3) Lipoproteínas de baja densidad, (LDL). Constituyen alrededor del 50% de la masa total de lipoproteínas en el plasma humano. Son lipoproteínas de densidad intermedia de las que se han extraído todos los triglicéridos, dejando una concentración especialmente alta de colesterol (aproximadamente la mitad de la masa de las LDL) y una concentración moderadamente alta de fosfolípidos.
- 4) Lipoproteínas de alta densidad, (HDL). Contienen una alta concentración de proteínas, aproximadamente un 50% pero concentraciones menores de colesterol y fosfolípidos.

Un segundo sistema de clasificación asigna prioridad al contenido de apolipoproteínas. Estas moléculas son proteínas específicas que forman parte de las lipoproteínas. Cada lipoproteína tiene una composición apolipoproteica particular y relativamente constante. Las apolipoproteínas desempeñan papeles importantes en el transporte de lípidos, activando o inhibiendo enzimas implicadas en el metabolismo de los lípidos y/o fijando lipoproteínas a los receptores de lipoproteínas de la superficie celular. Actualmente se utiliza una clasificación alfabética para apolipoproteínas (Alaupovic, 1971).

- 1) Apolipoproteína A (apoA). La apoA es el componente proteico principal de la HDL. Está también presente en pequeñas cantidades en los quilomicrones intestinales. Los dos componentes principales de la apoA son la apolipoproteína

A-I y la apolipoproteína A-II. Son sintetizadas por el hígado y el intestino y catabolizadas en su mayor parte por el hígado y el riñón.

- 1.1) Apolipoproteína A-I (apoA-I). La apoA-I constituye alrededor del 75% de la apoA de las HDL. Consta de 243 a 245 aminoácidos, con un peso molecular de 28.300 Da. La apoA-I es un activador de la enzima lecitín:colesterol-aciltransferasa.(LCAT)
- 1.2) Apolipoproteína A-II (apoA-II). La apoA-II constituye alrededor del 20% de la apoA en la HDL. Consta de 154 aminoácidos y tiene un peso molecular de 17.000 Da. El papel fisiológico de la apoA-II es desconocido.
- 2) Apolipoproteína B (apoB). La apoB es el principal constituyente proteico (95%) de la LDL y constituye el 40% de la parte proteica de la VLDL y de los quilomicrones. Ha sido muy difícil estudiar las características físicas y químicas de la apoB, porque es insoluble en agua. El componente principal es la apolipoproteína B-100 (apoB-100), con un peso molecular aproximado de 549.000 Da. Es sintetizada por el hígado y es la señal de reconocimiento que dirige a la molécula LDL al receptor LDL.
- 3) Apolipoproteína C (apoC). Es un componente proteico principal de la VLDL y también un constituyente menor de la HDL y la LDL. Se conocen tres tipos diferentes de apoC.
 - 3.1) Apolipoproteína C-I (apoC-I). La apoC-I consta de 57 restos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 6.500 Da. Es un constituyente menor de los quilomicrones y de las proteínas VLDL y HDL.

- 3.2) Apolipoproteína C-II (apoC-II). La apoC-II tiene un peso molecular de 8.800 Da y consta de 78 a 79 restos de aminoácidos. Constituye del 5 al 10% de la proteína VLDL y menos del 2% de la proteína HDL. La apoC-II es un potente activador de la enzima lipoproteinlipasa (LPL) (LaRosa et al., 1970).
- 3.3) Apolipoproteína C-III (apoC-III). Es un componente principal de la proteína VLDL (25-30%). Es también la forma principal de apoC en la HDL, constituyendo alrededor del 2% de su parte proteica. El papel fisiológico de la apoC-III es desconocido, pero puede estar implicada en la regulación de la velocidad del aclaramiento de residuos de partículas lipoproteicas ricas en triglicéridos.
- 4) Apolipoproteína E (apoE). Esta apolipoproteína rica en arginina es un importante constituyente de las proteínas VLDL y HDL. Su peso molecular es de 35.000-39.000 Da y consta de 299 restos de aminoácidos. La apoE se cree que es el factor de reconocimiento que dirige los quilomicrones y los restos de VLDL al receptor hepático de quilomicrones residuales y se fija también a los receptores de la LDL en la superficie celular (Green y Glickman, 1981; Sherrill et al., 1980).

La función principal de las lipoproteínas plasmáticas es el transporte de los triglicéridos y del colesterol, desde los lugares de origen en el intestino (origen exógeno) y en el hígado (origen endógeno) hasta los lugares de almacenamiento y utilización de energía, tal y como se aprecia en la figura 2.

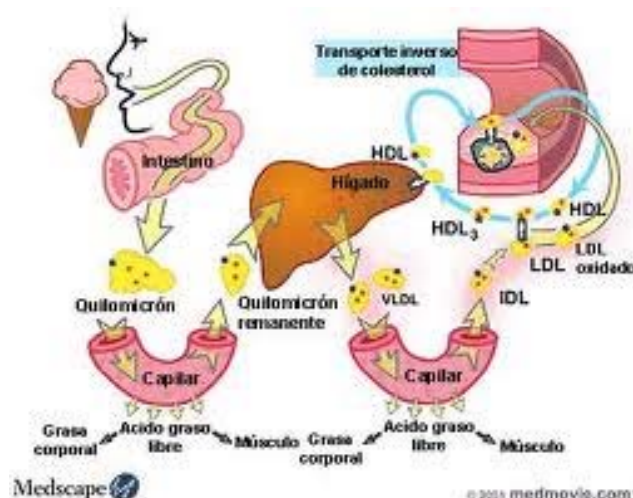


Figura 2. Transporte de colesterol en el interior del organismo humano.

Los triglicéridos y el colesterol penetran en el plasma en forma de partículas lipoproteicas ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL), que suministran ácidos grasos a los tejidos para los requerimientos energéticos y el almacenamiento. La grasa exógena de la dieta es transportada desde su lugar de absorción intestinal en forma de quilomicrones. Los triglicéridos endógenamente sintetizados son transportados desde el hígado en las VLDL. La estructura general de estas dos partículas ricas en triglicéridos es similar, pero difieren en tamaño, composición de lípidos y contenido en apolipoproteínas. Ambas partículas contienen las apoE y adquieren las apoC en el plasma, pero sólo los quilomicrones incluyen las apoA como componentes proteicos principales de superficie.

Los quilomicrones y las VLDL sufren un cambio intravascular casi inmediatamente después de su penetración en la circulación, mediante la acción de la LPL, una enzima presente sobre la superficie luminal de las células endoteliales capilares, que hidroliza los triglicéridos y los diglicéridos en ácidos grasos y monoglicéridos. La LPL es activada por la apoC-II que está presente en la superficie de las partículas ricas en triglicéridos. Durante este proceso, el quilomicrón pierde más del

95% de su masa, principalmente en forma de triglicérido y de apoA y apoC. Tanto los lípidos superficiales como las apolipoproteínas son transferidos a las HDL.

La partícula del quilomacrón depleccionada o residual contiene apoB y ApoE como apolipoproteínas principales. A continuación se fija a la superficie de los hepatocitos, penetra en la célula por medio de un proceso endocitótico regido por un receptor y finalmente es degradada.

Las VLDL son sintetizadas en el hígado, catabolizadas en parte por la LPL y convertidas en restos de VLDL relativamente enriquecidos de colesterol, algunos de los cuales son eliminados por el receptor de residuos hepáticos (Bachorik y Kwiterovich, 1988). Los elementos superficiales, a saber, el colesterol libre, los fosfolípidos y las apolipoproteínas son transferidos de la VLDL a la HDL, que interactúa con la LCAT para formar ésteres de colesterol y lisolecitina. Los ésteres de colesterol son subsiguientemente transferidos a la IDL, que se convierte en LDL rica en ésteres de colesterol.

La LDL es, pues, un producto final del metabolismo intravascular de la VLDL. La LDL acarrea la mayor parte del colesterol circulante en el hombre y transporta colesterol a los tejidos a través de la endocitosis regida por los receptores LDL, que tiene lugar en los tejidos hepáticos y en los extrahepáticos. (Brown et al., 1981).

Los procesos anteriores constituyen la vía extrínseca del colesterol, aquella por la cual se transporte esta molécula desde intestino hasta los lugares de almacenamiento mientras que la vía intrínseca permite el transporte desde el hígado hasta dichos lugares.

La HDL es segregada tanto en el hígado como en el intestino, como partículas discoideas nacientes que contienen colesterol y fosfolípidos. (Scanu et al., 1982; Oram,

1986; Oppenheimer et al., 1987; Havel, 1980). Se cree que la HDL es el vehículo para el transporte inverso del colesterol. Acumula colesterol de las membranas celulares y otras lipoproteínas, y se convierte en una partícula esférica dentro de la circulación a través de la acción de la LCAT y el movimiento de los corpúsculos de colesterol formados en el núcleo de la partícula de HDL. En el hombre, los ésteres de colesterol de HDL son luego transferidos a la VLDL y la IDL, y subsiguientemente metabolizados a través de los receptores residuales de LDL. Algunos de los ésteres de colesterol pueden también ser aportados directamente al hígado desde la HDL (Glass et al., 1983; Stein et al., 1984; Bachorik et al., 1987).

2.3.- DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS ESTATINAS

Los grandes estudios epidemiológicos realizados en distintos países informaron de la importancia de los niveles de colesterol en las enfermedades cardiovasculares. El riesgo coronario se eleva progresivamente con el aumento de los niveles de colesterol en sangre, particularmente cuando el colesterol se eleva por encima de 200 mg/dl (Keys, 1980). Existe también, evidencia suficiente que la disminución en los niveles de colesterol total y LDL reduce la incidencia de enfermedades coronarias.

Entre las décadas de 1950 y 1960, se introdujeron en el uso clínico varios fármacos con capacidad para reducir los niveles de colesterol, entre ellos estaban el ácido nicotínico, la colestiramina, clofibrato, neomicina, esteroides vegetales, triparanol, D-tiroxina y hormonas estrogénicas.

El mecanismo de acción de estos fármacos es distinto; el ácido nicotínico actúa a nivel de la síntesis de lipoproteínas, la colestiramina liga los ácidos biliares en la luz intestinal impidiendo su reabsorción, rompiendo los ácidos biliares; el clofibrato estimula la actividad de la LPL con la consiguiente hidrólisis de los triglicéridos de los quilomicrones y VLDL. La neomicina es efectiva en pacientes con hipercolesterolemia familiar ya que actúa precipitando el colesterol a nivel intestinal, evitando su absorción; los esteroides vegetales interfieren en la absorción intestinal del colesterol; el triparanol inhibe la síntesis de colesterol pero en los estadios finales por lo que se acumulan esteroides intermedios que pueden ser tóxicos; la D-tiroxina es un isómero óptico de la L-tiroxina que disminuye el colesterol pero a la larga produce un aumento de la mortalidad en pacientes con arritmia, angor o infarto agudo de miocardio; los

estrógenos también reducen el nivel de colesterol pero en los hombres tienen efectos de feminización.

La mayoría de estos fármacos, exceptuando los fibratos y la colestiramina, se han dejado de utilizar por sus efectos secundarios importantes. Estos dos últimos se han asociado a estatinas con buenos resultados clínicos.

En la década de los 60, se empezó a investigar el ciclo de síntesis del colesterol, observándose que la enzima limitante del proceso era la Hidroxi-metil-glutaril-CoenzimaA reductasa (HMG-CoA reductasa), por lo que si se descubría el inhibidor de este enzima se podría disminuir la síntesis del colesterol desde el inicio de la cadena.

Al inicio de los años setenta comienzan las investigaciones en cultivos microbiológicos, ya que se observó que existían microorganismos que inhibían el crecimiento de otros que necesitaban para su subsistencia esteroides e isoprenoides con lo que se sospechaba que podrían sintetizar alguna sustancia que inhibía la síntesis de los esteroides.

Tras 6.000 ensayos microbiológicos desarrollados a lo largo de dos años, se descubrió la posibilidad de bloquear la síntesis de lípidos. Se aisló el antibiótico citrinina a partir del hongo *Pythium ultimum* (Endo et al., 1976a; Tanzawa et al., 1977), descubriéndose que era un inhibidor irreversible de la HMG-CoA reductasa. Posteriormente a este estudio, se realizó un ensayo con *Penicillium citrinum*, encontrándose otro compuesto que se consiguió aislar, denominado mevastina (Endo et al., 1976b), siendo posteriormente publicado con el nombre de compactina, aislada desde el *Penicillium brevicompactum*. (Brown et al., 1976).

Desde el principio, llamó la atención la similitud estructural existente entre la mevastina (o compactina) y la HMG-CoA, lo que permitía explicar la competición entre las dos moléculas y las relaciones estructura-actividad a la hora de inhibir la enzima reductasa. El potente efecto hipocolesterolemizante de la mevastina en animales de experimentación quedó plenamente demostrado en 1974 y, a principios de 1976 se inició la fase experimental del tratamiento con dicho compuesto en pacientes japoneses heterocigotos con hipercolesterolemia familiar.

Desde que se aisló la mevastina se han realizado distintos estudios experimentales en animales y ensayos clínicos en humanos para descubrir el mecanismo de acción.

En 1978 se aisló la lovastatina derivado fúngico, procedente de cultivos de *Aspergillus terreus*, (Endo, 1979; Alberts et al, 1980) un inhibidor de la HMG-CoA reductasa más potente que la mevastina y más específico.

Después de éste se aislaron otros naturales como simvastatina y pravastatina. La simvastatina se diferencia de lovastatina por presentar un grupo metil en la cadena éster, mientras que la pravastatina se obtiene por transformación de la mevastatina por parte de la *Nocardia autotrophica*. Las estatinas de origen sintético son fluvastatina, atorvastatina y cerivastatina.

La atorvastatina es químicamente diferente al resto de estatinas, siendo un único esteroisómero de un derivado pirrólico, es un polvo cristalino de color blanco a transparente, prácticamente insoluble en soluciones acuosas con un pH 4 o menor, muy poco soluble en agua destilada, en buffer de fosfato de pH 7.4 y acetonitrilo, levemente soluble en etanol y soluble en metanol. Su nombre químico es ácido [R-(R, R)]-2-(4-

fluorofenil) β, d -dihidroxi-5- (1-metiletil)-3- fenil-4-[(fenilamino)carbonil]-1H-pirrol-1-heptanoico sal cálcica (2:1) trihidrato y su fórmula empírica: $(C_{33}H_{34}FN_2O_5)_2Ca \cdot 3H_2O$. Su peso molecular es de 1.209,42 g

Su estructura química es la que aparece en la figura 3.

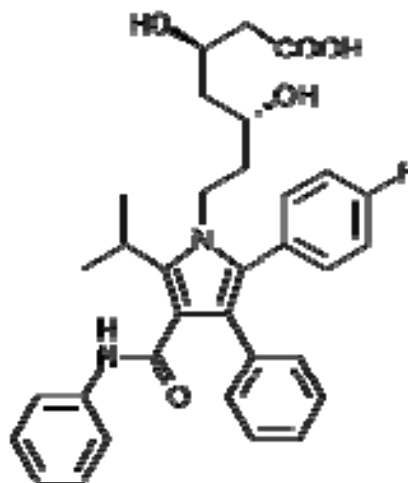


Figura 3. Estructura química de atorvastatina.

En clínica se utiliza la sal cálcica de la atorvastatina. La atorvastatina cálcica es una sustancia ligeramente soluble en agua, cuyas formas cristalinas son, en general, menos solubles que su forma amorfa, lo cual puede causar problemas de biodisponibilidad. Sin embargo, se ha descubierto que la forma amorfa de atorvastatina cálcica presenta, a menudo, problemas de estabilidad y manipulación, ya que tiende a captar moléculas de agua con facilidad. Además, tales formas amorfas hidratadas presentan valores variables de contenido en agua, lo cual hace que su preparación presente problemas de reproductibilidad.

2.4.- MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS ESTATINAS

Como se aprecia en el esquema de la página 22 el primer compuesto exclusivo de la ruta de la biosíntesis del colesterol es el ácido mevalónico, que deriva del precursor bicarbonado acetil CoA que mediante dos enzimas (acetil CoA acetiltransferasa y Hidroxi-Metil-Glutaril-CoA sintetasa) da origen al Hidroxi-Metil-Glutaril-CoA.

Desde el Hidroxi-Metil-Glutaril-CoA se produce el ácido mevalónico, mediante el importante enzima microsomal Hidroxi-Metil-Glutaril-CoA reductasa. Mediante distintos pasos enzimáticos se llega a la síntesis del esqualeno y de aquí al colesterol.

El punto primario para el control de la biosíntesis de colesterol es el isoenzima citoplasmático de la Hidroxi-Metil-Glutaril-CoA reductasa que es donde van a actuar las estatinas, inhibidores competitivos de dicha enzima, presentando una estructura química similar al Hidroxi-Metil-Glutaril-CoA, sustrato principal de dicha enzima. La inhibición de la enzima origina una disminución en la síntesis de colesterol y de otra serie de productos intermedios.

La enzima normalmente forma un tetrámero, si bien el dímero es suficiente para la reacción enzimática. Las estatinas comparten un grupo estructural que es muy similar a la porción Hidroxi-Metil-Glutaril de la molécula Hidroxi-Metil-Glutaril-CoA. La parte semejante de las estatinas se une covalentemente con grupos muy o parcialmente hidrofóbicos. La unión de la estatina a la enzima se asocia a un cambio conformacional.

Según su estructura las estatinas podrán dividirse en dos grupos: tipo 1 con un anillo y las tipo 2 con un grupo fluorenil y metiletil no presentes en el tipo 1. Dentro del tipo 2 nos encontramos con la molécula origen de nuestro estudio: atorvastatina.

La atorvastatina ocupará el sitio de la molécula Hidroxi-Metil-Glutaril en la enzima Hidroxi-Metil-Glutaril-CoA reductasa, con el grupo hidrofóbico situado en el hueco originado tras el cambio conformacional C-terminal. Además por pertenecer al tipo 2 presenta interacciones adicionales a través de su grupo fluorofenil y específicamente por su estructura presenta uniones hidrogenadas con un residuo de serina (Istvan, 2003).

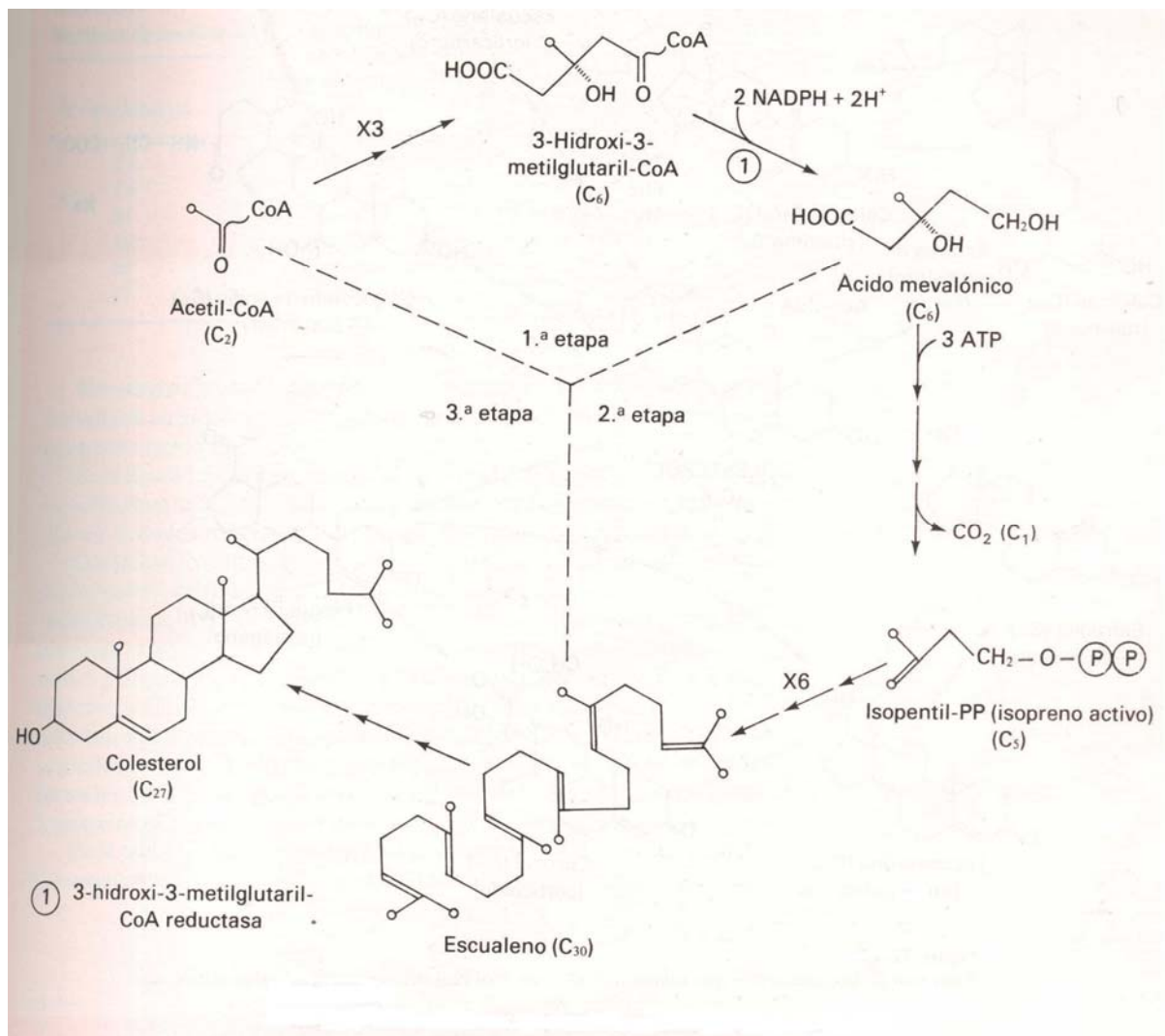


Figura 4. Biosíntesis de colesterol.

La atorvastatina, es un potente inhibidor competitivo y reversible de la enzima Hidroxi-Metil-Glutaril-CoA reductasa. Esta propiedad se debe a su similitud estructural del grupo farmacológico de la atorvastatina, el extremo hidroxicarboxílico, con el sustrato natural de la enzima, el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. En presencia del fármaco, el sustrato natural es desplazado del centro catalítico del enzima, impidiéndose la síntesis de ácido mevalónico.

Debido a la sencilla estructura molecular, el HMG-CoA que se acumula, es rápidamente degradado, evitándose la aparición de efectos secundarios, que sí se producían en otros inhibidores de la síntesis del colesterol.

En experimentos realizados in vitro se ha podido determinar la actividad de la enzima, comprobándose así la eficacia teórica del fármaco. In vivo también es posible, aunque indirectamente, determinar la actividad de la HMG-CoA reductasa, mediante la determinación de las concentraciones plasmáticas de ácido mevalónico (Parker et al., 1984). Como se comprobó en 1996, (Naoumova et al., 1996) se redujeron hasta en un 59 % las concentraciones plasmáticas de ácido mevalónico en pacientes con hipercolesterolemia familiar heterocigota tras la administración durante 6 semanas de 80 mg/día de atorvastatina.

La atorvastatina parece no modificar la actividad de otras enzimas claves del metabolismo lipídico, como la colesterol 7 α -hidroxilasa, lipoprotein-lipasa, lipasa hepática o diacilglicerol aciltransferasa, tanto en conejos normolipémicos (Alegret et al., 1998) como en cobayas hipercolesterolémicos (Conde et al., 1996).

La mayor parte del colesterol que circula en plasma proviene de la síntesis por la vía del mevalonato desarrollada en el hígado (vía intrínseca). El paso limitante de esta vía, como hemos mencionado anteriormente, está en la enzima HMG-CoA reductasa y está sometida a regulación metabólica.

Las estatinas inhiben la síntesis del colesterol en un punto muy precoz y limitante de la vía metabólica. La inhibición es competitiva y parcial, como lo demuestra que la excreción urinaria de mevalonato se reduce en un 30 %, quedando suficiente para atender las necesidades de las células. En algunos estudios se ha demostrado que puede reducir la concentración de la coenzima Q (ubiquinona), debido a que parte de esa vía engloba al mevalonato; esta coenzima es necesaria para el transporte de electrones en el metabolismo mitocondrial. Willis y colaboradores observaron que podía haber correlación entre la disminución de los niveles de ubiquinona y el empeoramiento de los síntomas de insuficiencia cardiaca congestiva en pacientes tratados con lovastatina (Willis et al., 1990). La inhibición es potente pero reversible, siendo dosis dependiente, alcanzado una meseta de eficacia a partir de la cuál sólo aumentan los efectos secundarios.

El efecto de las estatinas guarda relación también con la expresión de los receptores del hepatocito para las LDL. Como se demuestra en estudios con pacientes con hiperlipidemia familiar combinada, hipercolesterolemia poligénica e hipercolesterolemia familiar heterocigota, donde existe un gen normal para dicho receptor, y las estatinas sí producen su efecto. En cambio en la forma homocigota, al no existir este gen y no poder expresar el receptor para las LDL, la administración de estatinas no va seguida de un descenso de la colesterolemia.

2.5.- FARMACOCINÉTICA DE LA ATORVASTATINA

Actualmente la vía de administración de atorvastatina es la oral, por lo que empezaremos nuestro estudio farmacocinético con la absorción del medicamento.

En general, la biodisponibilidad oral de un fármaco es afectada por la velocidad de disolución, el tiempo de tránsito, la permeabilidad intestinal y el efecto de primer paso.

La solubilidad de la atorvastatina es alta a pH 6.0, (pH fisiológico a nivel intestinal) (Kearney et al., 1993), así mismo por sus propiedades no polares presenta una elevada permeabilidad, lo que concluye que presentará una alta biodisponibilidad (Amidon et al., 1995; Lennernäs, 1997). En cambio su biodisponibilidad se sitúa entorno a un 12% debido al aclaramiento presistémico en la mucosa digestiva, bien al metabolismo de primer paso en el hígado, su lugar primario de acción, o a ambos (Gibson et al., 1997).

En clínica se utiliza la sal sódica de la atorvastatina presentando una concentración plasmática máxima (C_{max}) de 13-16 mcg/L y un tiempo para alcanzar esta concentración (T_{max}) de una hora tras la administración oral de 40 mg. El área bajo la curva (AUC) fue de 54-61 mcg/L (Kantola et al., 1998; Lilja et al., 1999).

La atorvastatina presenta una absorción lineal hasta una dosis de 40 mg, a partir de la cual presenta un comportamiento no-lineal, debido a una saturación de la reacción de glucuronidación (responsable del efecto de primer paso) y la disminución en la excreción biliar de la molécula y sus metabolitos.

Presenta un volumen de distribución de 381 L, tras la administración de 5 mg del medicamento vía intravenosa (Gibson et al., 1997). Este volumen es superior al volumen de agua total del cuerpo lo que indica que es alta su unión a tejidos periféricos. El transporte del fármaco al interior de los tejidos es alto en concordancia con su alta permeabilidad transmembrana debido a la naturaleza no polar del fármaco.

En la bibliografía encontramos datos de unión a proteínas plasmáticas entorno al 95%, 98%, 80-90% (Christians et al., 1998; Gibson et al., 1997; Malhotra y Goa, 2001).

La principal vía de eliminación de atorvastatina es el metabolismo en el hígado, a pesar del efecto de primer paso importante que ocurre en la pared digestiva, a través de la isoenzima CYP3A4, originando metabolitos activos. La excreción renal de atorvastatina supone sólo un 1% (Stern et al., 1997).

La semivida de eliminación de atorvastatina es de unas 14 horas, aunque la semivida de eliminación de la actividad inhibidora para la HMG-CoA reductasa es de 20 a 30 horas debido a la contribución de los metabolitos activos.

2.6.- EFECTOS DE LA ATORVASTATINA EN LA ARTERIOSCLEROSIS

Los estudios experimentales sugieren que las estatinas pueden estabilizar la placa a través de la reducción de macrófagos y el nivel de contenido de ésteres de colesterol y el aumento del colágeno y de las células musculares lisas. La secuela trombótica causada por la rotura de la placa es mitigada por la inhibición de la agregación plaquetaria y mantenida por un balance favorable entre los mecanismos protrombóticos y fibrinolíticos, favorecidos por las estatinas.

2.6.1.- LDL Y EFECTOS CARDIOVASCULARES

Las LDL son un buen indicador de los riesgos cardiovasculares, pero solamente están elevadas en la mitad de los pacientes con eventos cardiovasculares (Pekkanen et al., 1990; Pekkanen et al., 1993).

La importancia de las LDL debe ser asociada a HDL (Castelli et al., 1986), fibrinógeno (Heinrich et al., 1994; Thompson et al., 1995), viscosidad del plasma (Sweetnam et al., 1996) y Proteína C Reactiva (PCR) (Thompson et al., 1995).

En casi todos los estudios se reducen los niveles de lípidos pero dan una disminución en la mortalidad cardiovascular diferente (Shepherd et al., 1995; Blankenhorn et al., 1993; Salonen et al., 1995), esto significa que aparte de los efectos lipídicos existen otros mecanismos relacionados con las estatinas.

La atorvastatina se comporta como un potente hipocolesterolemia en diversos modelos experimentales. Se postulan dos mecanismos distintos para explicar su reducción de colesterol. Primero, debido a un aumento de los receptores para las LDL que provoca un incremento en el aclaramiento de dichas partículas, principales transportadores de colesterol en plasma. En segundo lugar debido a la inhibición de la síntesis hepática de VLDL por reducción de la disponibilidad de colesterol libre microsomal. La reducción de la cantidad de colesterol plasmático en forma de VLDL provocaría secundariamente una disminución en la producción de colesterol LDL.

Se han observado reducciones de colesterol total y colesterol LDL del 20 al 70 % en distintos animales de experimentación como conejos normolipémicos (Alegret et al., 1998; Krause et al., 1995), conejos hipercolesterolémicos alimentados con una dieta rica en caseína, (Krause et al., 1995; Auerbach et al., 1995) cobayas normolipémicas

(Krause et al., 1995) y cobayas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica rica en grasas (Conde et al., 1996) oscilando en estos estudios las dosis de atorvastatina de 1 a 20 mg/Kg/d, siendo la dosis media más utilizada de 3 mg/Kg/d.

Este mismo efecto hipocolesterolemizante se ha observado en ensayos clínicos en humanos de distintos tipos de dislipemias. La dosis de atorvastatina oscilaba entre los 2,5 mg a los 80 mg/d, obteniéndose reducciones del colesterol LDL de hasta el 42 % en pacientes con hipertrigliceridemia primaria (Baker-arkema et al., 1996) tras la administración de 80 mg/d durante 4 semanas; del 60 % en pacientes con hipercolesterolemia primaria (Nawrocki et al., 1995) tras la administración de 80 mg/d durante 6 semanas; del 54 % en pacientes con hipercolesterolemia familiar heterocigota con la misma dosis de atorvastatina que en los casos anteriores, (Naoumova et al., 1996) y del 39 % tras administrar 10 mg/d durante 4 semanas en pacientes con diabetes mellitus no-insulinodependiente (Best et al., 1996).

Los efectos hipocolesterolemizantes, son dosis-dependiente ya que administrando dosis crecientes de atorvastatina a pacientes con hipercolesterolemia primaria, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 mg/d obtuvo reducciones de los niveles de LDL de 25, 29, 42, 44, 50 y 61 % respectivamente tras un periodo de 6 semanas (Nawrocki et al., 1995).

Como hemos mencionado anteriormente el efecto cardiovascular del LDL va íntimamente relacionado con los niveles de HDL. Respecto a este efecto de aumento de HDL con la administración de Atorvastatina se ha podido comprobar que en humanos es más variable, habiéndose detectado variaciones entre una reducción del 1 al 3 % e incrementos del 7 al 12 % (Lea y McTavish, 1997).

2.6.2.- VULNERABILIDAD DE LA PLACA Y SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS

Las características de la vulnerabilidad de la placa incluyen el número de células inflamatorias, macrófagos y linfocitos T, el pool de lípidos, células musculares lisas y colágeno (Berliner et al., 1995; Hansson et al., 1989; Van der Wal et al., 1994). Los macrófagos liberan enzimas proteolíticos que adelgazan la capa fibrosa y aceleraran la degradación del colágeno. Los linfocitos T liberan interferón gamma (γ -IFN) que inhiben las células musculares lisas para inhibir la expresión de genes del colágeno intersticial e inhibir la síntesis del colágeno e inhibir la proliferación de las células musculares lisas (Rekhter et al., 1993; Warner et al., 1989; Amento et al., 1991).

Además se afecta la síntesis de proteínas estructurales y de la matriz extracelular. La erosión de la placa se caracteriza por la perdida de células endoteliales, inflamatorias, células musculares lisas espumosas y proteoglicanos.

En los estudios experimentales se ha visto que las estatinas estabilizan la placa de arteriosclerosis (Shiomi et al., 1995; Williams et al., 1998) en base a:

- Disminución de los lípidos extracelulares.
- Disminución de los macrófagos de la intima y de la media.
- Aumento del colágeno.
- Aumento de las células musculares lisas.
- Disminución de la calcificación y neovascularización de la intima.

Los tratamientos hipolipemiantes no sólo producen disminución del riesgo cardiovascular por la bajada de lípidos y alteración de la pared arterial (disfunción endotelial, aterogénesis, estabilidad de la placa), sino también, a través de sus efectos trombogénicos y efectos sobre las propiedades de flujo sanguíneo.

2.6.3.- MACRÓFAGOS

Los monocitos-macrófagos, están presentes desde el inicio de la lesión arteriosclerosa. Las LDL oxidadas junto a otros factores quimiotácticos atraen a los monocitos circulantes incorporándolos al subendotelio. Las células musculares lisas tras el estímulo de las LDL oxidadas producen diversas quimiocinas y moléculas de adhesión (MCP-1, IL-8, IP-10) que están reguladas por el factor de transcripción NF- κ B (Baeuerle et al., 1994; Barnes et al., 1997).

Un intenso tratamiento hipolipemiente con atorvastatina puede atenuar la activación de NF- κ B, la expresión de quimiocinas y el reclutamiento de monocitos como se ha comprobado en conejos y ratones. (Hernández-Presa et al., 1997; Liao et al., 1993).

La atorvastatina inhibe la activación de NF- κ B en monocitos y células musculares lisas en cultivo, lo que sugiere un posible mecanismo protector directo no mediado por la propia acción hipolipemiente (Ortega et al., 1997; Bustos et al., 1997).

Una vez en el espacio subendotelial, los monocitos proliferan y se diferencian a macrófagos que se acompañan de la expresión de receptores basurero o scavenger que a diferencia de los receptores normales de LDL, no son regulados a la baja por la presencia de altas concentraciones de colesterol intracelular por lo que los macrófagos captan gran cantidad de lipoproteínas modificadas, llegando a convertirse en células espumosas. Las estatinas pueden prevenir directamente la expresión de los scavenger y atenuar la formación de células espumosas (Umetani et al., 1996; Pietsh et al., 1996).

2.6.4.- CÉLULAS MUSCULARES LISAS

En los últimos estudios se ha demostrado que existen dos tipos de fenotipos de células musculares lisas: el fenotipo contráctil y el fenotipo secretor (Babaev et al., 1993; Frid et al, 1997; Sartore et al., 1997). En el adulto predomina el fenotipo contráctil que se encarga del mantenimiento del tono vascular mediante la secreción de sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras. Sin embargo en las lesiones arteriosclerosas, predomina el fenotipo secretor, capaz de sintetizar gran variedad de citocinas y factores de crecimiento por lo que juega un papel importante en la inflamación y proceso proliferativos de la lesión arteriosclerosa.

Junto con los macrófagos, las células musculares lisas son el principal componente celular de las lesiones de arteriosclerosis. Su número depende de la migración de la neoíntima, proliferación y de la muerte celular. En distintos modelos experimentales, las estatinas han mostrado una capacidad de atenuar la formación de neoíntima, independientemente de sus efectos hipolipemiantes, probablemente gracias a un efecto inhibitorio de la migración y proliferación de las células musculares lisas (Bustos et al., 1997; Bandoh et al., 1996; Auken et al., 1995; Guijarro et al., 1996), y posiblemente a través de la inhibición de la activación de NF- κ B antes mencionados.

La apoptosis o muerte celular, en las fases tardías de las lesiones arteriosclerosas, puede perjudicar a la estabilidad de la placa ya que la transforman en más vulnerable. Distintas sustancias antioxidantes y donadoras de óxido nítrico, se han comprobado para intentar disminuir dicha apoptosis (Guijarro et al., 1997). En cultivos celulares se ha comprobado que la atorvastatina puede modular la apoptosis de las células musculares lisas independiente de su efecto hipolipemiante.

2.6.5.- LDL Y ATEROTROMOGENESIS

Las LDL aumentadas son el mayor factor predisponente para la arteriosclerosis. Las LDL oxidadas disminuyen los vasodilatadores dependientes del endotelio, como las prostaciclina y el EDRF, induciendo una apoptosis en las células endoteliales vía activación de la proteasa CPP-32 y genera una respuesta inflamatoria. Las LDL oxidadas modifican la respuesta de las células musculares lisas (CML) a la ApoA-II (Nickenig et al., 1997).

Las LDL se correlacionan con los niveles de vitamina K y fibrinógeno aunque no se saben los mecanismos implicados (Woodward et al., 1997). Si las LDL disminuyen, los niveles de fibrinógeno, marcadores fibrinolíticos (activador del plasminógeno I), y activador tisular del plasminógeno están bajos. También interfieren en la síntesis plasmática de óxido nítrico (NO) (Pedrono et al., 1992; Chen et al., 1996). Son capaces de anular el efecto del NO incluso en ausencia de cambios anatómicos importantes en la pared (Drexler et al., 1991; Chin et al., 1992).

2.6.6.- FUNCIÓN ENDOTELIAL

El endotelio vascular desarrolla un gran número de funciones en el mantenimiento de la homeostasis vascular. Proporciona una superficie no trombogénica y no adherente para los leucocitos y contribuye al mantenimiento del tono vascular mediante el balance de producción de sustancias vasoconstrictoras (endotelinas y tromboxanos) y vasodilatadoras (prostaglandinas, óxido nítrico). En las fases iniciales de la arteriosclerosis, muchas de estas funciones se ven comprometidas.

La vasodilatación se deteriora en la hipercolesterolemia y en la arteriosclerosis ya que se disminuyen las sustancias vasodilatadoras dependientes del endotelio. En las arterias coronarias con arteriosclerosis, la bajada de colesterol con lovastatina y pravastatina producen una mejoría en la función endotelial, que se evidencia en la limitación de la vasoconstricción paradójica con acetilcolina (en las arterias no arterioscleróticas se produce una vasodilatación al administrar dichas sustancias) (Egashire et al., 1994; Treasure et al., 1995; Anderson et al., 1995). La mejoría del flujo sanguíneo coronario que se produce por el tratamiento con estatinas alivia transitoriamente la isquemia de los pacientes con ángor estable e infarto agudo de miocardio (Van Boven et al., 1996; Andrews et al., 1997; Eichstadt et al., 1995).

Parece que la mejoría de la disfunción endotelial producida por las estatinas es debida tanto a la bajada de las LDL-colesterol como a las propiedades antioxidantes.

2.6.7.- CONCEPTO DE ESTABILIDAD DE LA PLACA ARTERIOSCLEROSA

Las placas de arteriosclerosis pueden crecer progresivamente dando lugar a una disminución del flujo coronario de manera silente o provocar paulatinamente una angina de esfuerzo.

Las placas pueden crecer también, de manera súbita si se forma un trombo sobre ellas, dando lugar a eventos coronarios agudos como la angina inestable o el infarto agudo de miocardio.

La evidencia más clara de que los síndromes coronarios agudos tenían una fisiopatología diferente del crecimiento progresivo de la placa, surgió a partir de los estudios con fármacos hipolipemiantes, ya que se comprobó una reducción notable de los eventos coronarios agudos (unas diez veces) y sin embargo se conseguían unas reducciones del 10 al 20 % de la progresión de las placas de arteriosclerosis.

Hoy día sabemos que existen dos mecanismos que pueden causar trombosis de la placa coronaria. El más frecuente es la rotura de la cápsula entrando en contacto el material interno de la placa con los componentes de la sangre; pero también existe un mecanismo donde únicamente la erosión de la cápsula o cambios en la composición facilitan la formación de los trombos.

Las placas se componen de dos partes, el núcleo y la cápsula. La cápsula externa está formada por células musculares lisas y matriz extracelular. El componente fundamental que confiere resistencia a la placa es el colágeno tipo I. Se ha comprobado

que las cápsulas delgadas y con escaso contenido en colágeno son más propensas a la rotura (Falk et al., 1996; Burleigh et al., 1992).

Por tanto, una vez formada la lesión arteriosclerosa, todos aquellos fenómenos que reduzcan su contenido en colágeno, o disminuyan la presencia de células musculares lisas que son las que lo producen, debilitarán la cápsula y convertirán la placa en vulnerable y propensa a la ruptura.

2.6.8.- INFLAMACIÓN

Aunque en ocasiones la rotura de la placa se produce por la zona de mayor tensión de la cápsula, en muchas ocasiones se produce en zonas debilitadas por la presencia de inflamación.

Un paso temprano del desarrollo de la arteriosclerosis es la producción de una adhesión monocítica hacia el espacio subendotelial. Las LDL oxidadas se unen al receptor celular “scavenger” de los macrófagos derivados de los monocitos y contribuyen a la formación de células espumosas. Las citocinas segregadas por los macrófagos y los linfocitos T pueden modificar la función endotelial, proliferación de la CML, degradación del colágeno y trombosis (Warner et al., 1989; Amento et al., 1991; Vallance et al., 1997; Neumann et al., 1997). La disminución de los niveles de colesterol en los estudios experimentales, se acompaña de una disminución de las células inflamatorias en la placa (Shiomi et al., 1995; Williams et al., 1998; Padgett et al., 1992; Weber et al., 1997; Kimura et al., 1997; Kobashigawa et al., 1995).

La existencia de una reacción inflamatoria tiene un papel importante en la vulnerabilidad de la placa. Se ha visto que las placas complicadas presentan más infiltración de linfocitos T y células musculares lisas que las placas estables (Moreno et al., 1994; Van der Wal et al., 1994).

Se ha observado que en las placas inestables, los macrófagos sintetizan enzimas como la gelatinasa y la colagenasa que son capaces de degradar el colágeno de las cápsulas arteriosclerosas (Brown et al., 1995).

Dos tipos de moléculas intervienen fundamentalmente en la entrada de monocitos en la placa arteriosclerosa, las moléculas de adhesión (ICAM-1, E-selectina,

VCAM-1) y los factores quimiotácticos (MCP-1, M-CSF). El factor que más interés tiene es el MCP-1 ya que se ha demostrado su presencia en las lesiones arteriosclerosas humanas. En el modelo experimental de conejos se observó que la expresión de esta quimiocina era paralela a la infiltración de macrófagos que es regulada, al menos en parte, por el factor nuclear NF- κ B (Hérmendez-Presa et al., 1997).

También se ha demostrado que la atorvastatina disminuye la expresión de MCP-1, la infiltración de los macrófagos y la activación de NF- κ B en la placa arteriosclerosa. En principio la reducción del colesterol podría explicar la reducción del NF- κ B como varios autores han demostrado, aunque existe un posible efecto directo adicional sobre la placa de arteriosclerosis (Guijarro et al., 1997).

Para comprobar que sí existía efecto directo de la atorvastatina sobre la inflamación sin tener el efecto concomitante de la reducción de colesterol, se realizaron estudios in vitro con cultivos celulares con células musculares lisas. La atorvastatina inhibía la activación de NF- κ B y la expresión de MCP-1 inducida por diversas citocinas tanto en células musculares lisas como en monocitos (Bustos et al., 1997).

2.6.9.- EFECTOS DE LA COMPOSICIÓN DE LÍPIDOS EN LA ESTABILIDAD DE LA PLACA

El contenido relativo de ésteres de colesterol en la placa es un importante factor influyente en su estabilidad. Las estatinas inhiben la acumulación de ésteres de colesterol en el sistema monocito-macrófago al reducir la cantidad de colesterol libre que recoge la Acetil Colesterol Acil Transferasa (ACAT) o por la inhibición de la endocitosis de LDL relacionado con la síntesis reducida de mevalonato (Bernini et al., 1993). Dependiendo del tipo de estatina existe una inhibición dosis dependiente de la acumulación de colesterol en los macrófagos (Kempen et al., 1991). La reducción de LDL en sangre produce una variación en el tamaño de las plaquetas y en sus propiedades físico-químicas por alteración en los lípidos de la pared, que le imprimen una mayor estabilidad (Armstrong et al., 1970; Clarksson et al., 1981).

No todas las LDL son iguales en cuanto a su aterogenicidad, las LDL densas y pequeñas son más aterogénicas que las LDL grandes ligeras debido a que aumentan la susceptibilidad oxidativa y reducen la defensa antioxidativa (Degraaf et al., 1991; Navab et al., 1996). El diámetro de las partículas de las LDL es un predictor independiente del infarto agudo de miocardio (Gardner et al., 1996; Stampfer et al., 1996) y la densidad de las LDL mayor de 1.0378 ng/ml predice un beneficio en cuanto al riesgo coronario (Miller et al., 1996).

En los estudios realizados se ha visto que las estatinas no alteran el balance antioxidante tisular aunque sí aumentan la capacidad antioxidante total del plasma.

2.6.10.- PROLIFERACIÓN DE LAS CML Y SÍNTESIS DE COLÁGENO

Las CML nutren la estabilidad de la placa a través de las síntesis de macromoléculas que refuerzan la capa fibrosa y la absorción de energía transmitida a la pared de los vasos que disminuyen la contracción endotelial (Richardson et al., 1989; Cheng et al., 1993).

Después de la ulceración de la placa, el proceso reparativo normal requiere la proliferación de las CML. La CML regula la síntesis del colágeno intersticial que es estimulado por factores de crecimiento β y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, y es inhibido por γ -IFN (Amento et al., 1991).

La influencia de las estatinas en la proliferación de las CML ha sido evaluada en cultivos celulares de arteria femoral humana, miocitos de rata y en arteria carótida de conejos (Soma et al., 1993; Corsini et al., 1991; Negre-Aminoux et al., 1997). El daño de la arteria carótida mediante balón produce proliferación de la íntima que no es inhibida en conejos alimentados con placebo y con pravastatina; sin embargo sí era inhibida por otras estatinas, entre ellas atorvastatina (Soma et al., 1993; Negre-Aminoux et al., 1997).

En cultivos celulares, la mayoría de las estatinas (atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, simvastatina) excepto pravastatina inhiben la proliferación de las CML y la migración inducida por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y por el fibrinógeno (Corsini et al., 1991; Negre-Aminoux et al., 1997). La dosis que inhibía

dicha proliferación es comparable a la dosis sanguínea que se administra en humanos (Corsini et al., 1996).

2.6.11.- FACTORES TROMBÓTICOS

La respuesta trombogénica puede estar influenciada por la trombogenicidad de los componentes de la pared de la arteria, por la interacción de los componentes de la sangre con los lípidos, CML y proteoglicanos, propiedades del flujo sanguíneo y los factores de la coagulación. Los factores protrombóticos han sido evaluados con distintas estatinas.

La atorvastatina produce un aumento del fibrinógeno (Davidson et al., 1997; Marais et al., 1997; Wierzbicki et al., 1998) y un aumento del inhibidor de la activación del plasminógeno (Davidson et al., 1997).

2.6.12.- FACTORES TISULARES

El factor tisular y su correspondiente RNAm han sido localizados en macrófagos humanos de las placas de arteriosclerosis (Fernández-Ortiz et al., 1994). El factor tisular sirve de cofactor del factor VII plasmático y del receptor del factor VIIa y juega un papel importante como iniciador de la vía extrínseca de la coagulación (Nemerson, 1988). La vía extrínseca de la coagulación está contrabalanceada por un inhibidor de la proteasa denominado TEPI, que liga el factor Xa y este complejo inhibe el factor tisular y el complejo del factor VIIa (Broze, 1992; Sanders et al., 1985).

El TEPI circulante es transportado por la subespecie densa de las LDL, lipoproteína a y HDL (Lesnik et al., 1993). La activación del TEPI está aumentada en la hipercolesterolemia familiar heterocigota y el tipo IIa y IIb. Los niveles disminuidos de colesterol con simvastatina disminuyen las LDL y el TEPI pero sin producir cambios significativos en el factor VIIc (Sandset et al., 1991).

2.6.13.- AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Las plaquetas de los pacientes que tienen aumentadas las LDL son más sensibles a los agentes agregantes que las plaquetas de los normocolesterolémicos (Shepherd et al., 1995). Las LDL producen una acidificación intracelular a través de la inhibición del intercambio sodio / hidrogeniones en las plaquetas humanas, que hacen movilizar el calcio intracelular.

La simvastatina disminuye la agregación plaquetaria y el tromboxano después de 4 a 24 semanas de tratamiento, sin embargo la disminución de lípidos fue a las 2 semanas (Davi et al., 1989; Notarbartolo et al., 1995). La lovastatina también disminuye las plaquetas y la agregación de las plaquetas inducidas por ADP (Beigel et al., 1991; Mayer et al., 1992). La pravastatina normaliza la generación de la trombina de las plaquetas en sujetos hipercolesterolémicos, pero este efecto no se acompaña de cambios en la producción de prostaglandinas (Aoki et al., 1997). También disminuye el calcio intracelular y la agregación plaquetaria (Le Quan Sang et al., 1995).

En general las estatinas disminuyen la agregación plaquetaria por alterar el colesterol de las membranas de las plaquetas por lo que se modifica la fluidez de dichas membranas (Lesnik et al., 1993).

En un modelo experimental en que era activada la hemostasia primaria, los pacientes hipercolesterolémicos tratados con aspirina depositaban más agregados plaquetarios en aorta porcina que los normocolesterolémicos tratados con pravastatina (Lacoste et al., 1995).

2.7.- EFECTOS SECUNDARIOS DE LAS ESTATINAS

Las estatinas son generalmente bien toleradas y sus principales efectos secundarios son molestias gastrointestinales y elevaciones reversibles de las transaminasas.

Un efecto secundario importantes son las mialgias, en cuyo caso debería de monitorizarse el nivel de creatinfosfatoquinasa (CPK), ya que el riesgo de miopatía durante la monoterapia es del 0.1 %, aunque cuando se asocia a gemfibrozil es del 5% y del 28 % si se asocia a ciclosporina. La mayoría de los casos de miopatía (complicada a veces por rabdomiolisis) han sido descritos al asociar lovastatina o simvastatina a dosis altas con gemfribrozil, ciclosporina, ácido nicotínico, eritromicina, o en pacientes con colestasis.

La aparición de cataratas a dosis terapéuticas no ha sido demostrada en el hombre. Solamente se ha demostrado en el perro a dosis elevadas (Hunninghake et al., 1988).

Tampoco hay evidencia de que estos fármacos reduzcan significativamente los niveles plasmáticos de las hormonas sexuales ni de los corticoides. La respuesta de la corteza suprarrenal al estímulo con corticotropina (ACTH) se mantiene normal. Lo que sí disminuye es la concentración de ubiquinona aunque aún faltan estudios para confirmarlo.

En resumen, los inhibidores de la HMG-CoA reductasa constituyen la mayor novedad farmacológica en el campo de las hiperlipidemias y poseen una potencia hipocolesteremiante superior al resto de fármacos actualmente existentes. Sus indicaciones principales son las hipercolesterolemias graves primarias y, entre las secundarias, el síndrome nefrótico y la diabetes no insulino dependiente. Administradas a las dosis recomendadas, en monoterapia o en terapia combinada con resinas de intercambio, las estatinas muestran una tolerancia excelente y escasos efectos secundarios. Su seguridad a largo plazo sólo podría establecerse mediante su uso a lo largo de los próximos años así como su indicación cada vez más consolidada en la prevención de los eventos coronarios.

2.8.- BIOMODELO ANIMAL

La arteriosclerosis y sus consecuencias clínicas continúan siendo la principal causa de muerte en las sociedades desarrolladas (Sans et al., 1997). Dada la complejidad del desarrollo de la lesión arteriosclerótica en el hombre, resulta interesante experimentar en modelos animales en los que dicho desarrollo sea semejante al de la enfermedad humana (Ayala et al., 2000.)

Se han realizado diferentes estudios con las distintas estatinas que se han ido descubriendo.

La molécula de lovastatina ha sido estudiada en conejos hiperlipémicos (La Ville et al., 1989; Senaratne et al., 1991); en conejos de la raza New Zealand (Senaratne et al., 1991) observándose en los diferentes estudios una disminución en los niveles de colesterol respecto al grupo control. Así mismo se ha estudiado el efecto de la lovastatina en el perfil lipoproteico y la extensión de la lesiones de arteriosclerosis en hámsteres (Otto et al., 1995; Pitman et al., 1998). Otras moléculas del grupo de las estatinas se han estudiado también en conejos, como pravastatina (Khachadurian et al., 1991; Harsch et al., 1997); simvastatina (Dowell et al., 1995); fluvastatina (Shiomi et al., 1998) y cerivastatina (Shiomi et al., 1999).

Los estudios con atorvastatina han sido también numerosos y variados. En conejos con dieta aterogénica hay reducción del nivel de colesterol total del 38%, 45%, 54% a dosis de 1, 3, 10 mg/Kg/día (Auerbach et al., 1995). Hay una reducción del tamaño de la lesión iliofemoral en un 67% en el grupo de atorvastatina respecto a otros 3 inhibidores de la HMG-CoA reductasa (Bocan et al., 1994). Un estudio en 3 especies de animales (cobayas, ratas, conejos) ofreció los siguientes resultados con atorvastatina:

en cobayas la atorvastatina disminuyó los triglicéridos con diferencias significativas a dosis de 3, 10 y 30 mg/Kg; en conejos se produjo una disminución de colesterol de un 26 y 47% con dosis de atorvastatina de 12,5 y 25 mg/Kg y en ratas se obtuvo un descenso de los niveles de colesterol a dosis de 30 mg/Kg (Krause et al., 1995). En cerdos miniatura alimentados con una dieta aterogénica durante tres semanas con 0,1% de colesterol y 3 mg/Kg de atorvastatina, se consiguieron reducir los niveles de colesterol total en un 16% (Burnett et al., 1997). Recientemente se ha demostrado en monos una reducción de los niveles de colesterol sérico asociado a una disminución en los parámetros inflamatorios y a una mayor estabilidad de la placa de arteriosclerosis (Sukhova et al., 2002).

La inducción de arteriosclerosis en pollos ha sido estudiada desde mediados de siglo (Horlick et al., 1949). La aparición de esta patología en pollos se puede realizar de manera espontánea (Gupta et al., 1980; Orita et al., 1994) o bien inducirla con dietas ricas en colesterol (Horlick et al., 1949; Katz et al., 1953).

En la literatura encontramos estudios con otros animales, como conejos (Hadjiisky et al., 1991), si bien de manera espontánea estos animales padecen arteriosclerosis, son muy sensibles a dietas ricas en grasas produciéndose lesiones que se asemejan más a una xantomatosis que a una arteriosclerosis.

Otros animales estudiados han sido el mono y el cerdo (Hadjiisky et al., 1991), también desarrollan arteriosclerosis con dieta hiperlipémica si bien el coste y los problemas de alimentación hacen difícil su modelo en el laboratorio.

La elección del pollo como biomodelo de estudio de aterosclerosis se basa en los siguientes puntos, deducidos a partir de evidencias experimentales:

- a) animal que consume sin problemas dietas variadas.
- b) barato y de fácil manejo para la investigación prolongada.
- c) capaz de desarrollar arteriosclerosis espontánea.
- d) capaz de desarrollar arteriosclerosis con dietas hipercolesterolémicas con un ligero pero significativo incremento del colesterol plasmático (116-247 mg/dL en animales de experimentación frente a 68-142 mg/dL en controles)
- e) los niveles plasmáticos de colesterol (68-142 mg/dL) y triglicéridos (70-110 mg/dL) son similares a los de humanos (colesterol < 190 mg/dL; triglicéridos < 160 mg/dL)
- f) la composición de las lipoproteínas HDL (80-115 mg/dL) y LDL (10-25 mg/dL) es similar a la de humanos. (HDL > 40 mg/dL y LDL < 145 mg/dL)
- g) no hay diferencias entre las lesiones desarrolladas en pollos y las de humanos (Wong, 1975).

A esto se podría añadir el menor tiempo necesario para la regresión de las lesiones y el que en esta especie nos encontramos con dos mutaciones interesantes como el déficit de receptores para VLDL (Bujo et al, 1995) y un déficit de HDL (Poernama et al., 1990).

La variedad White Leghorn es la más usada en la mayoría de estudios (Ayala et al., 2005).

Se han desarrollado diferentes métodos experimentales para la demostración de los efectos aterogénicos en pollos:

- 1) Estudios en animales intactos, siendo los más utilizados. Se pueden estudiar características morfométricas y bioquímicas de las lesiones ateromatosas, la respuesta de reparación frente a diferentes agresiones. También se pueden evaluar factores de riesgo como niveles de lipoproteínas, presión arterial y medir la permeabilidad endotelial a marcadores de macromoléculas inyectados.

Los ateromas desarrollados pueden ser por agresiones a todo el vaso como en casos de dietas ricas en colesterol, pollos con alteraciones genéticas que desarrollan hipercolesterolemia endógena e hipertensión (estudios de no denudación), o por estímulos que afecten a zonas concretas de los vasos, por ejemplo estímulos térmicos, mecánicos, etc... (estudios de denudación o injuria vascular)

- 1.1) Estudios en animales intactos sin denudación. En los cuales el desarrollo de la enfermedad se produce por dietas ricas en colesterol, pollos con alteraciones genéticas,...

- 1.1.1) Estudios de progresión. Consiste en provocar la enfermedad y al mismo tiempo aplicar un tratamiento para influir en el desarrollo de la enfermedad (Valdés et al., 1976; Reinis et al., 1976; Wong et al., 1987).

- 1.1.2) Estudios de regresión. Consiste en intentar revertir la enfermedad una vez provocada (Hernández-Espinosa et al., 2006; Adanez et al., 2008).

- 1.2) Estudios en animales intactos con denudación. Se realizan ensayos e investigación de las capacidades técnicas de los nuevos mecanismos

intervencionistas, diseñados para recanalizar arterias, ya que la aorta abdominal del pollo es tortuosa y muscular como las coronarias humanas (Lucas et al., 1996).

1.3) Estudios en animales intactos y determinación de factores de riesgo. Varios estudios demuestran una correlación inversa entre la concentración de HDL y la incidencia de enfermedad cardiovascular. Una asociación similar se ha visto con la Apo A-I (Badimon et al., 1990).

Hormonas, vitamina D, calcio y monóxido de carbono aumentan la progresión de la arteriosclerosis, mientras que el ejercicio y el aceite de pescado la disminuyen.

- 2) Estudios en arterias aisladas. Son menos utilizados, pero muy útiles para observar el funcionamiento del endotelio y la permeabilidad endotelial en arterias perfundidas (Aksulu et al., 1986; Hasegawa et al., 199; Villamor et al., 2002).
- 3) Estudios en cultivos celulares. Contribuyen al estudio complementario de la etiología y tratamiento de la arterioesclerosis. En pollos debemos reseñar los cultivos de células infectadas con virus herpes de la enfermedad de Marek, demostrándose la presencia de cristales de colesterol en estas células (Fabricant et al., 1999).
- 4) Aféresis. Procedimiento que consiste en la eliminación de los lípidos del plasma sin afectar a las lipoproteínas, parámetros bioquímicos o hematológicos. Efectiva en el tratamiento de la regresión de la arteriosclerosis en pollo, vaca y cerdo (Kostner et al., 1997).

Para la inducción de aterogenesis experimental en el pollo resulta más conveniente el uso de colesterol puro añadido a una dieta estándar que la mezcla a base de huevo. Para facilitar la absorción de colesterol a nivel digestivo debe utilizarse un vehículo como el aceite de palma líquido. Esta mezcla debe suministrarse ad libitum (Ayala et al., 2004).

2.9.- APORTACIONES DE NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN EL BIOMODELO EXPERIMENTAL AVIAR

En el año 2005 iniciamos en nuestro grupo de investigación el estudio de la arteriosclerosis en el biomodelo aviar, aunque las primeras investigaciones sobre la arteriosclerosis experimental aparecen 100 años antes. El pollo es un buen animal de estudio ya que presenta niveles lipídicos muy parecidos a los humanos y desarrolla la enfermedad de forma espontánea o inducida a través de dietas ricas en colesterol (estimuladas por hormonas o vitamina D), lesiones vasculares o infecciones (principalmente por enfermedad de Marek) de manera muy similar al hombre (Ayala et al., 2005).

Se ha estudiado en este biomodelo diferentes marcadores relacionados con la arteriosclerosis. La antitrombina es una proteína hepática con propiedades anticoagulantes y anti-inflamatorias. Su flexibilidad estructural permite modificaciones genéticas y post-traduccionales; las mutaciones y factores ambientales también pueden alterar esta proteína. En nuestro grupo de investigación se ha utilizado como indicador del efecto de las dietas hiperlipémicas, en el estudio llevado a cabo en el 2006 se comprobó tras un periodo de 6 meses de dieta hiperlipémica una significativa retención y agregación a nivel hepático de la molécula de antitrombina. Como consecuencia se observa una disminución en la actividad de la antitrombina circulante de casi un 50%. En este estudio se pudo comprobar como la utilización de atorvastatina produjo un efecto protector sobre el hígado (Hernández-Espinosa et al., 2006).

En el caso de las alteraciones renales en este modelo animal, también se ha comprobado el efecto protector de la atorvastatina. Se estudió el efecto del colesterol

plasmático y los triglicéridos sobre el riñón. Se dividieron los animales en 5 grupos, grupo A (dieta normal), grupo B (dieta hiperlipémica durante 6 meses), grupo C (dieta hiperlipémica durante 3 meses y regresión con dieta normal durante otros 3 meses), grupo D (dieta hiperlipémica durante 3 meses y regresión con dieta normal más atorvastatina durante otros 3 meses) y grupo E (dieta hiperlipémica durante 6 meses y atorvastatina durante los últimos 3 meses). Se realizó un estudio inmunohistoquímico para ver el daño renal, los grupos B y C fueron los más afectados, siendo el grupo B el que desarrolló más patología a nivel renal. El grupo D presentó los valores menores de lípidos en sangre y como consecuencia menor daño renal. La atorvastatina junto con la dieta pueden ayudar revertir el daño renal (Adanez et al., 2008).

El pollo puede ser también modelo para el estudio de la esteatohepatitis no-alcohólica, esta patología está dentro del grupo de enfermedades grasas del hígado de naturaleza no-alcohólica. Ya que el estudio de los factores que envuelven a esta enfermedad en humanos es difícil, los estudios en modelos animales permiten un mayor conocimiento de la patogénesis de la esteatohepatitis. Se estudió el efecto de la dieta en los marcadores sanguíneos lipídicos, en las enzimas hepáticas y en la histopatología hepática, para ello se utilizaron dos grupos de animales, uno con dieta normal y otro con dieta hiperlipémica. Se observaron diferencias significativas en los marcadores sanguíneos, los depósitos de grasa y en la forma de los hepatocitos. En los parámetros indicadores de infiltración inflamatoria también se encontraron diferencias significativas (Ayala et al., 2009). Como se ha podido comprobar posteriormente, la combinación de atorvastatina y dieta estándar en estos animales, produce una disminución en la patogenia de la esteatohepatitis no-alcohólica, reduciendo el nivel de esteatosis hepática, de inflamación y de daño celular (Martín-Castillo et al., 2010).

Siguiendo con el estudio de las alteraciones hepáticas, se ha realizado un estudio para evaluar una técnica no-invasiva, como sería la obtención de imágenes a través de impulsos de radiación acústica, para evaluar el grado de esteatosis en el hígado del pollo, nuestro biomodelo animal. La comparación se realiza entre animales con dieta estándar y animales con dieta hiperlipémica, comprobándose que existe una relación entre la velocidad de onda corta y el análisis semicuantitativo histológico de esteatosis. (Guzmán Aroca et al., 2010)

Materiales y métodos

3.1.- MATERIAL.

Los materiales y productos utilizados para la realización del presente trabajo, se relacionan a continuación:

3.1.1.- MATERIAL FUNGIBLE.

- Agujas hipodérmicas.
- Cánulas intravenosas INSYTE[®] (22G x 1, 0,8 x 25mm).
- Jeringuillas de 2 mL recubiertas con 75 USP de heparina sódica.
- Tubos de ensayo de varias capacidades.
- Micropipetas de varias capacidades Gilson[®].
- Puntas para micropipetas de varias capacidades
- Pipeta repetidora HandyStep[®].
- Puntas de desplazamiento directo codificadas de varias capacidades Plastibrand[®].
- Matraces aforados de varias capacidades.
- Matraces Erlemmeyer de varias capacidades.
- Placas de Petri de 10 cm de diámetro.
- Placas de poli-estireno de 96 celdillas.
- Vasos de precipitado de varias capacidades.
- Viales con tapón para autoinyector 8 x 40, 1 mL, Wheaton, USA.
- Filtros Millipore[®] tipo HV 0.45 µm de diámetro de poro.

- Tubos Eppendorf 1,5 y 2 mL.

3.1.2.- PRODUCTOS Y REACTIVOS.

- Agua bidestilada.
- Fosfato monosódico (Lote: 438397/1, Fluka, Madrid).
- Fosfato disódico (Lote: 1341318, Fluka, Madrid).
- Heparina sódica 5% (Lote: C-203, Mayne Pharma, España).
- Acetonitrilo HPLC (Lote: 08Z4118, VWR Prolabo International, EC).
- Agua para HPLC (Lote: 08I090505, VWR Prolabo International, EC).
- Metanol para HPLC (Lote: 08Z3169, VWR Prolabo International, EC).
- Atorvastatina (Lote: 0710254, Pfizer, Madrid).

3.1.3.- INSTRUMENTAL.

- Agitador magnético SBS A-06.
- Agitador de tubos Heidolph Reax 2000.
- Balanza de precisión Sartorius BP121S, pesada entre 0.0001 y 120 g.
- Centrífuga ALC modelo 4236.
- Congelador Sanyo MDF (- 45 °C).
- Sonicador Branson 2200.
- Frigorífico Electrolux[®] modelo ER 3818C.
- Neveras portátiles isotérmicas.

- Horno microondas Goldstart, modelo MA-894DD.
- Ordenador personal Pentium IV.
- pHmetro Crison Digit 501.
- Termómetro de mercurio.
- HPLC compuesto de:
 - Bomba cuaternaria modelo LC-10Asvp (Shimadzu).
 - Detector de UV de modelo Gilson 305 (Gilson).
 - Autoinyector modelo SIL-10Advp (Shimadzu), con refrigeración por sistema Peltier.
 - Desgasificador DGU 14A (Shimadzu).
 - Módulo mezclador FCV-10AL-VP (Shimadzu).
 - Horno para columnas CTO-10 ASvp (Shimadzu) con rango de temperaturas 4-80° C.
 - PC con el programa Shimadzu Class-VP Chromatography Data System.
 - Columnas Nucleosil 100 -5 µm C₁₈, 15 cm x 4,6 mm (Supelco, Bellefonte, USA).
 - Precolumnas con la misma composición que la columna.

3.1.4.- SOFTWARE INFORMÁTICO.

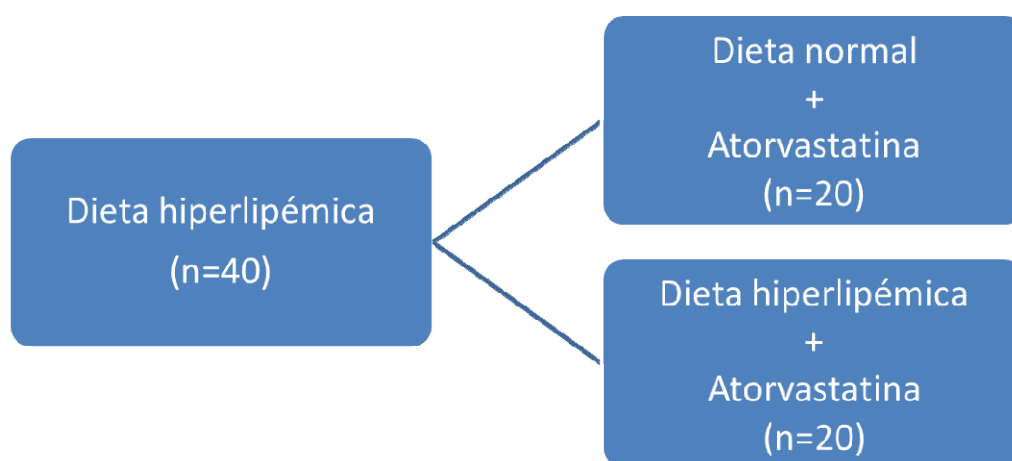
- Programa de Análisis Farmacocinético Winnonlin Professional® 5.0.
- Programa de análisis farmacocinético MULTIFIT® (PROOST, 1997).
- Paquete de análisis estadístico SPSS® versión 12.0.1, Chicago, 2003.
- Paquete de análisis estadístico STATGRAPHICS Plus® (versión 5) Manugistics, Inc., Rockville, USA.
- Programa de gráficos PRISM® 3.0. para WINDOWS (GRAPHPAD SOFT. INC.).
- Procesador de textos Microsoft® Word 2003 y Hoja de cálculo Microsoft® Excel 2003.

3.2.- ESTUDIO MATRIZ DE EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ATORVASTATINA EN UN BIOMODELO ANIMAL DEL POLLO

El presente estudio forma parte de un amplio estudio de evaluación del efecto de la atorvastatina en un biomodelo animal del pollo al que se le induce la enfermedad mediante una dieta hiperlipémica utilizando para ello los marcadores lipídicos sanguíneos, en el que se utilizaron 40 pollos. Estos animales fueron sometidos a una primera fase de inducción del hígado graso mediante la administración de dieta compuesta por pienso estándar más colesterol puro (2% del total de la mezcla) y 20% del total de aceites saturados (aceite de palma crudo) durante tres meses.

20 animales constituyeron un grupo de regresión, se les administró en una segunda fase atorvastatina durante un periodo de tres meses y se les sustituyó la dieta grasa por otra normal.

Los otros 20 animales fueron un grupo de progresión, se les mantuvo la dieta grasa y se les administró atorvastatina durante tres meses.



3.3.- ANIMALES Y DIETA

Para el estudio farmacocinético de atorvastatina realizado en esta tesis se han utilizado 6 pollos extraídos al azar de la raza White Leghorn, progenitores Broilers, correspondientes al grupo A (grupo control normal, compuesto por 20 animales que recibieron una dieta normal durante seis meses) del estudio matriz, con pesos comprendidos entre los 3-3.2 kg. Todos los animales se encontraban en buen estado de salud, y no recibieron ningún tratamiento farmacológico antes del inicio de la experiencia.

Tanto las jaulas de los animales como los procedimientos de sacrificio se ajustaron a la legislación vigente en materia de bienestar y experimentación animal y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia.

La dieta del grupo A consistía en una dieta simple para engorde-puesta constituida por cereales (maíz y cebada).

Esta mezcla ya iba enriquecida con vitaminas y minerales a razón de 4 Kg/TM de pienso para progenitores Broilers, cuya composición por Kg es: Vitamina A, 3.000.000 U; D₃, 750.000 U; E, 12.500 mg; B₁, 1 gr; B₂, 3,75 gr; B₁₂, 12,5 mg; B₆, 1,25 gr; ácido pantoténico, 5 gr; ácido nicotínico, 12,5 gr; biotina, 75 mg; K₃, 1,5 gr; ácido fólico, 750 mg; manganeso, 30 gr; zinc, 27,5 gr; hierro, 12,5 gr; cobre, 3,75 gr; yodo, 750 mg; selenio, 75 mg; cobalto, 150 mg; molibdeno, 250 mg; excipiente c.s.p., 1000 g.

La dieta del grupo B consistía en una dieta compuesta por pienso estándar más colesterol puro (2% del total de la mezcla) y 20% del total de aceites saturados (aceite de palma crudo) durante tres meses.

3.4.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

El fármaco hipocolesterolemizante utilizado en este estudio, atorvastatina (Pfizer, Madrid, España), se administró a una dosis única de 3 mg/kg por vía oral (OR) e intravenosa (IV).

Las muestras de sangre se recogieron de la vena metatarsal medial a los siguientes tiempos: 0 (blanco), 0.25, 0.50, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 32, 48 y 72 horas desde la administración oral del fármaco. Las muestras de sangre fueron centrifugadas

inmediatamente a 1500g durante 10 minutos para separar el plasma. Una vez separado, éste se congeló por duplicado a - 45°C, dentro de los treinta minutos siguientes a la extracción, hasta el momento de realizar las determinaciones analíticas.

3.5.- TÉCNICAS ANALÍTICAS.

La determinación de las concentraciones en plasma de atorvastatina fue realizada mediante un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección ultra-violeta (UV) de acuerdo con el método descrito por Fernández-Varón y cols. (2005) para atorvastatina modificado.

El procesamiento de las muestras fue el que se detalla a continuación: en un tubo eppendorf con 300 µL de plasma se añaden 300 µL de acetonitrilo, que hace que las proteínas precipiten. Posteriormente, son sometidas a agitación en un baño de ultrasonidos seguido de centrifugación durante 10 min a 3000 rpm. Del sobrenadante se extraen 100 µL y se transfiere a los viales del autoinyector del HPLC.

La separación se llevó a cabo utilizando una columna de fase Nucleosil C8 125 x 4 mm, 5 µm de diámetro de partícula, con un volumen de inyección de 100 µL. Tanto las muestras dentro del autoinyector (sistema Peltier), como la columna fueron termostatizadas a 24°C. La fase móvil estaba compuesta por acetonitrilo (40%) y de tampón fosfato (pH=5,5) (60%). La velocidad de flujo de la misma fue de 1,0 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 247 nm.

3.6.- VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA.

Las curvas de calibrado se prepararon con 7 concentraciones diferentes de atorvastatina entre 2.5 y 250 µg/mL usando blancos de plasma. Las curvas estándar o patrón se obtuvieron por regresión lineal del área de los picos obtenidos frente a concentraciones conocidas de atorvastatina. Cada punto se estableció de un promedio de tres determinaciones. El coeficiente de correlación (r) fue siempre > 0,99% para todas las curvas de calibrado.

Las soluciones estándar de atorvastatina se prepararon mediante diluciones seriadas (metanol) hasta alcanzar concentraciones finales de 2.5, 5, 12.5, 25, 50, 100 y 250µg/mL, a partir de una disolución madre de partida de 1000 µg/mL. Las alícuotas de plasma se almacenaron a - 45°C hasta su procesamiento.

Las alícuotas de los estándares, controles y muestras fueron procesadas como se describió anteriormente y se inyectaron 100 µL en el sistema cromatográfico.

Los porcentajes de recuperación se determinaron comparando las áreas de los picos de los controles con distintas concentraciones de fármaco (concretamente a 5, 50 y 250 µg/mL), con las áreas de los picos de los estándares a las concentraciones correspondientes preparadas con tampón fosfato. Cada punto se establece a partir de un promedio de tres determinaciones. Los porcentajes de recuperación de atorvastatina, se muestran a continuación:

CONCENTRACIÓN (µg/mL)		Recuperación (%) Atorvastatina
PLASMA	5	89,35
	50	93,66
	250	97,54

La precisión del ensayo se evaluó expresando la desviación estándar relativa (RDS) como un porcentaje del valor medio. La precisión intra-día se estimó mediante el análisis, en el mismo día, de tres muestras de plasma repetidas de tres concentraciones estándar (5, 50 y 250 µg/mL) usadas para las curvas de calibrado, obteniéndose valores de RSD < 4% para atorvastatina. La precisión inter-día se estimó mediante el análisis de tres concentraciones estándar (5, 50 y 250 µg/mL) durante tres días consecutivos. Los resultados de precisión expresados como RSD fueron < 8%.

El límite de detección de atorvastatina en plasma se ha establecido para la concentración más baja que se ha podido detectar diferenciándola del ruido de fondo del aparato. El límite de cuantificación se ha establecido para el nivel de concentración más bajo utilizado en las curvas de calibrado y para el que el RSD es menor al 20%. El

límite de detección en plasma fue de 2.5 µg/mL. En cuanto al límite de cuantificación, en plasma fue de 2.5 µg/mL.

3.7.- ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO.

3.7.1.- ANÁLISIS COMPARTIMENTAL.

Una vez obtenidas las concentraciones de atorvastatina en plasma a los diferentes tiempos de extracción tras la administración, se han ajustado los datos a las ecuaciones mono- y biexponenciales mediante el programa WinNonlin Professional® (versión 5.0) y el programa MULTIFIT, propuesto por Proost (1997), y basado en Yamaoka y cols. (1981). Los ajustes se han realizado empleando varios criterios de ponderación.

Una vez realizados los ajustes a los diferentes modelos farmacocinéticos, el criterio utilizado para determinar cuál era la ecuación que mejor se ajustaba a los datos observados fue el Criterio de Información de Akaike ó AIC (Yamaoka y cols., 1978), cuya expresión es:

$$AIC = N \cdot \ln \left[\sum_{i=1}^N W_i \cdot (C_i' - C_i)^2 \right] + 2 \cdot p$$

Donde N es el número de puntos experimentales y p el número de parámetros del modelo en cuestión. La expresión contenida entre corchetes corresponde a la suma de cuadrados residuales, donde C_i es la concentración obtenida experimentalmente, C_i' es la concentración teórica obtenida a partir de la ecuación correspondiente a ese modelo, hallada utilizando el método de los mínimos cuadrados y W_i es el factor de ponderación. El modelo con el valor mínimo de AIC se considera el óptimo.

3.7.2.- ANÁLISIS NO COMPARTIMENTAL.

Los parámetros no compartimentales se calcularon de acuerdo con la teoría de los momentos estadísticos (Riegelman y Collier, 1980; Gibaldi y Perrier, 1982), utilizando el programa informático WinNonlin Professional[®] (versión 5.0).

3.8.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

En este estudio se han realizado una serie de estudios estadísticos con el fin de obtener datos estadísticos de interés, más importantes y de evaluar la homogeneidad de los datos utilizados.

Se calcularon los siguientes parámetros estadísticos de centralización: media, desviación estándar (SD), coeficiente de variación (CV) y error típico (SE)

Para verificar la homogeneidad de las distintas concentraciones obtenidas para cada tiempo de extracción, se ha utilizado el test de KOLMOGOROV-SMIRNOV, mediante el cual se ha comprobado el ajuste de dichas concentraciones a la distribución normal. También se ha utilizado esta prueba para verificar la existencia o no de diferencias entre los valores de los distintos parámetros farmacocinéticos obtenidos para un mismo modelo de ajuste. Para este análisis, se ha utilizado software estadístico SPSS[®] versión 12.0.1, 2003 (Chicago, USA),

Para detectar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros farmacocinéticos obtenidos entre los grupos de animales. Para este análisis, se ha utilizado software estadístico STATGRAPHICS Plus (5.0, Chicago, USA).

Resultados

4.1.- ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE ATORVASTATINA AL GRUPO A (GRUPO CONTROL NORMAL).

Los valores de concentración plasmática de atorvastatina obtenidos tras la administración intravenosa de una dosis de 3 mg/Kg, se reflejan en la Tabla 1.

Tiempo	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Pollo 4	Pollo 5	Pollo 6	X
0.083 h	41,03	29,36	35,66	24,56	36,45	40,27	34,56
0.16 h	27,10	31,25	22,35	20,78	32,68	36,98	28,52
0.25 h	25,94	26,74	21,65	18,54	28,12	31,47	25,41
0.50 h	20,64	18,25	23,54	17,65	22,89	26,88	21,64
1.00 h	17,69	16,36	21,44	15,66	17,01	20,33	18,08
1.50 h	9,88	8,21	11,36	10,02	10,03	14,97	10,75
2.00 h	8,04	6,97	8,21	7,93	8,55	10,28	8,33
4.00 h	5,25	5,74	4,87	7,10	6,97	7,45	6,23
6.00 h	3,91	4,56	3,99	5,21	5,02	5,33	4,67
8.00 h	2,14	2,71	2,56	4,10	1,98	2,91	2,73
10.00 h	1,25	0,99	0,67	2,97	1,10	2,06	1,51
24.00 h	0,79	0,52	0,59	1,25	0,39	1,34	0,81
32.00 h	0,12	0,40	0,39	1,08	0,26	0,41	0,44
48.00 h	0,00	0,13	0,28	0,00	0,00	0,13	0,09

TABLA 1.- Concentraciones plasmáticas experimentales de atorvastatina en $\mu\text{g/mL}$, en cada pollo tras la administración intravenosa de una dosis de 10 mg.

En ella se observa cómo, en cada uno de los animales una disminución de las concentraciones a lo largo del tiempo, llegando a ser indetectado en sangre la atorvastatina tras 48 horas.

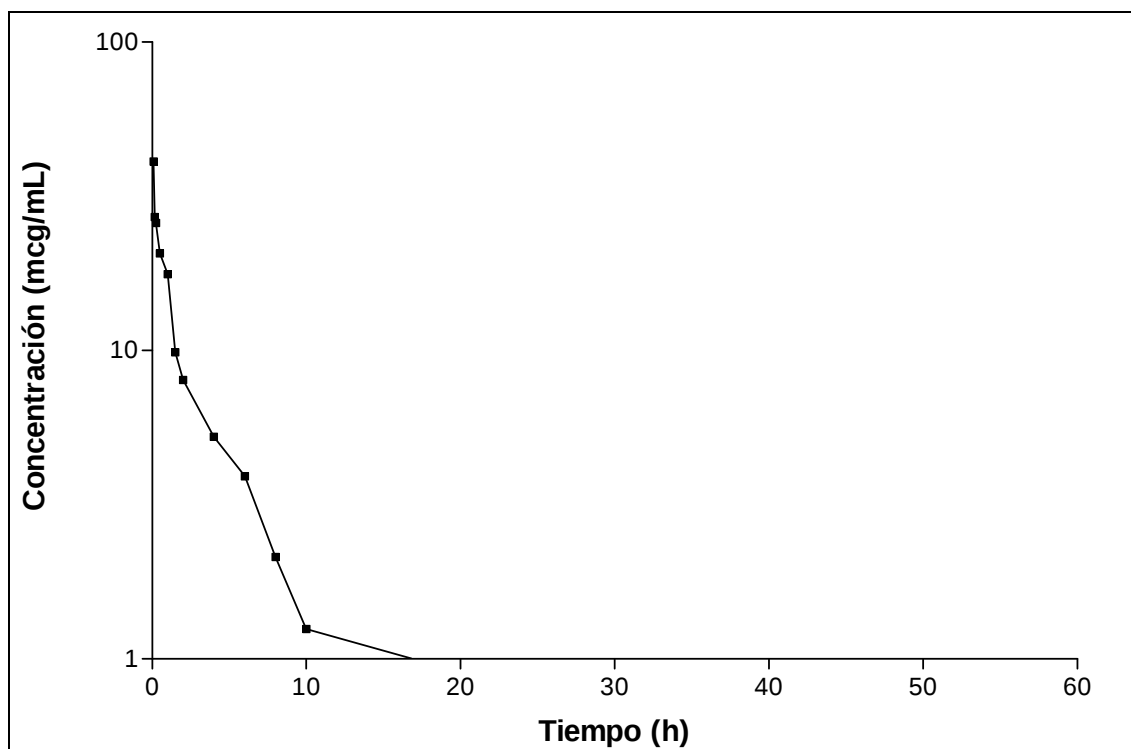


Gráfico 1.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía intravenosa al pollo 1.

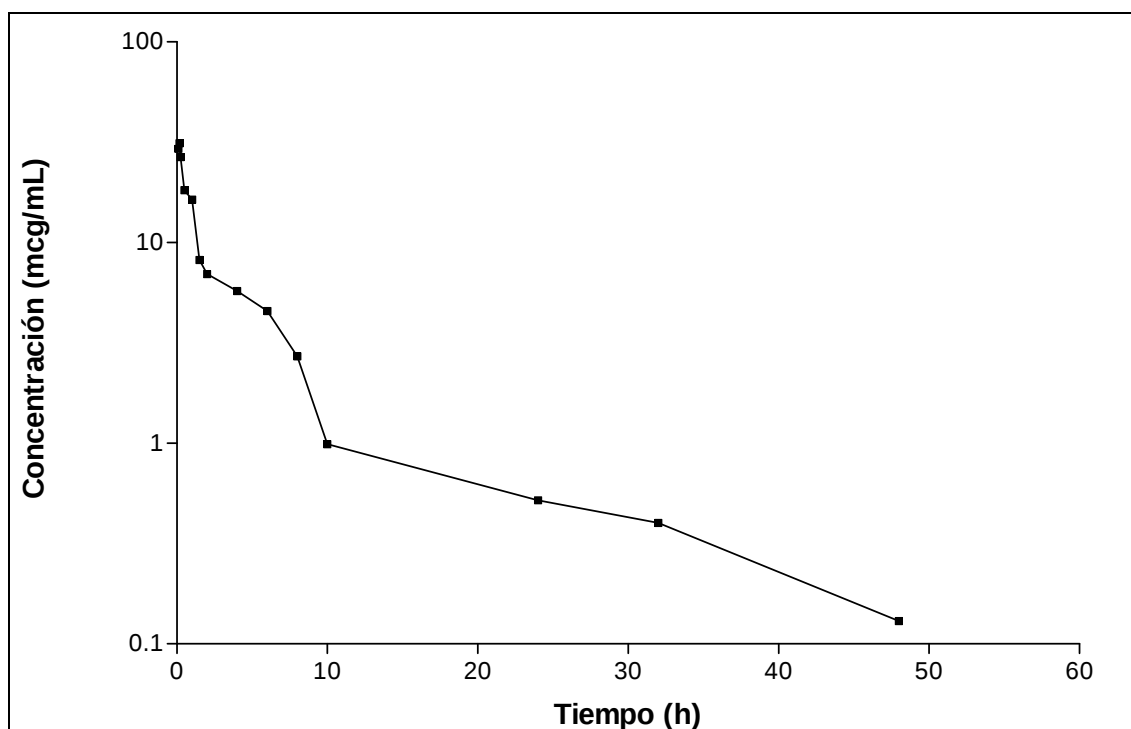


Gráfico 2.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía intravenosa al pollo 2.

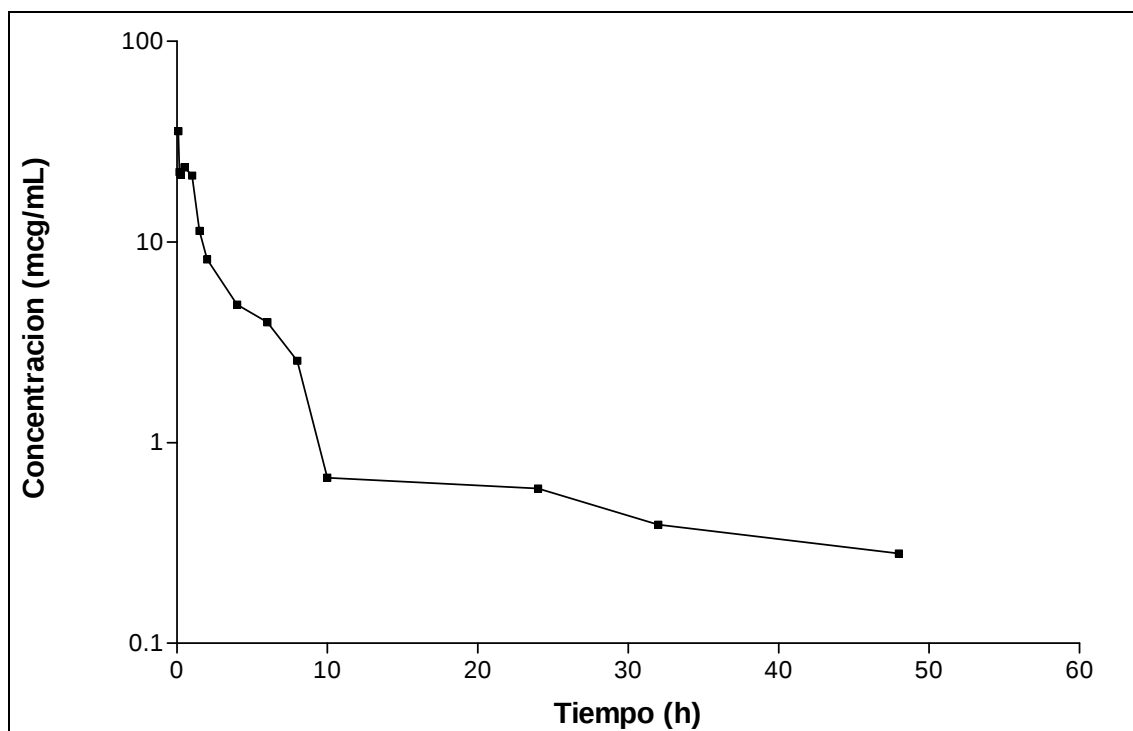


Gráfico 3.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía intravenosa al pollo 3.

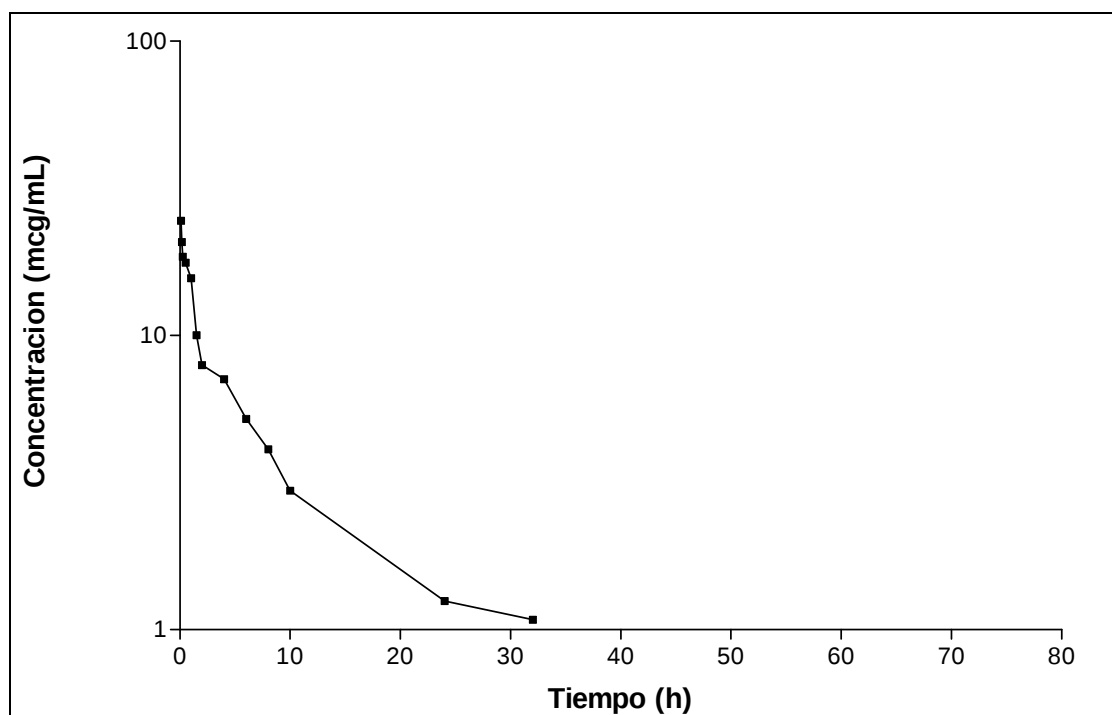


Gráfico 4.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía intravenosa al pollo 4.

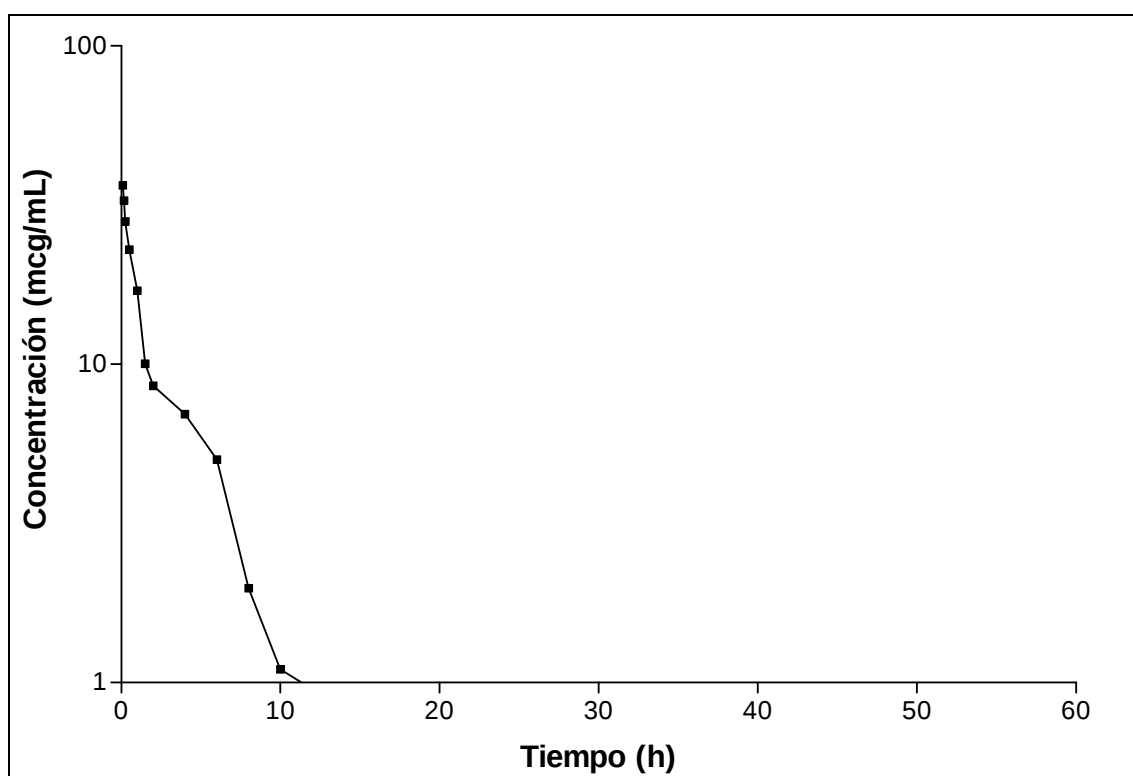


Gráfico 5.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía intravenosa al pollo 5.

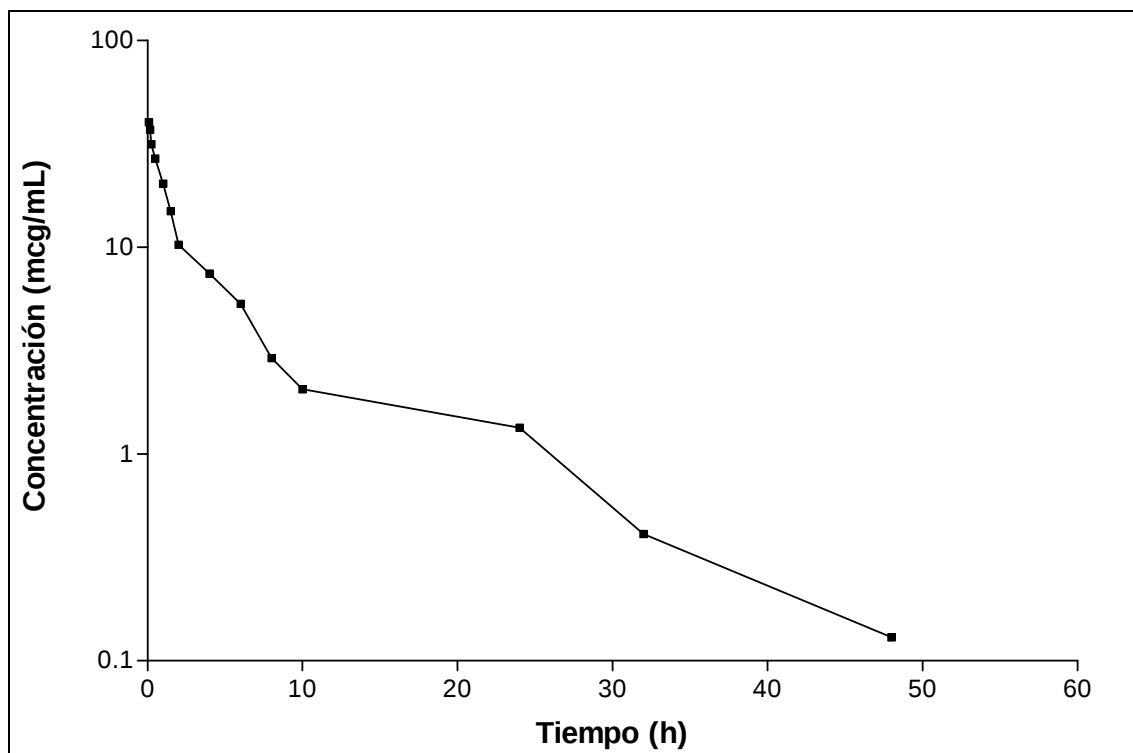


Gráfico 6.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía intravenosa al pollo 6.

Los valores medios de las concentraciones plasmáticas de atorvastatina, junto con los estadísticos de desviación, se presentan en la Tabla 2

Tiempo	N	MEDIA	S.D.	S.E.	C.V.
0.083 h	6	34,56	6,42	2,61	18,59
0.16 h	6	28,52	6,27	2,56	21,97
0.25 h	6	25,41	4,64	1,89	18,24
0.50 h	6	21,64	3,49	1,42	16,15
1.00 h	6	18,08	2,30	0,94	12,72
1.50 h	6	10,75	2,30	0,94	21,40
2.00 h	6	8,33	1,09	0,44	13,11
4.00 h	6	6,23	1,08	0,44	17,35
6.00 h	6	4,67	0,62	0,25	13,21
8.00 h	6	2,73	0,75	0,31	27,62
10.00 h	6	1,51	0,85	0,35	56,67
24.00 h	6	0,81	0,40	0,16	48,68
32.00 h	6	0,44	0,33	0,13	74,77
48.00 h	6	0,09	0,11	0,04	125,31

TABLA 2.- Estadísticos de las concentraciones plasmáticas experimentales de atorvastatina tras la administración de una dosis intravenosa de 10 mg a pollos.

Con respecto al coeficiente de variación, Wagner (1968) indica que, en los ensayos farmacocinéticos, cuando los valores de concentración plasmática se distribuyen normalmente, los coeficientes de variación que se obtienen, oscilan entre el 25% y 75%. Además, establece que el número de animales idóneo a utilizar en estos estudios debe estar comprendido entre 5 y 20. Como se puede observar en la Tabla 12, hemos obtenido valores por debajo del 75% excepto en el valor de la extracción a las 48 horas.

En el gráfico 7 se representan los valores medios (media $\pm$ SD) de las concentraciones plasmáticas de atorvastatina a los distintos tiempos de extracción.

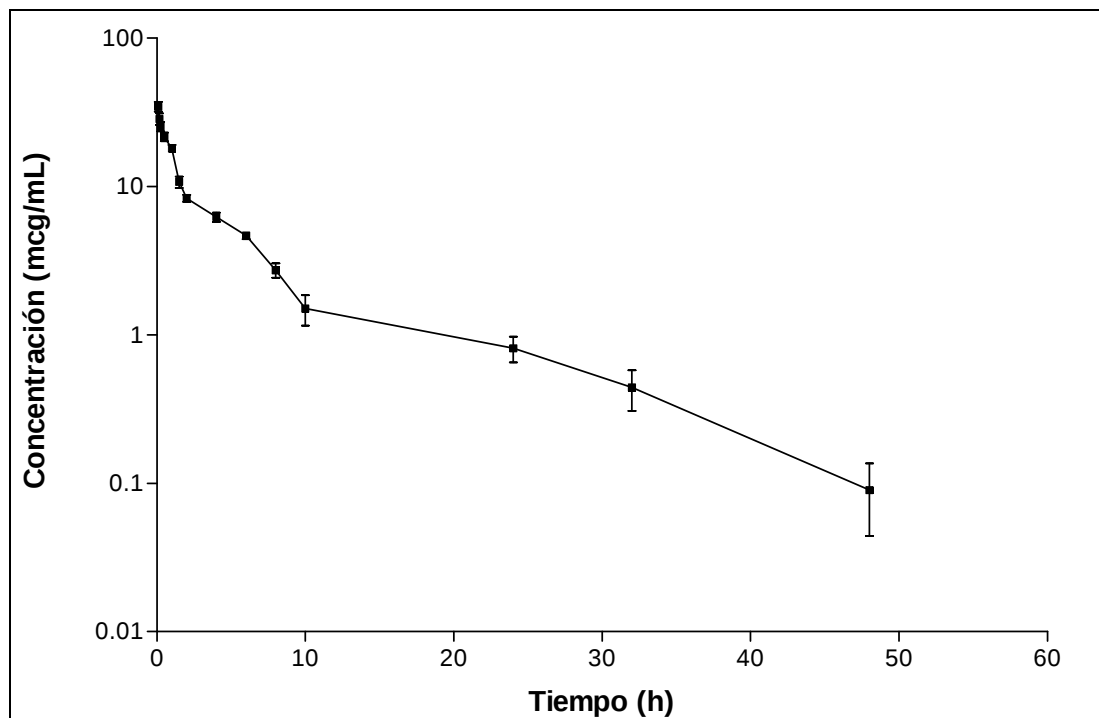


Gráfico 7.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales ($\pm$ SD) de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía intravenosa.

Para comprobar la homogeneidad de los datos, se ha realizado el test de KOLMOGOROV-SMIRNOV entre todos los valores de concentración plasmática de atorvastatina, obtenidos en los diferentes animales para un mismo tiempo de extracción. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 3.

Tiempo	N.S.
0.083 h	0,24
0.16 h	0,26
0.25 h	0,23
0.50 h	0,23
1.00 h	0,19
1.50 h	0,26
2.00 h	0,24
4.00 h	0,29
6.00 h	0,20
8.00 h	0,22
10.00 h	0,27
24.00 h	0,21
32.00 h	0,18
48.00 h	0,30

TABLA 3.- Test de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la distribución normal de las concentraciones plasmáticas de atorvastatina, obtenidas para un mismo tiempo tras su administración intravenosa a pollos.

Por otro lado, se realizó un test de Mann-Whitney (Tabla 4) para conocer si existían diferencias entre los animales.

Pollos	U MANN-WITHNEY	N.S.
P1-P2	86,30	0,68
P1-P3	77,64	0,12
P1-P4	65,21	0,31
P1-P5	35,87	0,08
P1-P6	68,00	0,15
P2-P3	57,98	0,58
P2-P4	74,25	0,42
P2-P5	52,97	0,14
P2-P6	53,56	0,05
P3-P4	84,59	0,52
P3-P5	80,65	0,29
P3-P6	79,65	0,61
P4-P5	71,66	0,26
P4-P6	84,32	0,45
P5-P6	81,65	0,84

TABLA 4.- Test de MANN-WHITNEY entre las diferentes cinéticas de concentración plasmática de atorvastatina en pollos, tras una dosis intravenosa de 10 mg.

A continuación, se ha procedido al ajuste de las concentraciones plasmáticas obtenidas experimentalmente en cada uno de los animales, y de las concentraciones medias a modelos farmacocinéticos mono- y bicompartimentales mediante regresión no lineal, utilizando el programa MULTIFIT, ponderando los datos a 1, $1/C$ y $1/C^2$.

En este caso los parámetro obtenidos se ajustan mejor a un modelo bicompartimental.

Los parámetros farmacocinéticos correspondientes a un ajuste bicompartimental para cada uno de los animales se muestran en la Tabla 5.

¹ Parame	Unidades	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Pollo 4	Pollo 5	Pollo 6	X
A	µg/mL	28,44	84,89	26,05	25,57	16,04	27,14	23,33
B	µg/mL	11,10	27,18	8,10	4,92	8,05	12,49	11,79
Alpha	h ⁻¹	1,79	20,98	1,39	0,73	0,98	1,74	1,48
Beta	h ⁻¹	0,20	0,52	0,13	0,10	0,08	0,19	0,17
Alpha_HL	h	0,39	0,03	0,50	0,96	0,70	0,40	0,47
Beta_HL	h	3,41	1,34	5,22	6,78	8,66	3,69	3,96
K ₁₀	h ⁻¹	0,56	1,98	0,43	0,36	0,26	0,48	0,42
K ₁₂	h ⁻¹	0,78	14,03	0,67	0,26	0,48	0,77	0,62
K ₂₁	h ⁻¹	0,65	5,48	0,43	0,20	0,38	0,68	0,61
Cmax	µg/mL	39,54	112,06	34,14	30,49	24,09	39,63	35,11
Vss	h	167,42	95,31	223,31	223,96	279,69	161,58	171,88

TABLA 5.- Parámetros farmacocinéticas bicompartimentales deducidos tras la administración intravenosa de atorvastatina, a dosis de 10 mg, a cada uno de los pollos a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste.

Sus respectivos valores medios, así como otros estadísticos de desviación quedan reflejados en la Tabla 6. Exceptuando una serie de parámetros como las constantes de distribución al segundo compartimento y valor de Alpha, el resto de parámetros se sitúan por debajo del 75%, valor máximo señalado por Wagner (1968).

¹ K₁₀: Constante de eliminación desde compartimento central. K₁₂: Constante de transferencia del compartimento central al periférico. K₂₁: Constante de retorno del compartimento periférico al central. Cmax: Concentración periférica máxima. Vss: Volumen de distribución en estado estacionario.

² Parámetro	N	MEDIA	S.D.	S.E.	C.V.
A	6	34,69	24,99	10,20	72,03
B	6	11,97	7,90	3,23	66,02
Alpha	6	4,60	8,03	3,28	174,60
Beta	6	0,20	0,16	0,07	49,83
Alpha_HL	6	0,50	0,31	0,13	63,32
Beta_HL	6	4,85	2,61	1,07	53,86
K ₁₀	6	0,68	0,65	0,27	95,21
K ₁₂	6	2,83	5,49	2,24	193,86
K ₂₁	6	1,30	2,05	0,84	157,59
C _{max}	6	46,16	32,83	13,40	71,11
V _{ss}	6	191,88	64,14	26,19	33,43

TABLA 6.- Estadísticos de los parámetros farmacocinéticos bicompartimental deducidos de las ecuaciones de ajuste correspondiente a la administración intravenosa de 10 mg de atorvastatina, y parámetros obtenidos a partir de las concentraciones medias. (Px)

² K₁₀: Constante de eliminación desde compartimento central. K₁₂: Constante de transferencia del compartimento central al periférico. K₂₁: Constante de retorno del compartimento periférico al central. C_{max}: Concentración periférica máxima. V_{ss}: Volumen de distribución en estado estacionario.

Para verificar dicha apreciación, se ha realizado una prueba de Kolmogorov-Smirnov, cuyos resultados se muestran en la Tabla 7, donde se comprueba cómo, en general, los niveles de significación son muy elevados y por tanto los datos son homogéneos.

PARÁMETROS	N.S.
A	0,35
B	0,16
Alpha	0,15
Beta	0,87
Alpha_HL	0,88
Beta_HL	0,83
K ₁₀	0,99
K ₁₂	0,99
K ₂₁	0,24
Cmax	0,78
Vss	0,95

TABLA 7.- Test de Kolmogorov-Smirnov para los parámetros farmacocinéticas monocompartimentales deducidos de las concentraciones plasmáticas obtenidas, tras la administración intravenosa de atorvastatina en cada animal.

La Tabla 8 muestra los resultados del estudio farmacocinético no compartimental, obtenidos mediante el programa WINNONLIN Professional® (versión 5.0), para cada animal y sus concentraciones medias. En dicha Tabla aparecen los valores del área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC), el tiempo medio de residencia (MRT), el aclaramiento (Cl) y el volumen aparente de distribución en función del área bajo la curva (V_z) no compartimentales. Las medias de dichos valores, así como los estadísticos más relevantes, aparecen en la Tabla 10.

³ Parame	Unidades	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Pollo 4	Pollo 5	Pollo 6	X
AUC	h* μ g/mL	101,47	86,92	86,53	99,48	127,85	90,90	99,39
MRT	h	12,81	6,07	8,85	16,77	13,02	6,59	7,93
Vz	mL/Kg	609,17	274,82	656,68	1241,81	342,40	496,14	325,80
Cl	mL/h/Kg	29,56	34,52	34,67	30,16	23,46	33,00	30,18
Vss	mL/Kg	378,66	209,36	306,84	505,74	305,52	217,61	239,45

TABLA 8.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales deducidos tras la administración intravenosa de atorvastatina, a dosis de 10 mg, a cada uno de los pollos a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste.

. El correspondiente test de KOLMOGOROV-SMIRNOV se presenta en la tabla 9, en éste último se demuestra el ajuste a la distribución normal, ya que en la mayoría de los parámetros se obtienen niveles de significación muy elevados.

PARÁMETROS	N.S.
AUC	0,81
AUMC	0,68
MRT	0,59
Vz/F	0,65
Cl/F	0,54

TABLA 9.- Test de KOLMOGOROV-SMIRNOV para los parámetros farmacocinéticos no compartimentales deducidos de las concentraciones plasmáticas obtenidas, tras la administración intravenosa de atorvastatina en cada animal.

Parámetro	N	MEDIA	S.D.	S.E.	C.V.
AUC	6	98,86	15,53	6,34	15,71
MRT	6	10,69	4,21	1,72	39,56
Vz	6	603,50	345,84	141,19	57,31
Cl	6	30,99	4,23	1,73	13,69
Vss	6	320,62	110,50	45,11	34,69

TABLA 10.- Estadísticos de los parámetros farmacocinéticos del modelo no compartimental tras la administración de un dosis intravenosa de 10 mg de atorvastatina a pollos.

³ AUC: Área bajo la curva. MRT: Tiempo medio de residencia. Vz: Volumen de distribución aparente en función del área bajo la curva. Cl: Aclaramiento. Vss: Volumen de distribución en estado estacionario.

4.2.- ADMINISTRACIÓN ORAL DE ATORVASTATINA AL GRUPO A (GRUPO CONTROL NORMAL).

Los valores de concentración plasmática de atorvastatina obtenidos tras la administración oral de una dosis de 3 mg/Kg, se reflejan en la Tabla 11.

Tiempo	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Pollo 4	Pollo 5	Pollo 6	X
0.25 h	2,60	0,93	3,25	2,85	5,66	5,79	3,51
0.50 h	4,40	1,94	7,44	5,99	8,50	7,73	6,00
1.00 h	2,32	6,23	3,03	4,75	4,65	4,70	4,28
1.50 h	2,54	3,92	5,83	3,68	4,46	4,06	4,08
2.00 h	1,23	1,78	2,38	1,77	3,46	2,92	2,26
4.00 h	1,72	3,92	3,97	2,45	4,72	1,52	3,05
6.00 h	2,27	3,50	4,89	4,61	5,40	5,03	4,28
8.00 h	3,13	2,70	2,55	5,10	6,59	7,76	4,64
10.00 h	2,47	0,83	2,36	1,23	3,44	5,33	2,61
24.00 h	1,41	1,67	2,94	1,87	1,29	4,18	2,23
32.00 h	2,30	1,36	3,28	2,52	2,07	2,30	2,31
48.00 h	1,98	0,50	2,69	1,56	3,45	1,38	1,93
72.00 h	0,32	0,31	0,06	0,05	0,04	0,05	0,14

TABLA 11.- Concentraciones plasmáticas experimentales de atorvastatina en $\mu\text{g/mL}$, en cada pollo tras la administración oral de una dosis de 10 mg.

En ella se observa como, en cada uno de los animales, a partir del primer tiempo de extracción se va produciendo un incremento de las concentraciones plasmáticas del producto hasta las 0,5 y 1 hora, dependiendo de los animales. A partir de ese momento las concentraciones van descendiendo apareciendo un nuevo pico entre las 6 y 8 horas, según las características individuales. Se encuentran niveles detectables del producto hasta prácticamente las 72 horas.

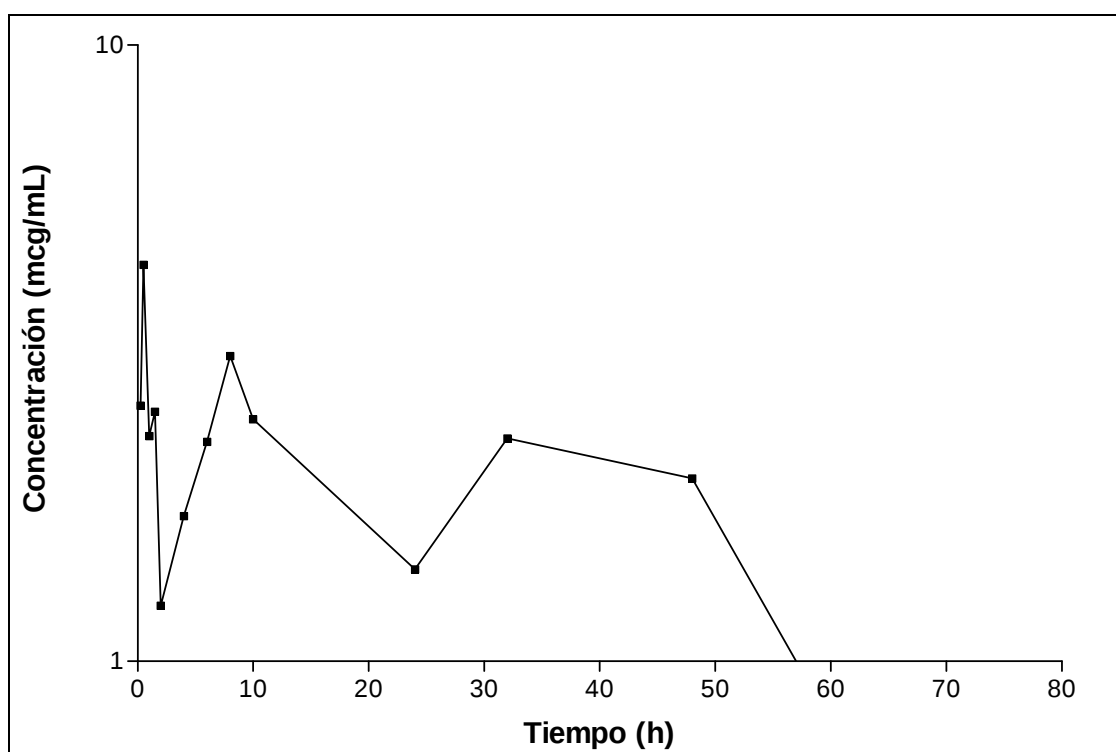


Gráfico 8.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía oral al pollo 1.

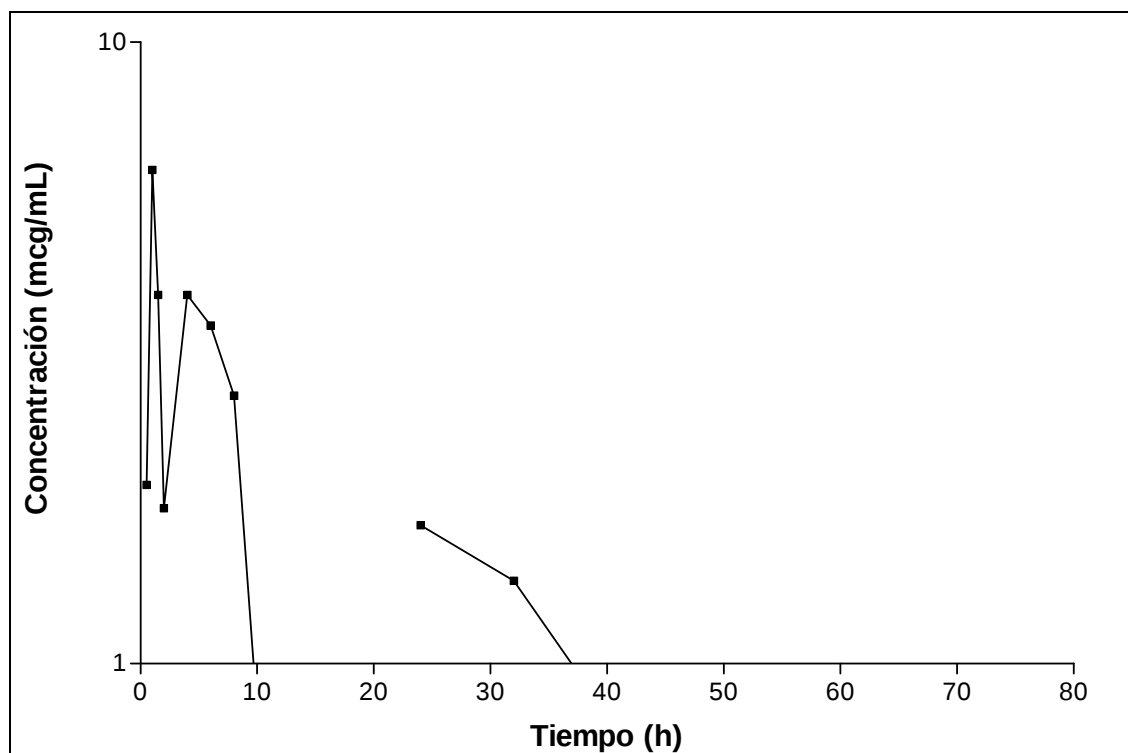


Gráfico 9.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía oral al pollo 2.

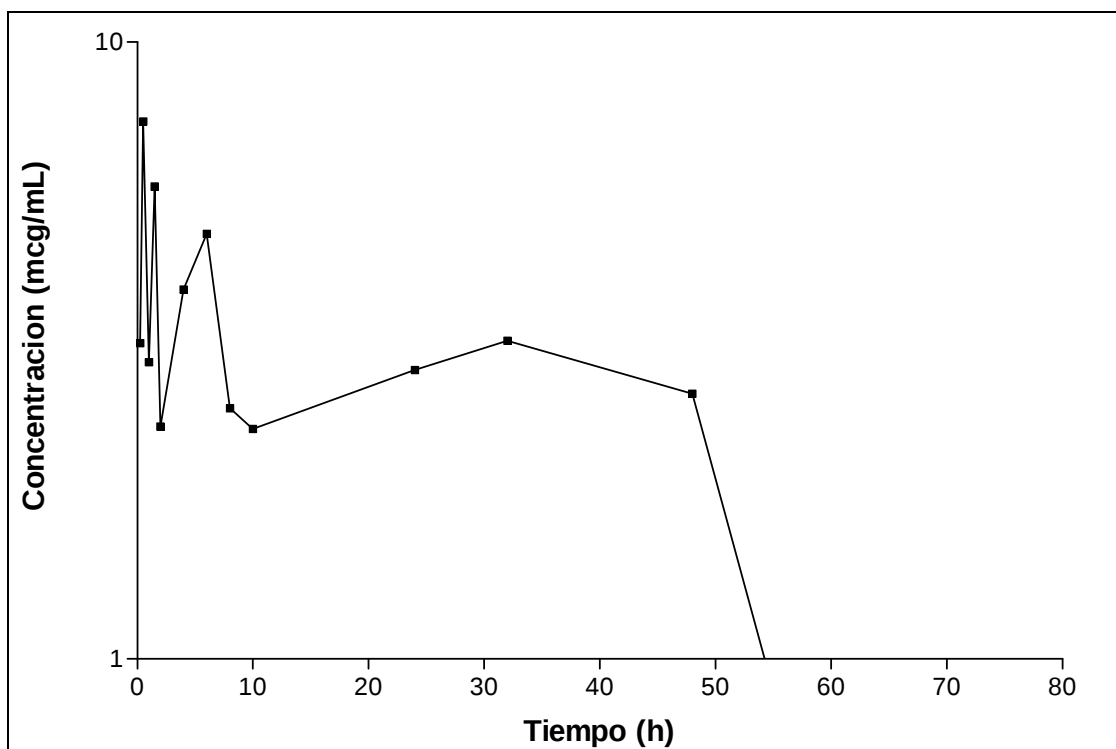


Gráfico 10.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía oral al pollo 3.

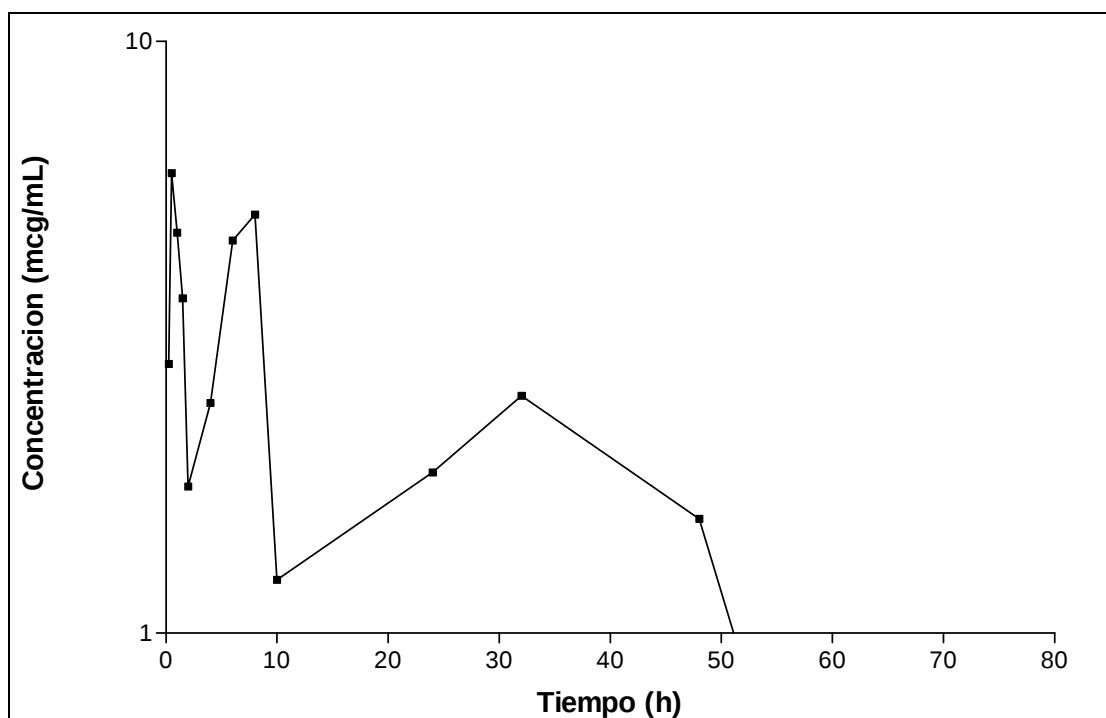


Gráfico 11.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía oral al pollo 4.

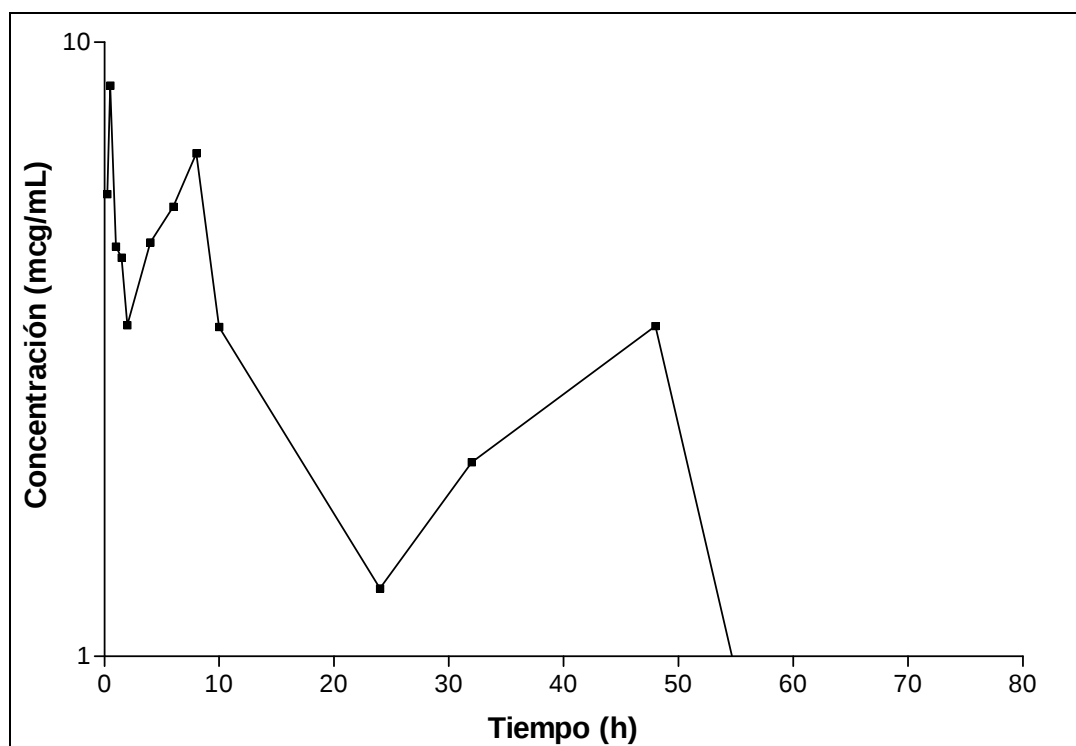


Gráfico 12.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía oral al pollo 5.

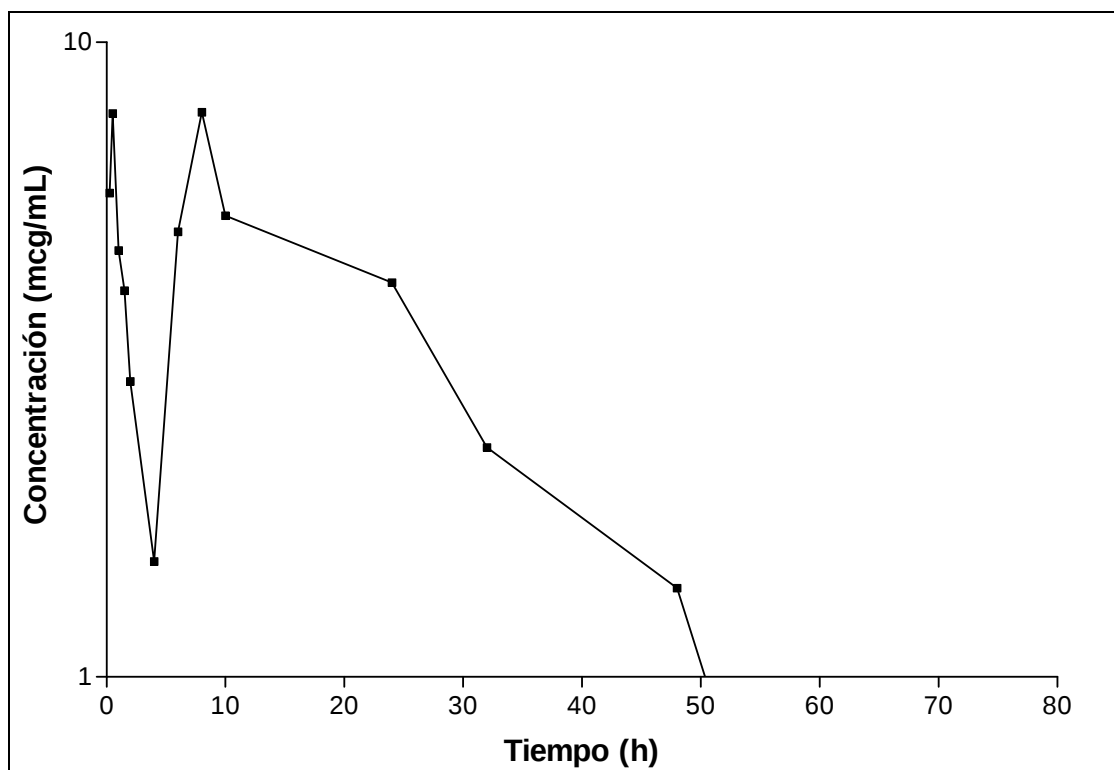


Gráfico 13.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía oral al pollo 6.

Los valores medios de las concentraciones plasmáticas de atorvastatina, junto con los estadísticos de desviación, se presentan en la Tabla 12

Tiempo	N	MEDIA	S.D.	S.E.	C.V.
0.25 h	6	3,51	1,89	0,77	53,85
0.50 h	6	6,00	2,46	1,01	41,00
1.00 h	6	4,28	1,40	0,57	32,71
1.50 h	6	4,08	1,07	0,44	26,23
2.00 h	6	2,26	0,83	0,34	36,73
4.00 h	6	3,05	1,33	0,54	43,61
6.00 h	6	4,28	1,18	0,48	27,57
8.00 h	6	4,64	2,20	0,90	47,41
10.00 h	6	2,61	1,63	0,66	62,45
24.00 h	6	2,23	1,12	0,46	50,22
32.00 h	6	2,30	0,62	0,26	26,96
48.00 h	6	1,93	1,04	0,42	53,89
72.00 h	6	0,14	0,14	0,06	100,00

TABLA 12.- Estadísticos de las concentraciones plasmáticas experimentales de atorvastatina, en $\mu\text{g/mL}$, tras la administración de una dosis oral de 10 mg a pollos.

Con respecto al coeficiente de variación, Wagner (1968) indica que, en los ensayos farmacocinéticos, cuando los valores de concentración plasmática se distribuyen normalmente, los coeficientes de variación que se obtienen, oscilan entre el 25% y 75%. Además, establece que el número de animales idóneo a utilizar en estos estudios debe estar comprendido entre 5 y 20. Como se puede observar en la Tabla 2, hemos obtenido valores por debajo del 75% en todas las extracciones incluso inferiores a ese 25%, encontrándose el mínimo valor de coeficiente en 26.23% y el máximo en 62,45%, correspondientes a las 1.5 y 10 horas, respectivamente.

En el gráfico 14 se representan los valores medios ($\text{media} \pm \text{SD}$) de las concentraciones plasmáticas de atorvastatina a los distintos tiempos de extracción.

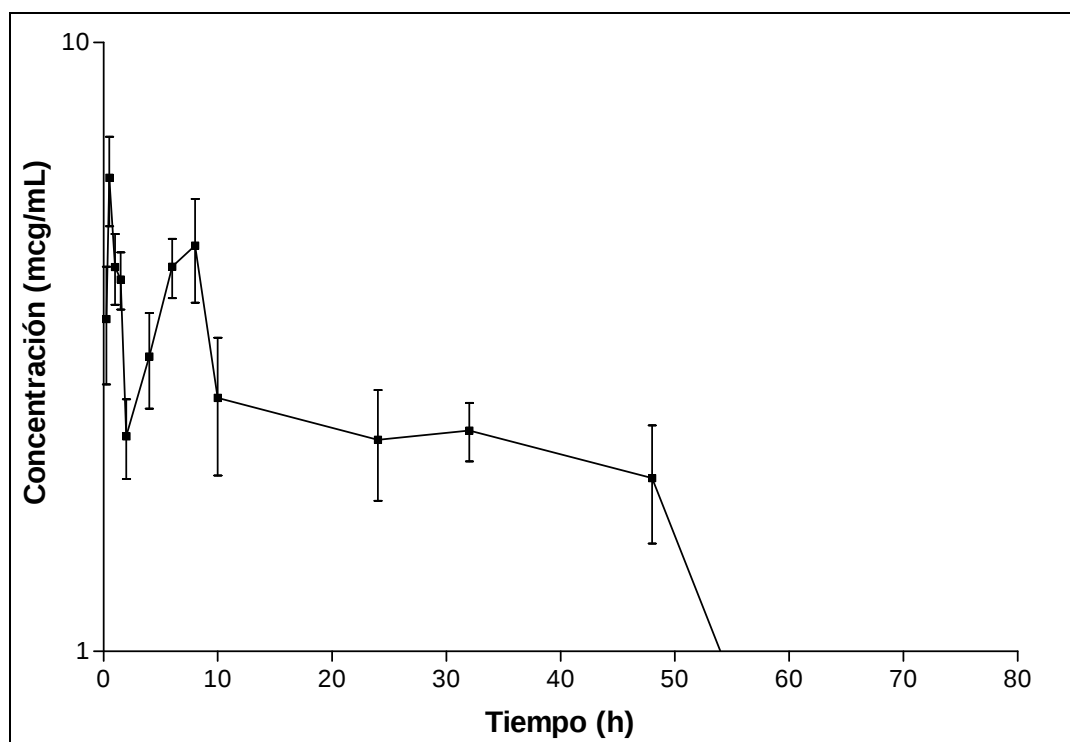


Gráfico 14.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales ($\pm \text{SD}$) de atorvastatina obtenidas tras la administración de una dosis de 10 mg vía oral.

Para comprobar la homogeneidad de los datos, se ha realizado el test de KOLMOGOROV-SMIRNOV entre todos los valores de concentración plasmática de atorvastatina, obtenidos en los diferentes animales para un mismo tiempo de extracción. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 13, donde puede apreciarse que el nivel de significación es muy elevado para todos los tiempos de extracción. De esta forma, la homogeneidad de los datos obtenidos no sólo es suficiente, sino que está plenamente probada, por lo que no es preciso incrementar el número de animales.

Tiempo	N.S.
0.25 h	0,22
0.50 h	0,22
1.00 h	0,27
1.50 h	0,20
2.00 h	0,22
4.00 h	0,24
6.00 h	0,28
8.00 h	0,25
10.00 h	0,20
24.00 h	0,29
32.00 h	0,20
48.00 h	0,15
72.00 h	0,38

TABLA 13.- Test de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la distribución normal de las concentraciones plasmáticas de atorvastatina, obtenidas para un mismo tiempo tras su administración oral a pollos.

Por otro lado, se realizó un test de Mann-Whitney (Tabla 14) para conocer si existían diferencias entre los animales.

Pollos	U MANN-WITHNEY	N.S.
P1-P2	89,50	0,71
P1-P3	48,50	0,02
P1-P4	78,00	0,24
P1-P5	48,50	0,02
P1-P6	58,00	0,07
P2-P3	65,50	0,14
P2-P4	77,50	0,36
P2-P5	57,50	0,07
P2-P6	57,50	0,07
P3-P4	80,50	0,43
P3-P5	76,50	0,33
P3-P6	85,50	0,58
P4-P5	72,50	0,25
P4-P6	76,00	0,32
P5-P6	97,50	1,00

TABLA 14.- Test de MANN-WHITNEY entre las diferentes cinéticas de concentración plasmática de atorvastatina en pollos, tras una dosis oral de 10 mg.

A continuación, se ha procedido al ajuste de las concentraciones plasmáticas obtenidas experimentalmente en cada uno de los animales, y de las concentraciones medias a modelos farmacocinéticos mono- y bicompartimentales mediante regresión no lineal, utilizando el programa MULTIFIT, ponderando los datos a 1, $1/C$ y $1/C^2$.

Tras el estudio realizado los datos obtenidos presentan un mejor ajuste a un modelo monocompartimental.

Los parámetros farmacocinéticos correspondientes a un ajuste monocompartimental para cada uno de los animales se muestran en la Tabla 15.

⁴ Parame	Unidades	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Pollo 4	Pollo 5	Pollo 6	X
AUC	h*µg/mL	96,50	74,13	71,37	55,40	85,85	170,66	91,79
t _{1/2K01}	h	0,01	0,22	0,09	0,06	0,03	5,43	0,07
t _{1/2K10}	h	27,68	26,12	12,36	12,55	10,40	16,12	15,90
Cl	mL/h	103,63	134,89	140,10	180,50	116,48	58,60	108,95
Vd	mL	4138,27	5082,88	2498,36	3268,26	1746,94	1362,80	2500,66
K ₀₁	h ⁻¹	50,47	3,10	7,86	11,46	20,88	0,13	9,40
K ₁₀	h ⁻¹	0,03	0,03	0,05	0,06	0,07	0,04	0,04
Cmax	µg/mL	2,41	1,89	3,86	2,98	5,62	4,22	3,90
Tmax	h	0,15	1,55	0,63	0,47	0,28	12,85	0,57

TABLA 15.- Parámetros farmacocinéticos monocompartimentales deducidos tras la administración oral de atorvastatina, a dosis de 10 mg, a cada uno de los pollos a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste.

⁴ AUC: Área bajo la curva. t_{1/2K01}: Tiempo de vida media de la fase de absorción. t_{1/2K10}: Tiempo de vida media de la fase de disposición rápida. Cl: aclaramiento. Vd: Volumen de distribución. K₀₁: Constante de absorción. K₁₀: Constante de eliminación. Cmax: Concentración plasmática máxima. Tmax: Tiempo en alcanzar la concentración plasmática máxima.

Sus respectivos valores medios, así como otros estadísticos de desviación quedan reflejados en la Tabla 16. Exceptuando el tiempo de semivida de absorción, la constante de absorción y Tmax, el resto de parámetros se sitúan por debajo del 75%, valor máximo señalado por Wagner (1968).

⁵ Parámetro	N	MEDIA	S.D.	S.E.	C.V.
AUC	6	92,32	40,82	16,66	44,21
$t_{1/2K01}$	6	0,97	2,18	0,89	224,44
$t_{1/2K10}$	6	17,54	7,50	3,06	42,76
Cl	6	122,4	40,75	16,64	33,30
Vd	6	3016	1429	583,3	47,37
K_{01}	6	15,65	18,53	7,56	118,39
K_{10}	6	0,05	0,02	0,01	34,99
Cmax	6	3,50	1,36	0,55	38,78
Tmax	6	2,66	5,02	2,05	189,04

TABLA 16.- Estadísticos de los parámetros farmacocinéticos monocompartimental deducidos de las ecuaciones de ajuste correspondiente a la administración oral de 10 mg de atorvastatina, y parámetros obtenidos a partir de las concentraciones medias. (Px)

⁵ AUC: Área bajo la curva. $t_{1/2K01}$: Tiempo de vida media de la fase de absorción. $t_{1/2K10}$: Tiempo de vida media de la fase de disposición rápida. Cl: aclaramiento. Vd: Volumen de distribución. K_{01} : Constante de absorción. K_{10} : Constante de eliminación. Cmax: Concentración plasmática máxima. Tmax: Tiempo en alcanzar la concentración plasmática máxima.

Para verificar dicha apreciación, se ha realizado una prueba de Komogorov-Smirnov, cuyos resultados se muestran en la Tabla 17, donde se comprueba como, en general, los niveles de significación son muy elevados y por tanto los datos son homogéneos.

⁶ PARÁMETROS	N.S.
AUC	0,68
$t_{1/2K01}$	0,14
$t_{1/2K10}$	0,86
Cl	0,99
Vd	0,99
K_{01}	0,83
K_{10}	0,99
Cmax	0,99
Tmax	0,24

TABLA 17.- Test de Kolmogorov-Smirnov para los parámetros farmacocinéticos monocompartimentales deducidos de las concentraciones plasmáticas obtenidas, tras la administración oral de atorvastatina en cada animal.

⁶ AUC: Área bajo la curva. $t_{1/2K01}$: Tiempo de vida media de la fase de absorción. $t_{1/2K10}$: Tiempo de vida media de la fase de disposición rápida. Cl: aclaramiento. Vd: Volumen de distribución. K_{01} : Constante de absorción. K_{10} : Constante de disposición. Cmax: Concentración plasmática máxima. Tmax: Tiempo en alcanzar la concentración plasmática máxima.

La Tabla 18 muestra los resultados del estudio farmacocinético no compartimental, obtenidos mediante el programa WINNONLIN Professional® (versión 5.0), para cada animal y sus concentraciones medias. En dicha Tabla aparecen los valores del área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC), el tiempo medio de residencia (MRT), el aclaramiento (Cl) y el volumen aparente de distribución en función del área bajo la curva (V_z) no compartimentales.

⁷ Parame	Unidades	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Pollo 4	Pollo 5	Pollo 6	X
AUC	h* μ g/mL	127,19	83,55	178,93	126,16	182,93	190,82	147,30
AUMC	h*h* μ g/mL	3729,28	1904,85	5003,40	3267,94	4981,47	4381,11	3813,08
MRT	h	29,32	22,80	27,96	25,90	27,23	22,96	25,89
V_z/F	mL	1301,79	3815,55	881,86	658,61	725,89	1211,72	1520,78
Cl/F	mL/h	75,35	105,53	55,59	79,01	54,51	49,23	66,46

TABLA 18.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales deducidos tras la administración oral de atorvastatina, a dosis de 10 mg, a cada uno de los pollos a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste.

El estudio estadístico de los parámetros no compartimentales se muestra en la tabla 20, y el correspondiente test de KOLMOGOROV-SMIRNOV se presenta en la tabla 19, en éste último se demuestra el ajuste a la distribución normal, ya que la mayoría de los parámetros se obtienen niveles de significación muy elevados.

PARÁMETROS	N.S.
AUC	0,80
AUMC	0,99
MRT	0,96
V_z/F	0,36
Cl/F	0,85

TABLA 19.- Test de KOLMOGOROV-SMIRNOV para los parámetros farmacocinéticos no compartimentales deducidos de las concentraciones plasmáticas obtenidas, tras la administración oral de atorvastatina en cada animal.

⁷ AUC: Área bajo la curva. MRT: Tiempo medio de residencia. V_z/F : Volumen aparente de distribución. Cl/F: Aclaramiento.

⁸ Parámetro	N	MEDIA	S.D.	S.E.	C.V.
AUC	6	148,3	42,60	17,39	28,73
AUMC	6	3878	1185	483,9	30,57
MRT	6	26,03	2,68	1,09	10,29
Vz/F	6	1433	1195	488,1	83,45
Cl/F	6	69,84	21,15	8,64	30,29

TABLA 20.- Estadísticos de los parámetros farmacocinéticos del modelo no compartimental tras la administración de un dosis oral de 10 mg de atorvastatina a pollos.

⁸ AUC: Área bajo la curva. MRT: Tiempo medio de residencia. Vz/F: Volumen aparente de distribución. Cl/F: Aclaramiento.

4.3.- RESULTADOS ANALÍTICOS DE MARCADORES LIPÍDICOS DEL GRUPO B.

Los resultados analíticos de los marcadores lipídicos en los dos grupos de trabajo se reflejan en la siguiente tabla.

	Grupo control hiperlipémico	Dieta normal + atorvastatina	Dieta hiperlipémica + atorvastatina
Colesterol (mg/dL)	980,3 ± 141,3	197,0 ± 74,3	4138,8 ± 93,6
Triglicéridos (mg/dL)	351,8 ± 18,0	31,6 ± 7,2	356,9 ± 145,6
HDL (mg/dL)	253,4 ± 32,5	88,5 ± 19,3	99,4 ± 22,1
LDL (mg/dL)	656,5 ± 112,6	77,6 ± 26,4	242,9 ± 79,3
AST (UI/L)	267,3 ± 37,2	371,5 ± 158,1	372,4 ± 74,2
ALT (UI/L)	17,8 ± 5,1	4,1 ± 1,1	18,3 ± 6,8
γ- GT (UI/L)	9,3 ± 2,4	12,3 ± 2,1	20,8 ± 9,8
AP (UI/L)	406,3 ± 94,8	275,2 ± 123,8	385,4 ± 36,9
LDH (UI/L)	1115,0 ± 133,6	617,9 ± 182,1	1069,0±268,9
Fibrinógeno (g/dL)	2,67 ± 0,82	1,60 ± 0,58	0,67 ± 0,33
Proteína C Reactiva (REU/mL)	2,75 ± 0,26	2,00 ± 0,38	2,01 ± 0,33

Atorvastatina (mcg/mL)		8,55 ± 3,22	7,30 ± 3,41
------------------------	--	-------------	-------------

TABLA 21. Valores lipídicos en sangre.

Discusión

5.1.- BIOMODELO ANIMAL

Existen diferentes modelos animales para el estudio de la arteriosclerosis, como conejos, monos y cerdos. Si bien hemos desarrollado un modelo experimental de esta patología en pollos, utilizando dietas hiperlipémicas y sin realizar ninguna alteración genética.

A la hora de elegir un modelo animal para reproducir una enfermedad se deben valorar una serie de factores como:

- Reproducibilidad: tras un periodo de tres meses de inducción nuestros animales desarrollaron la patología, además, existe facilidad para generar este biomodelo en otros laboratorios (Horlick et al., 1949; Katz et al., 1953; Gupta et al., 1980; Orita et al., 1994).
- Especificidad: el biomodelo elegido presenta la anormalidad deseada. Hay otros animales estudiados como los conejos que de forma espontánea padecen arteriosclerosis, si bien no cumplirían este requisito, puesto que al ser sensibles a las dietas ricas en grasas se producen lesiones que se acercan más a una xantomatosis que a una arteriosclerosis (Hadjiisky et al., 1991).
- Coste directo del animal, en nuestro caso es bajo. Existen estudios en la bibliografía con animales como el cerdo y el mono, siendo el coste de estos modelos elevado para ser considerado como modelo de investigación en el laboratorio (Hadjiisky et al., 1991).

- Tamaño del animal, es adecuado para una buena manipulación. En el caso de los cerdos y monos estudiados el tamaño de los animales sería un aspecto negativo para su elección.

Existen diferentes modelos animales para el estudio de la arteriosclerosis, como conejos, monos y cerdos. Si bien hemos desarrollado un modelo experimental de esta patología en pollos, utilizando dietas hiperlipémicas y sin realizar ninguna alteración genética.

La elección del pollo como biomodelo de estudio de aterosclerosis se basa en los siguientes puntos, deducidos a partir de evidencias experimentales:

- a) animal que consume sin problemas dietas variadas.
- b) barato y de fácil manejo para la investigación prolongada.
- c) capaz de desarrollar arteriosclerosis espontánea.
- d) capaz de desarrollar arteriosclerosis con dietas hipercolesterolémicas con un ligero pero significativo incremento del colesterol plasmático (116-247 mg/dL en animales de experimentación frente a 68-142 mg/dL en controles)
- e) los niveles plasmáticos de colesterol (68-142 mg/dL) y triglicéridos (70-110 mg/dL) son similares a los de humanos (colesterol < 190 mg/dL; triglicéridos < 160 mg/dL)
- f) la composición de las lipoproteínas HDL (80-115 mg/dL) y LDL (10-25 mg/dL) es similar a la de humanos. (HDL > 40 mg/dL y LDL < 145 mg/dL)
- g) no hay diferencias entre las lesiones desarrolladas en pollos y las de humanos (Wong, 1975).

Una vez elegido el biomodelo, el estudio farmacocinético de la atorvastatina complementa la caracterización de este biomodelo.

5.2.- ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE ATORVASTATINA EN POLLOS

5.2.1.- MODELO FARMACOCINÉTICO

La evolución de las concentraciones plasmáticas de atorvastatina a una dosis de 3 mg/kg en pollos, se ha ajustado a los modelos farmacocinéticos mono, bi y tricompartmentales con y sin ponderación de los datos experimentales obtenidos para cada animal.

A la hora de decidir cuál de dichos modelos es el más idóneo, se ha tenido en cuenta un coeficiente no lineal conocido como Criterio de Información de Akaike o AIC (Yamaoka et al., 1978), considerado como el principal criterio de decisión. De acuerdo a la teoría de Akaike, en un conjunto de diferentes modelos, se escoge el que tenga el menor valor de AIC.

Teniendo en cuenta los valores más favorables de AIC (menores), se ha comprobado que la evolución de las concentraciones plasmáticas en todos los animales así como para las concentraciones medias, se ajustan mejor a un modelo bicompartimental con ponderación al inverso al cuadrado de las concentraciones plasmáticas. Así pues, se puede concluir que las concentraciones plasmáticas experimentales obtenidas tras la administración intravenosa de una dosis de 3 mg/kg de atorvastatina en pollos, se ajustan mejor a un modelo bicompartimental abierto.

Para verificar la bondad de estos ajustes al modelo bicompartimental, previamente se ha comprobado la homogeneidad de los datos mediante un análisis de la varianza no paramétrico (test de Kolmogorov-Smirnov) en el que se han establecido

como hipótesis nulas, que las concentraciones de atorvastatina (variable dependiente) no varían entre pollos (variable independiente), y que no varían entre tiempos (variable independiente). Los resultados, indicados en la tabla 3, justifican que hay igualdad entre animales (son estadísticamente iguales), pero no hay igualdad entre los tiempos de extracción (la concentración en plasma es diferente a cada tiempo). De esta forma, al no existir diferencia significativa entre los animales, la única fuente de variación es el tiempo, por lo que se manifiesta homogeneidad a un tiempo determinado en las concentraciones.

El modelo bicompartimental está de acuerdo con las características farmacocinéticas de las estatinas, y que ha sido descrito en humanos (Narwal et al., 2010), aunque para la vía oral. Este grupo de fármacos presentan una buena distribución orgánica con una importante penetración a nivel intracelular. Sin embargo, es muy difícil establecer comparaciones con otros estudios farmacocinéticos con atorvastatina por esta vía de administración, dado por un lado, la ausencia de estudios en nuestra especie (pollos), y en otras especies como rata, etc., los estudios farmacocinéticos se limitan a estudiar los datos mediante análisis no compartimental.

El modelo bicompartimental abierto fue introducido por T. Teorell en 1937 y posteriormente divulgado por J. Loo y S. Riegelman (1968). Este modelo intenta reflejar el hecho de que la distribución del fármaco en el organismo no es un proceso instantáneo. Se caracteriza por considerar al organismo compuesto por dos compartimentos, uno central correspondiente a los tejidos en los que se alcanza un rápido equilibrio en la distribución del fármaco (puede considerarse instantánea) y uno periférico que corresponde a los tejidos en los que el equilibrio en la distribución precisa

un tiempo más o menos dilatado para alcanzarse (Doménech et al., 1997). Dependiendo de que el proceso de eliminación se produzca desde el compartimento central, o desde el compartimento periférico, se obtendrán distintos modelos posibles. En nuestro caso hemos considerado que la eliminación se produce desde el compartimento central.

El modelo bicompartimental abierto tras una dosis intravenosa, viene definido por la siguiente ecuación:

$$C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

Esta ecuación adquiere diferentes valores para cada animal (Tabla 5), es por ello que para hallar la ecuación que mejor define la evolución de las concentraciones plasmáticas de atorvastatina en el pollo, se deben llevar a cabo estudios estadísticos que permitan calcular los valores medios para cada uno de los parámetros que intervienen en la misma. Dichos valores promedio se muestran en la Tabla 6.

Por consiguiente, la ecuación que define la evolución de las concentraciones plasmáticas experimentales, en el pollo tras la administración intravenosa, de una dosis única de 3 mg/kg de atorvastatina, adquiere el siguiente valor:

$$C = 34.69 \cdot e^{-4.60 \cdot t} + 11.97 \cdot e^{-0.2 \cdot t}$$

La representación semilogarítmica de las concentraciones individuales experimentales (Gráficos 1-6), pone de manifiesto que los niveles de atorvastatina descienden rápidamente en la fase inicial y, a partir de este momento, disminuyen de forma más paulatina, dando lugar a una segunda fase, que podría considerarse

monoexponencial y que se mantiene hasta el final del proceso (hasta las 48 horas tras la administración).

Este hecho se aprecia más claramente al observar la representación semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (Gráfico 7), en las que se diferencia una fase lineal correspondiente a la parte media y final de la curva, y una fase inicial que es susceptible de descomponerse en otra recta de pendiente más pronunciada que la anterior.

La transformación de esta recta semilogarítmica, en su ecuación exponencial correspondiente, desarrolla la expresión biexponencial ya indicada en la ecuación 2. Por tanto, la desaparición de atorvastatina del plasma de pollo, está regida por dos constantes híbridas de disposición. La primera de ellas, o constante de disposición rápida (α), rige fundamentalmente los procesos de distribución y la segunda o constante de disposición lenta (β), los procesos de eliminación. Una vez alcanzado el equilibrio en la distribución, la constante de disposición rápida (α), deja de tener influencia práctica, por lo que se puede asumir que la desaparición de atorvastatina del plasma de pollos, queda determinada por la constante de la última fase o constante de disposición lenta (β). Por definición, el valor de α es siempre superior al de β (Doménech y cols., 1997).

El descenso rápido inicial de las concentraciones plasmáticas, implica una rápida distribución a los tejidos, durante la primera fase, seguida de una distribución más lenta en la siguiente, detectándose concentraciones de atorvastatina en plasma hasta las 48 horas.

5.2.2.- PARAMETROS FARMACOCINÉTICOS

A continuación se van a comentar los parámetros farmacocinéticos más representativos de atorvastatina tras su administración intravenosa a pollos. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis compartimental para cada uno de los animales, junto con sus valores medios y estadísticos asociados, y para las concentraciones medias se muestran en las Tablas 5 y 6. En la Tablas 8 y 10 aparecen los parámetros farmacocinéticos no compartimentales del fármaco referentes a cada pollo, junto con sus valores medios y estadísticos asociados.

5.2.2.1.- CONSTANTES DE DISPOSICIÓN RÁPIDA Y LENTA.

Las constantes α y β se denominan macroconstantes rápida y lenta de disposición que, farmacocinéticamente, son consideradas híbridas, al englobar los procesos de distribución y eliminación del fármaco (Doménech et al., 1997). Estas constantes son de primer orden (Pla y del Pozo, 1974).

En el presente estudio, los valores medios de estas constantes para atorvastatina han sido de $4,60 \text{ h}^{-1}$ y $0,20 \text{ h}^{-1}$ para α y β , respectivamente. Aunque no existen datos en la bibliografía para comparar con otros estudios, los valores obtenidos concuerdan con la hipótesis del mayor valor para α respecto a β .

Las constantes híbridas de disposición pueden relacionarse mediante la razón α/β , que informa cuál de ellas controla principalmente los procesos de distribución y eliminación (Pla y Obach, 1982). Así, cuanto más elevado sea dicho cociente, tanto más bicompartimental puede considerarse la distribución del fármaco. En nuestro estudio, la relación α/β puede calcularse, obteniéndose un valor de $23 (\pm 3,53)$, el cual es indicativo de la gran diferencia existente entre ambas fases. Este valor indica que la distribución de

la atorvastatina es, preferentemente, bicompartimental y que es la constante β la que controla principalmente los procesos anteriormente citados, ya que los regula durante más tiempo.

5.2.2.2.- MICROCONSTANTES

Las constantes α y β , no son las verdaderas constantes de distribución y eliminación, ya que ambas participan en los dos procesos, las denominadas microconstantes son las que realmente los regulan.

En el modelo bicompartimental, considerando que la eliminación del fármaco se produce desde el compartimento central, existen tres microconstantes: la constante de transferencia del compartimento central al compartimento periférico (k_{12}), la constante de retorno del compartimento periférico al central (k_{21}) y la constante de eliminación desde el compartimento central (k_{10}). Podemos observar esquemáticamente en la figura 5, los procesos de transferencia del fármaco entre los dos compartimentos, central y periférico, y el de eliminación desde el central.

En este modelo, el fármaco se distribuye instantáneamente en el compartimento central, desde el cual pasa al compartimento periférico de acuerdo con un proceso cinético de primer orden, regido por la constante de velocidad k_{12} y retorna hacia el compartimento central (desde el cual se produce la eliminación, también según una cinética de primer orden regida por la constante k_{10}). El proceso cinético de retorno, también de orden uno, viene regido por la constante k_{21} (Doménech et al., 1997).

Los valores medios obtenidos para dichas constantes, en el caso de atorvastatina en el pollo, son $k_{12} = 2,83 \text{ h}^{-1}$, $k_{21} = 1,30 \text{ h}^{-1}$ y $k_{10} = 0,68 \text{ h}^{-1}$ (Tabla 6). Esto pone de manifiesto que para cada ave la constante de paso al compartimento periférico desde el

compartimento central (k_{12}) es la que adquiere un mayor valor, indicando una rápida transferencia del fármaco desde el compartimento central, con poco retorno al compartimento central. Este hecho parece indicar que el fármaco tiene capacidad para acumularse o retenerse en el compartimento periférico.

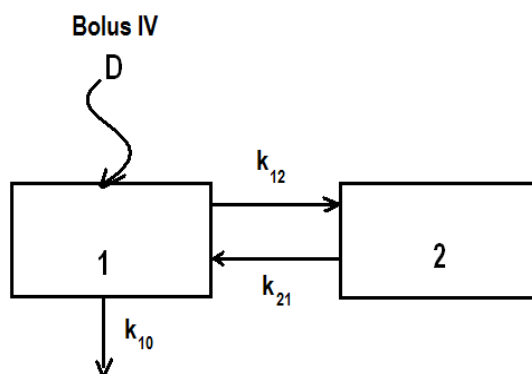


Figura 5.- Representación esquemática del modelo bicompartimental tras la administración intravenosa de un fármaco.

Si observamos estas constantes podemos establecer relaciones de interés, como la relación β/k_{10} , que alcanza un valor de 0,29 ($\pm 0,04$), y señala una eliminación global del fármaco desde todo el organismo, regida por una constante β inferior a la verdadera constante de eliminación (k_{10}), lo que confirma de nuevo la adecuación de la disposición de atorvastatina a un modelo bicompartimental.

Del estudio de la relación k_{12}/k_{10} , se obtiene un valor de 4,16 ($\pm 0,03$). Como se puede observar, este valor es muy superior a 1 y nos indica que existe una velocidad de paso al compartimento periférico del fármaco, muy superior a la de eliminación del mismo. Esto es debido a la alta capacidad de penetración a través de membranas biológicas de atorvastatina.

Si estudiamos la relación entre la constante de transferencia y retorno, desde el compartimento periférico k_{12}/k_{21} , esta adquiere el valor de 2,17 ($\pm 0,26$). Este resultado

indica que el fármaco accede al compartimento periférico y se produce cierta retención del mismo en el compartimento periférico.

Del análisis de la relación k_{21}/k_{10} , se obtiene un valor de 1,91 ($\pm 0,04$), por lo que el retorno del fármaco, del compartimento periférico al compartimento central, condiciona en cierta medida su eliminación. Esto concuerda con que la existencia de cierta retención del fármaco en el compartimento periférico.

5.2.2.3.- SEMIVIDA Y TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA

La semivida de la fase de disposición rápida ($t_{1/2\alpha}$) para atorvastatina, ha sido de 0,50 horas, y la semivida de la fase de disposición lenta ($t_{1/2\beta}$), considerado como tiempo de vida media o semivida del fármaco (Atkinson y Kushner, 1979; Gibaldi y Perrier, 1982, Rowland y Tozer, 2010) se estima en 4,85 horas (Tabla 6).

El análisis farmacocinético no compartimental permite calcular el denominado momento 1 o tiempo medio de residencia (MRT). Este parámetro es independiente del modelo farmacocinético elegido y tiene un significado análogo al $t_{1/2\beta}$ que se halla en los modelos compartimentales. El MRT, se obtiene directamente de la curva experimental y puede considerarse como una variable estadística aleatoria. El $t_{1/2\beta}$ por el contrario, es un parámetro obtenido a partir de la ecuación de ajuste.

En el presente estudio se ha obtenido un valor de MRT de 10,69 horas (Tabla 10).

5.2.2.4.- VOLÚMENES DE DISTRIBUCIÓN APARENTE

El volumen de distribución aparente de atorvastatina calculado en función del área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (V_z) en pollos, alcanza un valor de 603,50 mL/kg, en tanto que el volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}) adquiere un valor de 320,62 mL/kg (Tabla 10). Como se puede observar estos valores son altos, e indican que el fármaco tiene una excelente distribución en tejidos y fluidos en esta especie. La diferencia obtenida entre ambos volúmenes de distribución es consecuencia del método empleado para su cálculo. En el caso de V_z , se utiliza β en el denominador, es decir se multiplica por el $t_{1/2\beta}$, en cambio, en el cálculo del V_{ss} se multiplica por el MRT. Estas diferencias condicionan la validez de un determinado volumen de distribución. En general, el volumen de distribución es útil para transformar concentraciones en cantidades de fármaco en el organismo y viceversa. Debido al método de cálculo, el V_{ss} es válido en aquellos momentos en que la curva de nivel plasmático está en zonas próximas a la inflexión y, por supuesto, durante la misma ($V_{ss} = V_c + V_p$), en tanto que el V_z es válido en una zona más amplia de la curva de nivel plasmático, a partir de concentraciones anteriores al inicio de la fase de disposición lenta hasta el final del proceso (Doménech et al., 1997).

5.2.2.5.- ÁREA BAJO LA CURVA

El área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC), es un parámetro que permite calcular el aclaramiento plasmático y la biodisponibilidad del fármaco tras su administración extravascular. Se calcula integrando, entre tiempo cero e infinito, la curva de concentración plasmática-tiempo, y puede hacerse tanto por análisis compartimental (a partir de la ecuación general del proceso) o por análisis no

compartimental (métodos trapezoidal o logarítmico trapezoidal, a partir de la curva experimental) como en este caso.

El valor de AUC obtenido para atorvastatina en pollos es de 98,86 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ (Tabla 10). Respecto a valores de AUC obtenidos en otras especies utilizadas como biomodelos animales, en el caso de la rata, se obtiene un AUC de 78,7 tras la administración de atorvastatina a una dosis de 2 mg/kg por vía intravenosa (Lau et al., 2006)

5.2.2.6.- ACLARAMIENTO PLASMÁTICO

El aclaramiento plasmático (Cl) puede calcularse a partir de las curvas de niveles plasmáticos, recurriendo a métodos modelo-dependientes, basados en los modelos compartimentales y fisiológicos, o utilizando métodos modelo-independientes basados en la estimación del AUC (Doménech et al., 1997). En nuestro estudio, se ha calculado el Cl en función del área bajo la curva mediante análisis no compartimental. El valor obtenido ha sido de 30,99 mL/kg•h (Tabla 10). Lau et al, (2006), obtuvieron valores de 32,3 mL/min/kg en ratas tras la administración intravenosa.

5.3.- ADMINISTRACIÓN ORAL DE ATORVASTATINA EN POLLOS

5.3.1.- MODELO FARMACOCINÉTICO

La evolución de las concentraciones plasmáticas de atorvastatina, tras la administración oral de 3 mg/kg en pollos (tabla 11), se ha ajustado, igual que en la administración intravenosa, a modelos compartimentales con y sin ponderación de los datos experimentales.

En todos los animales estudiados el valor de AIC indica un mejor ajuste a un modelo monocompartimental con ponderación al inverso al cuadrado de la concentración. Así, la evolución de las concentraciones plasmáticas de atorvastatina, tras su administración oral, sigue un modelo farmacocinético monocompartimental abierto con absorción de primer orden.

Igual que en la administración intravenosa, y tras un análisis de la varianza no paramétrico (tabla 13), se ha verificado la homogeneidad de los datos obteniéndose que, la única fuente de variación es el tiempo, por lo que se manifiesta homogeneidad a un tiempo determinado en las concentraciones para todos los animales.

En la literatura no existen estudios compartimentales en pollos tras la administración de atorvastatina vía oral.

Cuando se administra un fármaco por vía extravascular (oral, intramuscular, subcutánea, transdérmica, etc.) el modelo bicompartimental puede esquematizarse como se indica en la figura 6, en la cual se considera la variación instantánea de concentración en el compartimento central:

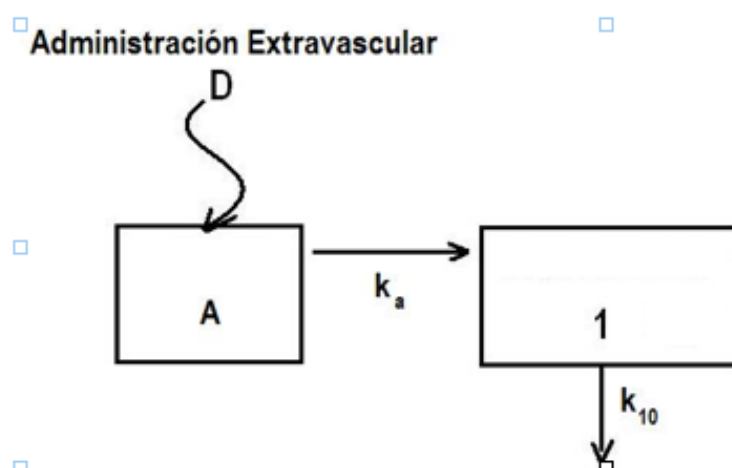


Figura 6.- Representación esquemática del modelo monocompartimental tras la administración extravascular de un fármaco.

Este modelo consta de dos compartimentos, al considerar el que corresponde a los lugares de absorción.

La representación directa de las concentraciones medias experimentales para cada animal en escala semilogarítmica y para las concentraciones medias (Gráficos 8-14), pone de manifiesto que los niveles de atorvastatina aumentan rápidamente durante la primera fase de absorción del fármaco alcanzando su máximo alrededor de las 0,50 horas, para descender en la fase posterior, hasta las 12 horas aproximadamente y, a partir de este momento disminuyen de forma más lenta, dando lugar a una tercera fase, que podría considerarse monoexponencial y que se mantiene hasta el final del proceso (hasta las 72 horas tras la administración). Este hecho se aprecia más claramente al observar la representación semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (Gráfico 14).

5.3.2.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis compartimental y no compartimental para atorvastatina, se muestran en las Tablas 15 y 18 respectivamente, y van referidos a cada pollo, junto con los valores medios y estadísticos asociados (Tablas 16 y 20). Pasamos a continuación a comentar los parámetros farmacocinéticos más representativos del fármaco tras su administración oral en pollos.

5.3.2.1.- TIEMPOS DE VIDA MEDIA, MRT Y MAT

Al igual que en la vía intravenosa, se ha calculado el tiempo de vida media de la fase de disposición rápida ($t_{1/2K10}$) obteniendo un valor de 17,54 horas (Tabla 16), significativamente superior al que se obtuvo tras la administración del fármaco por la vía intravenosa (4,56 h). Es un hecho frecuente que en los estudios farmacocinéticos, los valores de vida media tras la administración extravascular sean superiores a los obtenidos por la vía intravenosa, entre otras razones, debido a que los procesos de absorción pueden actuar como factores limitantes en los procesos de eliminación.

En la Tabla 20, se presentan los valores correspondientes al MRT y el tiempo medio de absorción (MAT) orales; en tanto que el MRT intravenoso aparece en la Tabla 10. A la vista de los resultados obtenidos para cada uno de estos parámetros en los distintos animales, se puede apreciar como en todos los pollos el valor de MAT es inferior al del MRT intravenoso. Si se consideran los valores medios obtenidos, el MRT intravenoso resulta ser en torno a 2 veces superior al MAT oral. De ello se concluye que, en principio, la absorción, tras la administración oral de atorvastatina, no condiciona su eliminación.

5.3.2.2.- TIEMPO MÁXIMO Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA.

Otro parámetro a tener en cuenta tras la administración oral es el tiempo en que se alcanza la concentración plasmática máxima o tiempo máximo ($T_{\text{máx}}$). El valor de este parámetro ha sido de 2,66 h (Tabla 16). El $T_{\text{máx}}$ es independiente de la dosis administrada, pero sí se modifica en función de la forma farmacéutica administrada y la vía de administración, ya que depende de la constante de absorción. Si comparamos el $T_{\text{máx}}$ con el obtenido en otro biomodelo en ratas (Lau et al., 2006) el valor obtenido es de 0,5 horas, casi 5 veces menor al obtenido en nuestro estudio. Teniendo en cuenta que el $T_{\text{máx}}$ en humanos es de aproximadamente 1 hora (Kantola et al., 1998), vemos como nuestro modelo en pollos, tras la administración oral, se aproxima a los valores en humanos.

En cuanto a la concentración plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$), el valor obtenido para atorvastatina en pollos, ha sido de 3,5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 16). En ratas tras la administración de 2 mg/kg de atorvastatina se obtuvo una $C_{\text{máx}}$ comparable de 0,94 $\mu\text{g/mL}$ (Lau et al., 2006). Hay que tener en cuenta que este parámetro depende de la dosis administrada y por tanto la diferencia está relacionada con los 3 mg/kg administrados en nuestro estudio frente a los 2 mg/kg en ratas.

5.3.2.3.- CONSTANTE DE ABSORCIÓN Y SEMIVIDA DE ABSORCIÓN

En este caso, la constante de absorción aparente (k_{01}) es 15,65 h^{-1} (Tabla 16) y la vida media asociada a la misma ($t_{1/2k01}$) 0,97 h.

Si comparamos el valor obtenido para $t_{1/2k01}$ con el obtenido para $t_{1/2\beta}$ intravenoso, que es 4,85 h (Tabla 6), podemos observar como este último es casi 5 veces mayor, lo que indica que la fase de absorción no condiciona la eliminación de atorvastatina en el pollo. En el hombre se ha encontrado un valor para la constante de absorción de $3,50 \text{ h}^{-1}$ (Narwal et al., 2010).

5.3.2.4.- ÁREA BAJO LA CURVA Y BIODISPONIBILIDAD

El valor del AUC permite calcular la biodisponibilidad (F) del fármaco, tras la administración oral, mediante la siguiente ecuación:

$$F\% = 100 \times \frac{AUC_0^\infty_{EV} / D_{EV}}{AUC_0^\infty_{IV} / D_{IV}}$$

Donde el subíndice EV hace referencia a las vías extravasculares empleadas, en nuestro caso la oral.

La biodisponibilidad obtenida es muy elevada, del orden del $93,43\% \pm 25,14$ (Tabla 16), lo que indica que, posiblemente, todo el fármaco acceda a la circulación sistémica.

En ratas se ha obtenido un valor de 27 % significativamente inferior al obtenido en nuestro estudio (Lau et al., 2006). A este respecto, cabe señalar que las peculiaridades del sistema digestivo de las aves, en este caso de pollos, hace razonable que se puedan producir estas diferencias significativas en los procesos de absorción de la atorvastatina.

5.4.- COMPARACIÓN ENTRE ADMINISTRACIONES

La disposición plasmática de atorvastatina para las vías estudiadas, intravenosa y oral se ajustan mejor a un modelo bicompartimental abierto en el caso de la vía intravenosa y a un modelo monocompartimental en el caso de la vía oral.

5.4.1.- SEMIVIDA EN LA FASE TERMINAL ($t_{1/2\lambda z}$)

Existen diferencias significativas en los valores de la semivida ($p < 0,05$) entre la vía intravenosa y cuando se administra el fármaco por la vía oral. La existencia de diferencias entre las semividas medias en la fase terminal para la vía intravenosa y la oral, pueden explicarse posiblemente, porque la fase de absorción en estas últimas influya lo suficiente en la fase de eliminación del fármaco haciendo que este se elimine más lentamente.

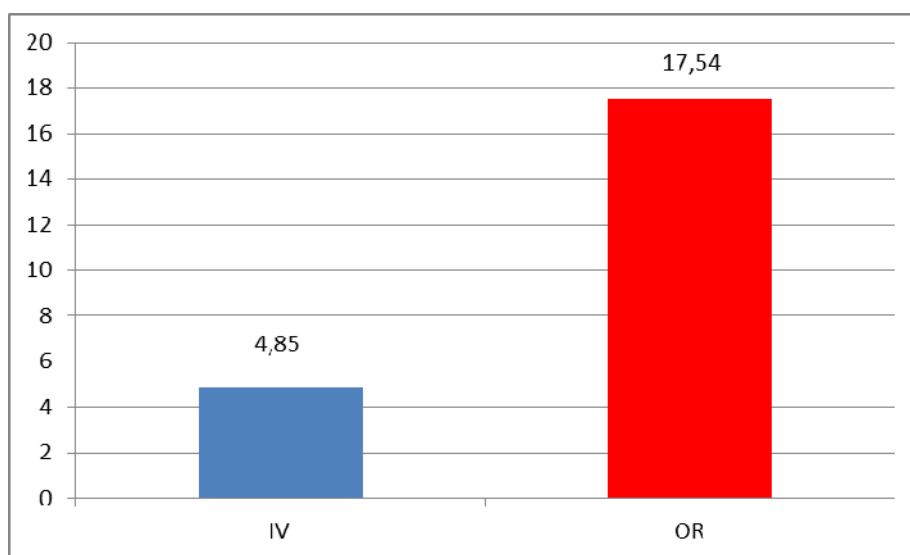


Figura 7.- Tiempos de vida media ($t_{1/2\lambda z}$) obtenidos en pollos tras la administración de atorvastatina vía intravenosa (IV) y oral (OR) a una dosis de 3 mg/kg.

5.4.2.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT)

El MRT se comporta de forma diferente a las semividas descritas anteriormente. Puede observarse la existencia de diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). En la Tabla 20 se observa que el MRT es mayor en la vía oral respecto la vía intravenosa. Esto indica que la permanencia del fármaco es mayor tras la administración oral, y como las concentraciones plasmáticas parecen descender más lentamente en la fase terminal de la curva, tras estas administraciones (gráfica 14), puede ser que la fase responsable del incremento en el MRT sea la fase de ingreso (la absorción) y no la de eliminación (disposición).

A continuación (Figura 8), se presentan de forma gráfica los valores de MRT de la vía intravenosa y oral:

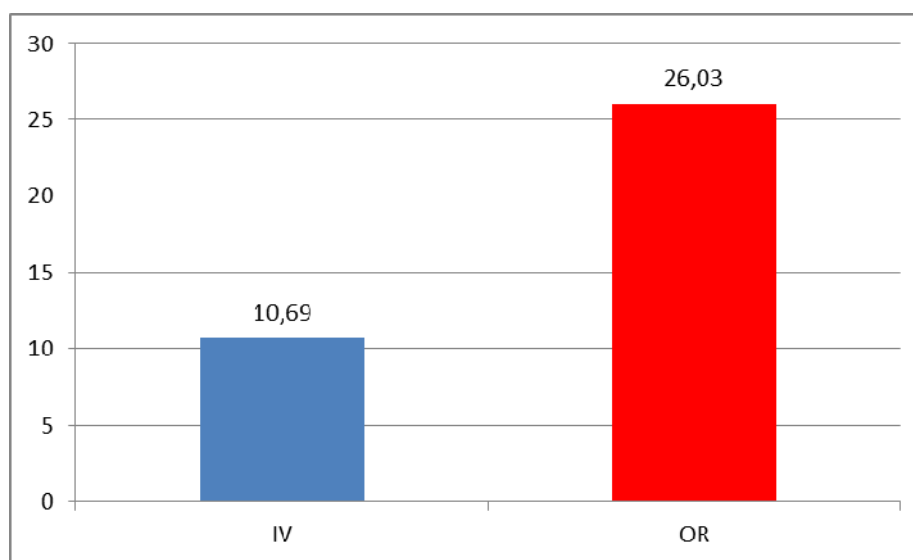


Figura 8.- Tiempo medio de residencia (MRT) obtenido en pollos tras la administración de atorvastatina vía intravenosa (IV) y oral (OR) a una dosis de 3 mg/kg.

5.4.3.- ÁREA BAJO LA CURVA (AUC)

Las pruebas no paramétricas ponen de manifiesto la existencia de diferencias significativas en los valores de AUC obtenidos para atorvastatina en pollos tras la vía intravenosa y oral.

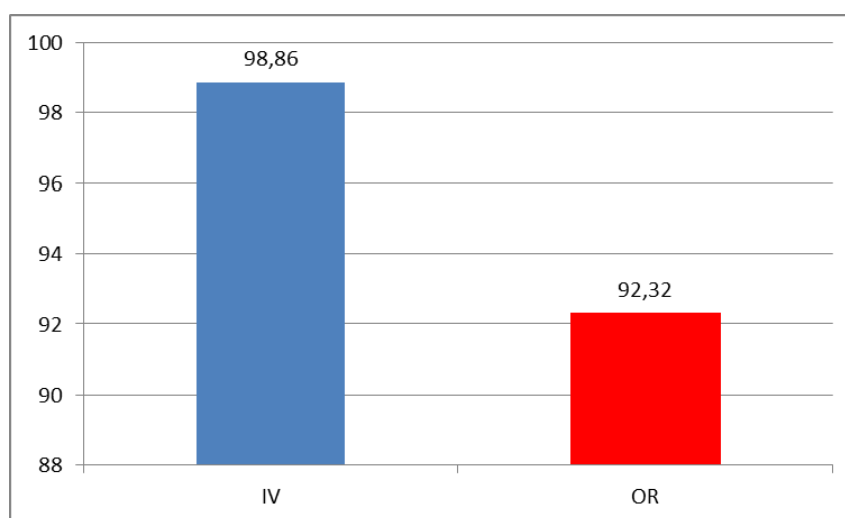


Figura 9.- Área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) obtenidos en pollos tras la administración de atorvastatina vía intravenosa (IV) y oral (OR) a una dosis de 3 mg/kg.

Al comparar los valores de AUC (Figura 9), se puede apreciar que el AUC obtenido tras la administración oral es similar a la intravenosa.

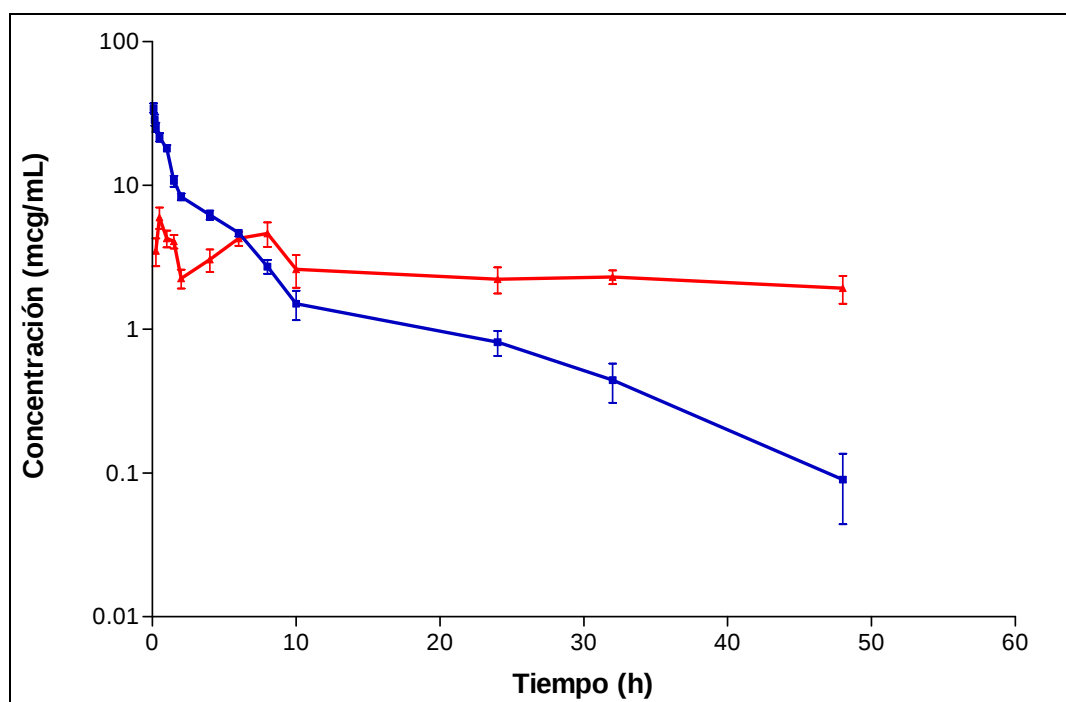


Figura 10.- Comparación de las curvas de niveles plasmáticos obtenidos en pollos tras la administración de atorvastatina vía intravenosa (IV) en azul y oral (OR) en rojo a una dosis de 3 mg/kg.

5.5.- DESCENSO DE LOS PERFILES LIPÍDICOS EN POLLOS TRATADOS CON ATORVASTATINA

En la tabla 21 aparecen los resultados analíticos de los parámetros lipídicos del plasma en los grupos experimentales.

Hemos obtenido una disminución del 33 % de los niveles de colesterol total en el grupo tratado con atorvastatina respecto al grupo control aterogénico.

En conejos y a una dosis semejante a la nuestra, (Bocan et al., 1994, Auerbach et al., 1995) se obtuvieron unas reducciones similares, un 45 % en ambos casos. A dosis mayores, (Auerbach et al., 1995) se aumentó la reducción del colesterol total a un 54 %, con dosis de 10 mg/Kg/d y con dosis de 10 a 25 mg/Kg/d se redujo el colesterol entre un 22 a 47 % (Krause et al., 1995). En gallinas no ponedoras, la reducción de colesterol en sangre respecto al grupo control se situó en torno a un 45% (Elkin et al., 2006).

La disminución del colesterol total se ha producido a expensas del colesterol LDL (LDLc). Hemos obtenido una reducción del 45 % de media en los niveles de LDLc respecto al grupo control.

En cerdos pequeños alimentados con una dieta enriquecida con 0.1 % de colesterol y administrando una dosis igual a la nuestra, obtuvo solamente una reducción del 32 % del LDLc acompañado de una disminución del 16 % de los niveles de colesterol total (Burnett et al., 1997).

Con una dosis de 10 mg/Kg/d. se han conseguido reducciones de LDLc de hasta un 75 %. En conejos normolipémicos y con dosis de 10 mg/Kg/d de atorvastatina obtuvo una disminución del 49 % de colesterol total y 75 % de LDLc (Krause et al.,

1995), sin embargo con la misma dosis pero con lovastatina, hubo una disminución de 28 % de colesterol total y 40 % de LDLc (Krause et al., 1995)

Con dosis de 5 mg/Kg/d. de atorvastatina, el LDLc disminuyó en un 40 % con una reducción de colesterol total de 60 % (Hernández-Presa et al., 1996). En otros estudios, las reducciones han sido menores y con dosis iguales o superiores a las nuestras.

Solamente en un estudio de la revisión bibliográfica realizada, se refiere un ligero aumento de las HDL colesterol al administrar atorvastatina a dosis de 5 mg/Kg/d, aunque no en todos los animales del ensayo (Bocan et al, 1998).

Los niveles de Triglicéridos disminuyeron solamente en el grupo con dieta normal. En la mayoría de los estudios revisados se obtienen disminuciones de los niveles de triglicéridos entre un 19 a 70 % con dosis de atorvastatina que oscilaban de 2.5 a 10 mg/Kg/d.

En un estudio con gallinas no ponedoras, la reducción de triglicéridos fue del 70,1% en el grupo control, mientras que la reducción fue del 34,3% en el grupo alimentado con una dieta enriquecida en colesterol (Elkin et al., 2006). En otro estudio realizado con ratas tratadas con atorvastatina a dosis de 10 mg/Kg, la reducción de triglicéridos en sangre fue del 35% (Sanguino et al., 2005)

Conclusiones

- 1.- El comportamiento farmacocinético de atorvastatina tras su administración intravenosa y oral en pollos, a una dosis única de 3 mg/kg, se ajusta a un modelo bicompartimental abierto en el caso de la administración intravenosa y monocompartimental en el caso de la administración oral.
- 2.- Las semividas en la fase terminal ($t_{1/2}$) obtenidas para atorvastatina para las dos vías de administración son: IV (4,85 h), y OR (17,54 h), que son significativamente diferentes. Por otro lado, el MRT, adquiere, respectivamente, los siguientes valores: 10,69 h (IV) y 26,03 h (OR). La permanencia de atorvastatina resulta, aproximadamente 2,5 veces, tras la administración oral.
- 3.- La depuración plasmática de atorvastatina en pollos medida por el aclaramiento corporal (Cl) adquiere un valor de 30,99 L/kg·h, tras su administración intravenosa.
- 4.- Los valores del volumen de distribución aparente en función del área bajo la curva ($V_z = 603,50$ mL/kg) y en el estado estacionario ($V_{ss} = 320,62$ mL/kg) de atorvastatina tras la administración por vía intravenosa, indican que existe una buena distribución del fármaco y un buen acceso a los tejidos y fluidos en esta especie.
- 5.- La constante de absorción obtenida para atorvastatina tras la administración oral ha sido: $15,65 \text{ h}^{-1}$, por lo que estamos ante una rápida absorción. La concentración plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$), obtenida para atorvastatina en pollos fue de 3,50 µg/mL, lo cual corrobora las buenas características de absorción de este fármaco en pollos.

6.- La biodisponibilidad (F) de atorvastatina, tras su administración oral en pollos es del 93,38%.

7.- Los datos farmacocinéticos obtenidos validan el biomodelo para su utilización con pollos a los que posteriormente se somete a un proceso arteriosclerótico en el cual se evalúa la eficacia de la atorvastatina como agente hipolipemiente. Dentro de los parámetros obtenidos, el valor de biodisponibilidad cercano el 100% hace que el modelo pueda validarse en su régimen de dosificación, evitando la extrapolación de las dosis en humanos.

Resumen

Se ha estudiado el comportamiento cinético de atorvastatina en pollos tras la administración por las vías intravenosa y oral de una dosis de 3 mg/kg de este fármaco hipolipemiente, con el fin de validar la dosis a utilizar en el biomodelo animal utilizado.

La determinación de atorvastatina en plasma se realizó mediante HPLC con detección ultravioleta, siguiendo el método descrito por Siefert (1999), modificado para atorvastatina. El ajuste a métodos farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales se realizó mediante el programa WinNonlin Professional®. El criterio utilizado para determinar cuál era la ecuación que mejor describía la evolución de los datos experimentales en cada caso, fue el Criterio de Información de Akaike (AIC) (Yamaoka et al., 1978).

Tras la administración intravenosa, atorvastatina se distribuye según un modelo bicompartimental abierto, a diferencia del modelo monocompartimental descrito para la vía oral.

Tras la administración intravenosa, la vida media obtenida para el atorvastatina ($t_{1/2\lambda_z}$) fue de 4,85 h con un tiempo medio de residencia (MRT) de 10,69 h. Los volúmenes aparentes de distribución calculados en función del área bajo la curva (V_z) y en estado estacionario (V_{ss}) resultaron ser de 0,60 L/kg y 0,32 L/kg respectivamente, indicando una amplia distribución orgánica. En cuanto al aclaramiento plasmático (Cl), éste alcanzó un valor de 30.99 mL/kg•h.

Por vía extravascular, cuando se administró atorvastatina por vía oral, se registraron los siguientes tiempos de vida media: 17,54 h con un valor de MRT de 26,03 horas.

La biodisponibilidad de atorvastatina cuando se administró por vía oral alcanzó un valor de 93.38 %.

En el estudio del descenso de los perfiles lipídicos en pollos tratados con atorvastatina, los resultados analíticos de los parámetros lipídicos del plasma en los grupos experimentales dieron como resultado una disminución del 33 % de los niveles de colesterol total en el grupo tratado con atorvastatina respecto al grupo control aterogénico.

Summary

Pharmacokinetics of atorvastatin was studied following intravenous and oral administration of single doses of 3 mg/kg to chickens.

Plasma concentrations were determined by HPLC assay with ultraviolet detection following the method described by Siefert et al(1999) modified for atorvastatin. The fitting to compartmental and non compartmental pharmacokinetic methods was carried out by using WinNonlin Professional® computer programmes. The Akaike's information criterion (AIC) (Yamaoka et al., 1978) was used to select the best equation that defines plasma concentration-time data for each animal.

The atorvastatin plasma concentration is distributed by a two compartment open model for intravenous dosing, unlike one-compartment model that could best be described for oral administration.

The atorvastatin terminal half-life ($t_{1/2\alpha}$) was 4.85 h after intravenous administration, with a mean residence time (MRT) of 10.69 h. The apparent volumes of distribution calculated by the area method (V_z) and at steady-state (V_{ss}) were 0.60 and 0.32 L/kg, respectively, indicating a wide body distribution. Total body clearance was 30.99 mL/kg•h.

After extravascular administrations, terminal half-lives was 17.54 h. MRT value obtained was 26.03 h.

Absolute bioavailability was 93.38 % after atorvastatin oral administration.

Pharmacokinetic values obtained in this work confirm the validity of the animal model (chickens fed hypercholesterolemic diets to induce atherosclerosis) and make it suitable for atorvastatin intervention studies. The biodisponibility value near to 100%

makes it possible to use its own dosage regimen, avoiding extrapolation from human dosage.

We can see as well that the values of serum total cholesterol decrease in 33% in the group treated with atorvastatin versus those fed hypercholesterolemic diets.

Bibliografía

- ADANEZ, G., CASTELLS, M.T., GARCÍA PEREZ, B., SÁNCHEZ-POLO, M.T., MARTÍN CASTILLO, A., MONTES, A., AYALA, I. 2008. Effects of atorvastatin on progression-regression of renal injury in hyperlipidemic chickens. *Histopathol.* 23: 1131-1142.
- ALAUPOVIC, P., 1971: Apolipoproteins and lipoproteins. *Atherosclerosis*, 13 (2): 141-146.
- ALBERTS, A.W., CHEN, J., CURON, G., HUNT, V., HUFF, J., HOFFMAN, C., ROTHROCK, J., LÓPEZ, M., JOSHAU, H., HARRIS, E., PATCHETT, A., MONAGHAN, R., CURRIE, S., STAPLEY, E., ALBERS-SCHÖNBERG, G., HENSENS, O., HIRSHFIELD, J., HOOGSTEN, K., LIESCH, J., SPRINGER, J. 1980. Mevanolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzymeA reductase and cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 3957-3961.
- ALEGRET, M., VERD, J.C., DIAZ, C., HERNÁNDEZ, G., ADZET, T., SÁNCHEZ, R.M., LAGUNA, J.C. 1998. Effect of hypolipidemic drugs on key enzyme activities related to lipid metabolism in normolipidemic rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* 347: 283-291.
- ALTUNTAS, T.G., ERK, N. 2004. Liquid chromatographic determination of atorvastatin in bulk drug, tablets and human plasma. *J Liq. Chromatogr.* RT 27: 83-93.
- AMENTO, EP., EHSANI, N., PALMER, H., LIBBY, P. 1991. Cytokines positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 11: 1223-1230.
- AMIDON, GL., LENNERNÄS, H., SHAH, V., 1995. Theoretical considerations in the correlation of drug product dissolution and in vivo bioavailability: a biopharmaceutical drug classification. *Pharm res.* 12: 413-420.
- ANDERSON, TJ. MEREDITH, IT., YEUNG, AC., FREI, B., SELWYN, AP., GANZ, P. 1995. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med.* 332: 488-493.

- ANDREWS, TC., RABY, K., BARRY, J. 1997. Effect of cholesterol reduction on myocardial ischemia in patients with coronary disease. 95: 324-328.
- AOKI, I., AOKI, A., KAWANO, K. 1997. Platelet-dependent thrombin generation in patients with hyperlipidemia. J Am Coll Cardiol. 30: 91-96.
- ARMSTRONG, ML., WARNER, E., CONNOR, W. 1970. Regression of coronary atheromatosis in Rhesus monkeys. Circ Res. 27: 59-67.
- AKSULU, E., SELIM, C., TURKER, R.A. 1986. Cholesterol feeding attenuates endothelium-dependent relaxation response to acetylcholine in the pulmonary artery of chickens. Eur. J. Pharmacol. 129(3): 397-400.
- ATKINSON, A.J., KUSHNER, W. 1979. Clinical Pharmacokinetics. Ann Rev Pharmacol Toxicol. 19: 105-127.
- AUERBACH, A.J., KRAUSE, B.R., BISGAIER, C.L., NEWTON, R.S. 1995. Comparative effects of HMGCoA-reductase inhibitors on ApoB production in the casein fed rabbit: Atorvastatin versus lovastatin. Atherosclerosis. 115: 173-180.
- AUKEN, MV., FUE, TL., FERSTEIN, GZ., ONLSTEIN, E. 1995. Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF_κB inhibit human vascular smooth muscle cell adherence and proliferation and prevent neointima formation in rat carotid arteries. Biochem Biophys Res Comcenor. 213: 827-836.
- AYALA, I., GUTIERREZ-PANIZO, C., DE MEMBIELA, F., MONTES, A. 2000. El uso de modelos animales en el estudio de la arteriosclerosis humana. Rev Exp Anim 10-11 (1-2): 53-58.
- AYALA, I., GARCÍA PEREZ, B., DOMÉNECH, G., MONTES, A.M., ORTEGA, N. ORTEGA, J.V. SÁNCHEZ POLO, M.T. 2003. Uso del pollo como biomodelo experimental en arteriosclerosis. An Vet. 19: 99-108.
- AYALA, I., GARCÍA PÉREZ, B., DOMÉNECH, G., SÁNCHEZ POLO, MT., ORTEGA, JV., CASTELLS, MT. 2004. Estudio comparativo de diversos métodos de inducción de aterogénesis experimental en el pollo. An Vet. 20: 123-127.

- AYALA, I., GARCÍA PÉREZ, B., GOMÉNECH, MT., CASTELLS, MT., VALDÉS, M. 2005. Use of the chicken as an experimental animal model in atherosclerosis. *Avian and Poultry Biology Reviews*. 16: 151-159.
- AYALA, I., MARTÍN CASTILLO, A., ADÁNEZ, G., FERNÁNDEZ-RUFETE, A., GARCÍA PÉREZ, B., CASTELLS, MT. Hyperlipidemic Chicken as a model of non-alcoholic steatohepatitis. 2009. *Exp Biol Med*, 234 (1): 10-16.
- BABAEV, VR., BOBRYSHEW, YV., SUKHOVA, GK., KASANTSEVA, JA. 1993. Monocyte/macrophage accumulation and smooth muscle cell phenotypes in early atherosclerotic lesions of human aorta. *Atherosclerosis*. 100: 237-248.
- BACHORIK, P.S., VIRGIL, D.G., KWITEROVICH, P.O., 1987: Effect of apolipoprotein E-free high density lipoproteins on cholesterol metabolism in cultured pig hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 262 (28): 13636-13645.
- BACHORIK, P.S., KWITEROVICH, P.O., 1988: Apolipoprotein measurements in clinical biochemistry and their utility vis-a-vis conventional assays. *Clin. Chim. Acta*. 178 (1): 1-34.
- BADIMON, J.J., BADIMON, L., FUSTER, V. 1990. Regression of atherosclerosis by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J. Clin. Invest.* 85: 1234-1241.
- BAEVERLE, PA., HENKEL, T. 1994. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Ann Rev Immunol*, 12: 141-179.
- BAKER-ARKEMA, R.G., DAVIDSON, M.H., GOLDTEIN, R.J., DAVIGNON, J., ISACSOLIN, J.C., WEISS, S.R. 1996. Efficacy and safety of a new HMGCoA-reductase inhibitor, atorvastatin, in patients with hypertriglyceridemia. *JAMA*. 275: 128-133.
- BANDO, T., MITANI, H., NIIHASHI, M., KUMUSI, N., ISHIKAWA, J., KIMURA, M. 1996. Inhibitory effect of fluvastatin at doses insufficient to lower serum lipids on the catheter induced thickening of intima in rabbit femoral artery. *Eur J Pharmacol*. 315: 37-42.

- BARNES, PJ, KANH, M. 1997. Nuclear factor - κ B, a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*, 336: 1066-1071.
- BEIGEL, Y., FUCHS, J., SNIR, M., GRREN, P., LURIE, Y., DJALDETTI, M. 1991. Lovastatin therapy in hypercholesterolemia: effect on fibrinogen, hemorrheologic parameters, platelet activity and red blood cell morphology. *J Clin Pharmacol*. 31: 512-517.
- BERLINER, JA., NAVAB, M., FOGELMAN, AM. 1995. Atherosclerosis: basic mechanisms oxidation, inflammation and genetics. *Circulation*. 91: 2488-2496.
- BERNINI, F., DIDONI, G., BONFADINI, G., BELLOSTA, S., FUMAGALLI, R. 1993. Requirement for mevalonate in acetylated LDL induction of cholesterol esterification in macrophages. *Atherosclerosis*. 104: 19-26.
- BEST, J.D., NIDOLSON, G.C., O'NEAL, D.N., KOTOWICZ, M.A., TEBBUT, N.C., CHAN, K-W. 1996. Atorvastatin and simvastatin reduce elevated cholesterol in non-insulin dependent diabetes. *Diab Nutr Metab* 9: 78-80.
- BLANKENHORN, DH., AZEN, SP., KRAMSCH DM. 1993. Coronary angiographic changes with lovastatin therapy the Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS). *Ann Intern Med*, 119: 969-976.
- BOCAN, TM., MAZUR, MJ., MUELLER, SB., BROWN EQ., SLISKOVIC DR., ET AL. 1994. Antiatherosclerotic activity of inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in cholesterol-fed rabbits: a biochemical and morphological evaluation. *Atherosclerosis*. 111 (1): 127-142.
- BOCAN, TM., MUELLER, SB., BROWN, EQ., LEE, P., BOCAN, MJ., REA, T. ET AL. 1998. HMG-CoA reductase and ACAT inhibitors act synergistically to lower plasma cholesterol and limit atherosclerotic lesion development in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis*. 139(1): 21-30.
- BROWN, A.G., SMALE, T.C., KING, T.J., HANSENKAMP, R., THOMPSON, R.H., 1976: Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*. *J. Chem. Soc. Perkin*. 1: 1165-1170.

- BROWN, M.S., KOVANEN, P.T., GOLDSTEIN, J.L., 1981: Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*, 212: 628-635
- BROWN, DL., HIBBS, MS., KEARNEY, M., LOUSHIN, C., ISNER, JM. 1995. Identification of 92-kDa gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with suitable angina. *Circulation*. 91: 2125-2131.
- BROZE, GJ. 1992. The role of tissue factor pathway inhibitor in a revised coagulation cascade. *Semin Hematol*. 29: 159-169.
- BUJO, H., YAMAMOTO, T., HAYASHI, K., HERMANN, M., NIMPF, J., SCHNEIDER, WJ. 1995. Mutant oocyte low density lipoprotein receptor gene family member causes atherosclerosis and female sterility. *Proc Natl Acad Sci*. 92: 9905-9909.
- BULLEN, W.W., MILLER, R.A., HAYES, R.N. 1999. Development and validation of a high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for atorvastatin, ortho-hydroxy atorvastatin, para-hydroxy atorvastatin in human, dog, and rat plasma. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 10: 55-66.
- BURNETT, JR., WILCOX, LJ., TELFORD, DE., KLEINSTIVER, SJ., HUGH, P., BARRETT, P., ET AL. 1997. Inhibition of HMG-CoA reductase by atorvastatin decreases both VLDL and LDL apolipoprotein B production in miniature pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11): 2589-2600.
- BURLEIGH, MC., BRIGGS, AD., LENDON, CL., DAVIES, MJ., BORN, GV., RICHARDSON, PD. 1992. Collagen types I and III, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: span-wise variations. *Atherosclerosis*. 96: 71-81.
- BUSTOS, C., HERNÁNDEZ-PRESA, MA., ORTEGA, M., ORTEGA, L., GUIJARO, C. 1997. Atorvastatin reduces lesion size and macrophage content in a rabbit model of atherosclerosis and attenuates NF- κ B activation and MCP-1 expression in cultured. *Atherosclerosis*, 130: 57.

- CARMENA, R. 1995. Papel de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa en el tratamiento actual de las hiperlipidemias. *Revista Española de Cardiología*. 48 (1): 59-65.
- CASTELLI, W.P., GARRISON, R.J., WILSON, P.W.F., ABBOTT, R.D., KALOUSDIAN, S., KANNEL, W.B. 1986. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. *JAMA*. 256: 2835-2838.
- CHEN, LY., MEHTA, P., MEHTA, JL. 1996. Oxidized LDL decreases L-arginine uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets; relevance of the effect of oxidized LDL on platelets function. *Circulation*. 93: 1740-1746.
- CHENG, GC., LOREE, HM., KAMM, RD., FISHBEIN, MC., LEE, RT. 1993. Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions: a structural analysis with histopathological correlation. *Circulation*. 87: 1179-1187.
- CHIN, JH., AZHAR, S., HOFFMAN, BB. 1992. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Chin Invest*. 89: 10-18.
- CHRISTIANS, U., JACOBSEN, W., FLOREN, LC. 1998. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the statins mechanistically similar?. *Pharmacol Ther*. 80: 1-34.
- CLARKSON, TB., BOND, MG., BULLOCK, BC., MARZETTA, CA. 1971. A study of atherosclerosis regression in *Macaca mulatta*. *Exp Mol Pathol*. 34: 345-368.
- CONDE, K., VERGARA-JIMÉNEZ, M., KRAUSE, B.R., NEWTON, R.S., FERNÁNDEZ, M.L. 1996. Hypercholesterolemia actions of atorvastatin are associated with alterations on hepatic cholesterol metabolism and lipoprotein composition in guinea pigs. *J. Lipid. Res*. 37: 2372-2382.
- CORSINI, A., RAITERI, M., SOMA, M., FUMAGALLI, R., PAOLETTI, R. 1991. Simvastatin but not pravastatin inhibits the proliferation of rat aorta myocytes. *Pharm Res*. 23: 173-180.

- CORSINI, A., PAZZUCCONI, F., PFISTER, P., PAOLETTI, R., SIRTORI, CR. 1996. Inhibitor of proliferation of arterial smooth-muscle cells by fluvastatin. *Lancet*. 348: 1584.
- DAVI, G., AVERNA, M., NOVO, S. 1989. Effects of synvinolin platelet aggregation and thromboxane B2 synthesis in type IIa hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*. 79: 79-83.
- DAVIDSON, M., MCKENNEY, J., STEIN, E. 1997. Comparison of one-year efficacy and safety of atorvastatin versus lovastatin in primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 79: 1475-1481.
- DEGRAAF, J., HAK-LEMMERS, HLM., HECTORS, MPC., DEMAKER, PCM., HENDRIKS, JCM., STALENHOF, AFH. 1991. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subtraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb*. 11: 298-306.
- DOMÉNECH BERROZPE, J. 1997. Biofarmacia y farmacocinética.
- DOWELL, F.J., HAMILTON, C.A., LINDOP, G.B., REID, J.L. 1995. Development and progression of atherosclerosis in aorta from heterozygous and homozygous WHHL rabbits. Effects of simvastatin treatment. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 15(8): 1152-1160.
- DREXFER, H., ZEIHNER, AM. 1991. Endothelial function in human coronary arteries in vivo. Focus on hypercholesterolemia. *Hypertension*. 18: 90-99.
- EGASHIRE, K., HIROOKA, Y., KAI, H. 1994. Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation*. 89: 2519-2524.
- EICHSTADT, HW., ESKOTTER, H., HOFFMANN, I., AMTHAUER, HW., WEIDINGER, G. 1995. Improvement of myocardial perfusion by short-term fluvastatin therapy in coronary artery disease. *Am J Cardio*. 76: 122-125.
- ELKIN, RG., ZHONG, Y., DONKIN, SS., HENGSTWSCHLÄGER-OTTNAD, E., SCHNEIDER, WJ. 2006. Effects of atorvastatin on lipid metabolism in

- normolipidemic and hereditary hyperlipidemic, non-laying hens. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 143 (3): 319-329.
- ENDO, A., KURODA, M., 1976a: Citrinin, an inhibitor of cholesterol synthesis. *J. Antibiot (Japan).* 29: 841-843.
- ENDO, A., KURODA, M., TSUJITA, Y., 1976b: ML-236-A, ML-236-B and ML-236-C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot. (Japan).* 29: 1346-1348
- ENDO, A. 1979: Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Antibiot (Japan).* 33: 334-336.
- FABRICANT, C.G., FABRICANT, J. 1999. Atherosclerosis induced by infection with Marek's disease herpesvirus in chickens. *Am. Heart. J.* 138: S465-468.
- FALK, E., SHALE, PK., FUSTER, V. 1996. Pathogenesis of plaque disruption. En: Fuster v, Ross R, Topol EJ. *Atherosclerosis and coronary artery disease.* Philadelphia Lippincott Raven. 491-507.
- FERNÁNDEZ-ORTIZ, A., BADIMON, JJ., FALK, E. 1994. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol.* 23: 1562-1569.
- FERNÁNDEZ-VARON, E., BERMEJO, R., AYALA, I., GARCÍA-PEREZ, B., TVARIJONAVICIUTÈ, A., CÁRCELES, C. 2005. Desarrollo y validación de una técnica de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de atorvastatina en plasma en un biomodelo experimental de arteriosclerosis en pollo. *Clin. Invest. Arterioscl.* 17(5): 223-227.
- FRID, MG., DEMPSEY, EC., DURMOWICZ, AG., STENMARK, KR. 1997. Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels. Importance in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 1203-1209.
- GARCÍA, S., SORIA, M.L. 2002. Extracción en fase sólida y determinación de atorvastatina en suero por HPLC con detección por UV y fluorescencia. *Rev Toxicol.* 19:109.

- GARDNER, CD., FORTMANN, SP., KRAUSS, RM. 1996. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA*. 276: 875-881.
- GIBALDI, M., PERRIER, P. 1982. *Pharmacokinetics* 2nd ed. Marcel Dekker. New York
- GIBSON, DM., BRON, NJ, RICHENS, A. 1996. Effect of age and gender on pharmacokinetics of atorvastatin in humans. *J Clin Pharmacol*. 36: 242-246.
- GIBSON, DM., STERN, RH., ABEL, RB. 1997. Absolute bioavailability of atorvastatin in man. *Pharm Res*. 14: S253.
- GLASS, C., PITTMAN, T.C., WEINSTEIN, D.B., STEINBERG, D., 1983: Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal and gonad. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.S.*, 80 (17): 5435-5439.
- GREEN, P.H.R., GLICKMAN, R.M. 1981: Intestinal lipoprotein metabolism. *J.Lipid Res*. 22: 1153-1173.
- GUIJARRO, C., KIM, Y., SHOONORES, CM., MASSY, ZA., O'DONNELL, MP., KASISKE, BL. 1996 Lovastatin inhibits lypopolysaccharide-induced NF- κ B activation in human mesangial cells. *Nepherol Dial Transplant*. 11: 990-996.
- GUIJARRO, C., ORTEGA, M., ORTIZ, A., HERNÁNDEZ-PRESO, MA., BUSTOS, C., DIAZ, C. 1997. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin induces apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture Role of isoprenoids of the mevalonate pathway. *Atherosclerosis*. 130: 57
- GUPTA, P.P., GREWAL, G.S. 1980. Spontaneous atherosclerosis in chicken. *Indian J. Med. Res*. 71: 410-415.
- GUZMÁN AROCA, F., AYALA, I., SERRANO, L., BERNÁ-SERNA, J.D., CASTELL, MT., GARCÍA-PÉREZ, B., REUS, M. 2010. Assessment of liver steatosis in chicken by using acoustic radiation force impulse imaging: preliminary results. *Eur Radiol* 20(10): 2367-2371.

- HADJIISKY, P., BOURDILLON, M.C., GROSGOGEAT, Y. 1991. Experimental models of atherosclerosis. Contribution, limits and trends. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 84: 1593-1603.
- HANSSON, GK., HOLM, J., JONASSON, L. 1989. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol.* 135: 169-175.
- HARSHC, M., BRAESEN, J.H., NIENDORF, A. 1997. Effects of low-dose pravastatin sodium on plasma cholesterol levels and aortic atherosclerosis of heterozygous WHHL rabbits fed a low cholesterol (0,03%) enriched diet for one year. *Atherosclerosis.* 128 (2): 139-147.
- HASEGAWA, K., NISHIMURA, H. 1991. Humoral factor mediated acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxation of chicken aorta. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84(1): 164-169.
- HAVEL, R.J., 1980: Lipoprotein biosynthesis and metabolism. *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 348: 16-29.
- HEINRICH, J., BALLAISEN, L., SCHULTE, H., ASSMAN, G., VAN DE LOO, J. 1994. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk results from the PROCAM Study in healthy men. *Arterioscler Thromb.* 14: 54-59.
- HERNANDEZ-ESPINOSA, D., AYALA, I., CASTELLS, M.T., GARCÍA-PEREZ, B., MARTÍN-CASTILLO, A., MIÑARRO, A., ARCAS, I., VICENTE, V., CORRAL, J. 2006. Intracellular retention of hepatic serpins caused by severe hiperlipidemia. *Liver Int.* 26(6): 708-715.
- HERNÁNDEZ-PRESA, MA., BUSTOS, C., ORTEGO, M., TUNON, J., GUIJARRO, C., DIAZ, C. ET AL. 1996. Atorvastatin abolishes macrophage infiltration and reduces neointimal formation and MCP-1 expression in a rabbit model of atherosclerosis. Role of nuclear factor Kappa-B. *Circulation. Suppl I.*
- HERNÁNDEZ-PRESA, MA., BUSTOS, C., ORTEGA, M., TUÑÓN, J., RENEDO RUIZ-ORTEGA, M. 1997. Angiotensin converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor- κ B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression

- and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation*, 95: 1532-1541.
- HORLICK, L., KATZ, L.N. 1949. Retrogression of atherosclerotic lesions on cessation of cholesterol feeding in the chick. *J. Lab. Clin. Med.* 34: 1427-2472.
- HUNNINGHAKE, D.B., MILLER, V.T., GOLDBERG, I., SCHONFELD, G., STEIN, E.A., TOBERT, J.A. 1988. The lovastatin study group II lovastatin follow-up ophthalmological data. *JAMA*. 259: 354-356.
- ISHIGAMI, M., HONDA, T., TAKASAKI, W. 2001. A comparison of the effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors on the CYP3A4-dependent oxidation of mexazolam in vitro. *Drug Metab Dispos.* 29: 282-288.
- ISTVAN, E. 2003. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atherosclerosis*. 4: 3-8.
- JEMAL, M., OUYANG, Z., CHEN, B., TEITZ, D. 1999. Quantification of the acid and lactone forms of atorvastatin and its biotransformation products in human serum by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 13: 1003-1015.
- KANTOLA, T., KRIVISTÖ, K.T., NEUVONEN, P.J. 1998. Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacol Ther.* 64: 58-65.
- KATZ, L.N., STAMLER, J. 1953. *Experimental atherosclerosis*. CC Thomas, Springfield, Illinois, p 127.
- KEARNEY, AS., CRAWFORD, LF., METHA, SC. 1993. The interconversion kinetics, equilibrium and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981. *Pharm Res* 10: 1461-1465.
- KEMPEN, HJM., VERMEER, M., DE WIT, E., HAVEKES, LM. 1991. Vastatins inhibit cholesterol ester accumulation in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb.* 11: 146-153.
- KEYS, A., 1980: *Seven Countries: a multivariant analysis of death and coronary heart diseases*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 1-381.

- KIMURA, M., KUROSE, I., RUSSELL, J., GRANGER, DN. 1997. Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 1521-1526.
- KHACHADURIAN, A.K., SHIMAMURA, T., ROZOVSKI, S.J., ANANTHAKRISHNAN, T., ARMENIAN, B., COLY, E., HALINAI, A., MARTUCCI, C., SCHNEIDER, S.H., AMAROSA, L.F. 1991. Pravastatin decreases serum lipids and vascular cholesterol deposition in Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits. *Japan Heart J.* 32 (5): 675-685.
- KOBASHIGAWA, JA., KATZNELSON, S., LASK, H. 1995. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med.* 333: 621-627.
- KOSTNER, K.M., SMITH, J.L., DWIVEDY, A.K., SHAFEY, T.M., FANG, N.X., MAHON, C.I. 1997. Lecithin-cholesterol acyltransferase activity in normocholesterolaemic and hypercholesterolaemic rossters: modulation by lipid apheresis. *Eur. J. Clin. Invest.* 27: 212-218.
- KRAUSE, B.R., NEWTON, R.S. 1995. Lipid lowering activity of atorvastatin and lovastatin in rodent species: triglyceride-lowering in rats correlates with efficacy in LDL animal models. *Atherosclerosis.* 117: 237-244.
- LA VILLE, A.E., SEDDON, A.M., SHAIKH, M., ROWLES, P.M., WOOLF, N., LEWIS, B. 1989. Primary prevention of atherosclerosis by lovastatin in a genetically hyperlipidaemic rabbit strain. *Atherosclerosis,* 78 (2-3): 205-210.
- LACOSTE, L., LAM, JYT., HUNG, J. 1995. Hyperlipidemia and coronary disease correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation.* 92: 3172-3177.
- LAROSA, J.C., LEVY, R.I., HERBERT, P., LUX, S.E., FREDRICKSON, S.E., 1970: A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Res. Commun.,* 41 (1): 57-62.
- LAU, Y., OKOCHI, H., HUANG, Y., BENET. L. 2006 Pharmacokinetics of atorvastatin and its hydroxyl metabolites in rats and the effects of concomitant rifampicin single doses: relevance of first-pass effect from hepatic uptake

- transporters, and intestinal and hepatic metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*. 34 (7): 1175-1181.
- LE QUAN SANG, KH., LEVENSON, J., MEGNIEN, JL., SIMON, A., DEVYNCK, MA. 1995. Platelet cytosolic Ca^{2+} and membrane dynamics in patients with primary hypercholesterolemia: effects of pravastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 15: 759-764.
- LEA, A.P., McTAVISH, D. 1997. Atorvastatin, a review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of hyperlipidaemias. *Drugs*. 53: 828-847.
- LENNERNÄS, H. 1997. Human jejunal effective permeability and its correlation to preclinical drug absorption models. *J Pharm Pharmacol*. 49: 627-638.
- LENNERNÄS, H. 2003. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacokinet*. 42 (13): 1141-1160.
- LESNIK, P., VONICA, A., GUERIN, M., MOREAU, M., CHAPMAN, MJ. 1993. Anticoagulant activity of tissue factor pathway inhibitor in human is preferentially associated with dense subspecies of LDL and HDL. *Arterioscler Thromb*. 13: 1066-1075.
- LIAO, F., ANDALIBI, A., DEBEER, FC., FOGELMAN, AM., LUSIS, AJ. 1993. Genetic control of inflammatory gene induction and NF- κ B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest*, 91: 2572-2579.
- LILJA, JJ., KIVISTO, KT., NEUVONEN, PJ. 1999. Grapefruit juice increases serum concentrations of atorvastatin and has no effect on pravastatin. *Clin Pharmacol Ther*. 66(2): 118-127.
- LIPID RESEARCH CLINICS PROGRAM. 1988: The lipid research clinics coronary primary prevention trial results 1, reduction in the incidence of coronary heart disease. *JAMA*, 251: 351-364.
- LUCAS, A., YUE, W., JIANG, XY., YAN, W., BAUER, J., SHNEIDER, W., CHAGPAR, A., DAI, E., PERK, M., MONTAGUE, P., GARBUTT, M., RADOSAVJEVIC, M. 1996. Development of avian models for restenosis. *Atherosclerosis*. 119: 17-41.

- MACKNESS, B., DUMUGTON, PN., MACNESS, MI. 1998. Lack of protection against oxidative modification of LDL by avian HDL. *Biochem Biophys Res Commun.* 247(2): 443-446.
- MALHOTRA, HS., GOA, KL. 2001. Atorvastatin: an updated review of its pharmacological properties and use in dyslipidaemia. *Drugs.* 61: 1835-1881.
- MARAIS, AD., FIRTH, JC., BATEMAN, ME., BYRNES, P., MARTENS, C., MOUNTNEY, J. 1997. Atorvastatin: an effective lipid-modifying agent in familiar hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 1527-1531.
- MARTÍN-CASTILLO, A., CASTELLS, M.T., ADANEZ, G., SÁNCHEZ POLO, M.T., GARCÍA PEREZ, B., AYALA, I. 2010. Effect of atorvastatin and diet on non-alcoholic fatty liver disease activity score in hyperlipidemic chickens. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 64: 275-281.
- MAYER, J., ELLER, T., BRAUER, P. 1992. Effects of long-term treatment with lovastatin on the clotting system and blood platelets. *Am Hematol.* 64: 196-201.
- MILLER, BD., ALDERMAN, EL., HASKELL, WL., FAIR, JM., KRAUSS, RM. 1996. Predominance of dense low-density lipoprotein particles predicts angiographic benefit of therapy in the Stanford Coronary Risk Intervention Project. *Circulation.* 94: 2146-2153.
- MORENO, P., FALK, E., PALACIOS, IF., NEWELL, JB., FUSTER, V., FALLOND, I. 1994. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. *Circulation.* 96: 71-81.
- NAOUMOVA, R.P., MARAIS, A.D., MOUNTNEY, J., FRITH, J.C., RENDEL, N.B., TAYLOR, G.W., THOMSON, G.R. 1996. Plasma mevalonic acid, an index of cholesterol synthesis in vivo, and responsiveness to HMG-CoA reductase inhibitors in familiar hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 119: 203-213.
- NARWAL, R., AKHLAGHI, F., ASBERG, A., HERMANN, M., ROSENBAUM, SE. 2010. Development of a population pharmacokinetic model for atorvastatin acid and its lactone metabolite. *Clin Pharmacokinet.* 49 (10): 693-702.

- NAVAB, M., BERLINER, J.A., WATSON, A.D. 1996. The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak: a review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16: 831-842.
- NAWROCKI, J.W., WEISS, S.R., DAVIDSON, M.H., SPREDIER, D.L., SCHWARTZ, S.L., LUPIEN, P. 1995. Reduction of LDL cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin, a new HMGCoA reductase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15:678-682.
- NEGRE-AMINOUX, P., VAN VLIET, A.K., VAN ERCK, M. 1997. Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors: comparison with other human cell types. *Biochim Biophys.* 1345: 25-268.
- NEMERSON, Y. 1988. Tissue factor and haemostasis. *Blood.* 71: 1-8.
- NEUMANN, F.J., MARX, N., GAWWAZ, M. 1997. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation.* 95: 2387-2394.
- NICKENIG, G., SACHINIDIS, A., MICHAELSEN, F., BOHM, M., SEEWALD, S., VETTER, H. 1997. Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 95: 473-478.
- NOTARBARTOLO, A., DAVI, G., AVERNA, M. 1995. Inhibition of thromboxane biosynthesis and platelet function by simvastatin in type IIa hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15: 247-251.
- OPPENHEIMER, M.J., ORAM, J.F., BIERMAN, E.L., 1987: Down regulation of high density lipoprotein receptor activity of cultured fibroblasts by platelet-derived growth factor. *Arteriosclerosis*, 7 (4): 325-332
- ORAM, J.F., 1986: Receptor-mediated transport of cholesterol between cultured cells and high-density lipoproteins. *Methods Enzymol.* 129: 645-659

- ORITA, S., MASEGUI, T., ITOU, K., KAWADA, M., YANAI, T., UEDA, K. 1994. Spontaneous Aortic Arteriosclerosis in Layer Chickens. *J. Comp. Path.* 110: 341-347.
- ORTEGA, M., BUSTOS, C., HERNÁNDEZ-PRESA, MA., JEREZ, MJ., TUÑÓN, J., GUIJARRO, C. 1997. The HMG-CoA reductase inhibitor atorvastatin modulates NF- κ B activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells. 4th International Symposium on Multiple Risk Factors in Cardiovascular Disease Strategies of Prevention of Coronary Heart Diseases, Cardiac Failure and Stroke. Washington DC. USA.
- ORTEGA, J.V., AYALA, I., GARCÍA PEREZ, B., SÁNCHEZ POLO, M.T., CASTELLS, M.T. 2004. Uso de estatinas en biomodelos experimentales de arteriosclerosis. *An. Vet (Murcia)*. 20:49-57.
- OTTO, J., ORDOVAS, J.M., SMITH, D., VAN DONGEN, D., NICOLSI, R.J., SCHAEFER, E.J. 1995. Lovastatin inhibits diet induced atherosclerosis in F1B golden Syrian hamsters. *Atherosclerosis*. 114 (1): 19-28.
- PADGETT, RC., HEISTAD, DD., MUGGE, A., ARMSTRONG, ML., PIEGORS, DJ., LOPEZ, JAG. 1992. Vascular responses to activated leukocytes after regression of atherosclerosis. *Cir Res*. 70: 423-429.
- PARKER, T.S., McNAMARA, D.J., BROWN, C.D. 1984: Plasma mevalonate as a measure of cholesterol biosynthesis in man. *J. Clin. Invest.* 74: 795-804.
- PEDRONO, J., DE CASTELLARNAU, C., CULLARE, C. 1992. LDL binding sites on platelets differ from the “classical” receptor of nucleated cells. *Arterioscler Thromb.* 12: 1353-1362.
- PEKKANNEN, J., LINN, S., HEISS, G. 1990. Ten year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without pre-existing cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 322: 1700-1707.
- PEKKANNEN, J., TERVAHUATA, M., NISSINEN, A., KARVONEN, M.J. 1993. Does the predictive value of baseline coronary risk factors change over a 30 year follow up?. *Cardiology*. 82: 181-190.

- PIETSH, A., ERL, W., LORENZ, RL. 1996. Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD 36 in human monocytes cells. *Biochem Pharmacol.* 52: 433-439.
- PITMAN, W.A., OSGOOG, D.P., SMITH, D., SCHAEFER, E.J. ORDOVAS, J.M. 1998. The effects of diet and lovastatin on regression of fatty streak lesions and on hepatic and intestinal mRNA levels for the LDL receptor and HMG CoA reductase in F1B hamsters. *Atherosclerosis.* 138 (1): 43-52.
- PLA, JM. OBACH, R. 1982. Perspectivas terapéuticas con su fundamento farmacológico (dir: J. Esplugues). *Farmacología general.* Fundación Garcia Muñoz. Valencia. 7: 19-54.
- PLA, JM., POZO, A del. 1974. Manual de iniciación a la Biofarmacia (Farmacocinética aplicada). Romargraf. Barcelona.
- POERNAMA, F., SCHEREYER, S.A., BITGOOD, JJ., COOK, ME., ATTIE, AD. 1990. Spontaneous high density lipoprotein deficiency syndrome associated with a Z-linked mutation in chicken. *L Lipid Res.* 31: 955-963.
- POERNAMA, F., SUBRAMANIAM, R., COOK, ME., ATTIE, AD. 1992. High density lipoprotein deficiency syndrome in chickens in not associated with an increased susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb.* 12(5): 601-607.
- REINIS, Z., LODJA, Z., HEYROVSKY, A., HOORAKOVA, D., REISENAUER, R. 1976. Effects of beta-blocking agents in experimental atherosclerosis of cocks. *Rev. Czech. Med.* 22(3): 117-126.
- REKHTER, M., ZHANG, K., NARAYANAN, A., PHAN, S., SCHORK, M., GORDON, D. 1993. Type I collagen gene expression in human atherosclerosis: localization to specific plaque regions. *Am J Pathol.* 143: 1634-1648.
- RICHARDSON, JA., DAVIES, MJ., BORN, GVR. 1989. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet.* 2: 941-944.
- ROGLANS, N., SANGUINO, E., PERIS, C., ALEGRET, M., VÁZQUEZ, M. 2002. Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor α

- expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 302: 232-239
- ROWLAND, M., TOZER, TN. 2010. *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.*
- SALONEN, R., NYSSONEN, K., PORKKALA, E. 1995. Kuopio Atherosclerosis Prevention Study (KAPS): a population based primary preventive trial of the effect of LDL lowering on atherosclerotic progression in carotid and femoral arteries. *Circulation*, 92: 1758-1764.
- SANDERS, NL., BAJAJ, SP., ZIVELIN, A., RAPAPORT, SL. 1985. Inhibition of tissue factor/factor VII activity in plasma component. *Blood.* 66: 204-212.
- SANDSET, PM., LUND, H., NORSETH, J., ABILDGAARD, U. & OSE, L. 1991. Treatment with hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in hypercholesterolemia induces changes in the components of the extrinsic coagulation system. *Arterioscler Thromb.* 11: 138-145.
- SANGUINO, E., ROGLANS, N., ALEGRET, M., SÁNCHEZ, RM., VAZQUEZ-CARRERA, M., LAGUNA, JC. 2005. Atorvastatin reverses age-related reduction in rat hepatic PPAR α and HNF-4. *Br J Pharmacol.* 145 (7): 853-861.
- SANS, S., KESTELOOT, H., KROMHOUT, D. 1997. The burden of cardiovascular disease mortality in Europe. *Eur Heart J.* 18: 1231-1248.
- SARTORE, S., CHIAVEGATO, A., FRANOLI, R., FAGGIN, E, PAULETTO, P. 1997. Myosin Gene Expression and cell phenotypes in vascular smooth muscle during development in experimental models, and in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 1210-1215.
- SCANU, A.M., BYRNE, R.E., MIHOVILOVIC, M., 1982: Functional roles of plasma high density lipoproteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 13: 109
- SENARATNE, M.P., THOMSON, A.B., KAPPAGODA, C.T. 1991. Lovastatin prevents the impairment of endothelium dependent relaxation and inhibits accumulation of cholesterol in the aorta in experimental atherosclerosis in rabbits. *Cardiovasc. Res*, 25 (7): 568-578.

- SHEPHERD, J., COBB, SM., FORD, I. 1995. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med*, 333: 1301-1307.
- SHERIL, B.C., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W., 1980: Rapid hepatic clearance of the canine lipoproteins containing only the E apoprotein by a high affinity receptor. *J. Biol. Chem.*, 255: 1804-1807.
- SHIOMI, M., ITO, T., TSUKADA, T. 1995. Reduction of serum cholesterol levels alters lesional composition of atherosclerotic plaques: effect of pravastatin sodium on atherosclerosis in mature WHHL rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15: 1938-1944.
- SHIOMI, M., ITO, T., TSUKADA, T., SHIRAISHI, M., YATA, T. 1998. Effect of fluvastatin sodium on the smooth muscle cells in atherosclerotic plaques. In vivo study using low-density lipoprotein receptor deficient Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits. *Arzeimittelforschung.* 48(6): 680-685.
- SHIOMI, M., ITO, T., 1999. Effect of cerivastatin sodium, a new inhibitor of HMG-CoA reductase, on plasma lipid levels, progression of atherosclerosis, and the lesional composition in the plaques of WHHL rabbits. *Br. J. Pharmacol.* 126(4): 961-968.
- SMALL, DM. 1988. Progression and regression of atherosclerotic lesions: insights from lipid physical biochemistry. *Arteriosclerosis.* 8: 103-129.
- SOMA, MR., DONETTI, E., PAROLINI, C. 1993. HMG-CoA reductase inhibitors: in vivo effects on carotid intimal thickening in normocholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb.* 13: 571-578.
- STAMPFER, MJ., KRAUSS, RM., MA J. 1996. A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter and risk of myocardial infarction. *JAMA.* 276: 882-888.
- STEIN, O., STEIN, Y., COETZEE, G.A. VAN DER WESTHUYZEN, D.R., 1984: Metabolic fate of low density lipoprotein and high density lipoprotein labelled with an ether analogue of cholesterol ester. *Klin. Wochenschr.* 62: 1151.

- STERN, RH., YANG, BB., HORTON, M. 1997. Renal dysfunction does not alter the pharmacokinetics or LDL-cholesterol reduction of atorvastatin. *J Clin Pharmacol.* 37 (9): 816-819.
- SUKHOVA, G.K., WILLIAMS, J.K., LIBBY, P. 2002. Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22(9): 1452-1458.
- SWEETNAM, P.M., THOMAS, H.F., YARSELL, J.W.G., BESWICK, A.D., BAKER, I.A., ELWOOD, P.C. 1996. Fibrinogen, viscosity and the 10-years incidence of ischaemic heart disease. *Eur Heart J.* 17: 1814-1820.
- TANZAWA, K., KURODA, M., ENDO, A., 1977: Timedependent, irreversible inhibition of 3-hydroxy-3-methyl-glutaril coenzyme A reductase by the antibiotic citrinin. *Biochim Biophys. Acta.* 488: 97-101.
- THOMPSON, S.G., KIENAST, J., PYKE, S.D.M., HAVERKATE, F., VAN DE LOO, J. 1995. CW for the European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group Haemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med.* 332: 635-641.
- TREASURE, CB., KLEIN, JL., WINTRAUB, WS. 1995. Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 332: 481-487.
- UMETANI, N., KANAYAMA, Y., OKAMURA, M., NEGORA, N., TAKEDA, T. 1996. Lovastatin inhibits gene expression of type 1 scavenger receptor in THP-1 human macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 1303: 199-206.
- VALDÉS CHAVARRI, M., PASCUAL-LEONE, A., O'CONNOR, C. 1976. Verification of the cholesterol hypothesis in atherogenesis with a model of dietary atheromatosis in chicken fed with eggs. Influence of insulin and oral antidiabetics. *Rev. Clin. Esp.* 143(5): 427-435.

- VALLANCE, P., COLLIER, J., BHAGAT, K. 1997. Infection, inflammation and infarction: does acute endothelial dysfunction provide a link?. *Lancet*. 349: 1391-1392.
- VAN BOVEN, AJ., JUKEMA, JW., ZWINDERMAN, AH., CRINJS, HJ., LIE, KL., BRUSCHKE, AVG. 1996. Reduction of transient myocardial ischemia with pravastatin in addition to the conventional treatment in patients with angina pectoris. *Circulation*. 94: 1503-1505.
- VAN DER WAL, AC., BECKER, AE., VAN DE LOOS, CM., DAS, PK. 1994. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 89: 36-44.
- VILLAMOR, E., RUIJTENBEEK, K., DE MEY, J.G., BLANCO, C.E. 2002. Vascular reactivity in intrapulmonary arteries of chicken embryos during transition to ex ovo life. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282(3): R917-927.
- WAGNER, JG. 1968. Pharmacokinetics. *Am Rev Pharmacols.* 8: 67-94.
- WARNER, SJC., FRIEDMAN, GB., LIBBY, P. 1989. Immune interferon inhibits proliferation and induces 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene expression in human vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 83: 1174-1182.
- WEBER, C., ERL, W., WEBER, KSC., WEBER, PC. 1997. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CDIIb expression and CDIIb-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 30: 1212-1217.
- WIERZBICKI, AS., LAMB, PJ., SEMRA, YK., CROOK, MA. 1998. Effect of atorvastatin on plasma fibrinogen. *Lancet*. 351: 569-570.
- WILLIAMS, J.K., SUKHOVA, G.K., HERRINGTON, D.M., LIBBY, P. 1998. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J. Am. Coll. Cardiol.* 31: 684-691.

- WILLIS, R.A., FOLKERS, K., TUCKER, J.L., YE, C-Q., XIA, L-J, TAMAGAWA, H. 1990. Lovastatin decreases coenzyme Q levels in rats. *Proc. Natl. Acad Sci. USA.* 87: 8928-8930.
- WONG, HY. 1975. The cockerel as an animal model for atherosclerosis research. *Avd Exp Med Biol.* 63: 381-391.
- WONG, H.Y., CHENG, K.S. DRUTH, H.S. 1987. Effects of meprobamato on lipids, lipoprotein, and experimental atherosclerosis. *J. Natl. Med. Assoc.* 79(8): 855-864.
- WOODWARD, M., LOWE, GDO., RUMLEY, A. 1997. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers, the Third Glasgow MONICA Survey II: relationships to cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. *Br J Haematol.* 97: 785-797.
- YAMAOKA, K., NAKAGAWA, T., UNO, T. 1978. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharm Biopharm.* 6: 165-175.
- YAMAOKA, K., TAMIGAWARA, Y., UNO, J. 1981. A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputers. *J Pharmacolbio-Dyn.* 4: 879-885.

Abreviaturas

A. ABREVIATURAS

- **ACAT:** Acetil Colesterol Acil Transferasa.
- **apoA:** Apolipoproteína A.
- **apoA-I:** Apolipoproteína A-I.
- **apoA-II:** Apolipoproteína A-II.
- **apoB:** Apolipoproteína B.
- **apoB-100:** Apolipoproteína B-100.
- **apoC:** Apolipoproteína C.
- **apoC-I:** Apolipoproteína C-I.
- **apoC-II:** Apolipoproteína C-II.
- **apoC-III:** Apolipoproteína C-III.
- **apoE:** Apolipoproteína E.
- **CML:** Células musculares lisas.
- **CPK:** Creatinfosfatoquinasa.
- **HDL:** Lipoproteínas de alta densidad.
- **HMG-CoA reductasa:** Hidrox-metil-glutaril CoenzimaA reductasa.
- **HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
- **IDL:** Lipoproteínas de densidad intermedia.
- **LCAT:** Lecitín:colesterol-aciltransferasa.
- **LDL:** Lipoproteínas de baja densidad.

- **LPL:** Lipoproteinlipasa.
- **NO:** Oxído nítrico.
- **PCR:** Proteína C reactiva.
- **VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad.
- **γ -IFN:** Interferón gamma.

B. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS

- **AIC:** Criterio de información de AKAIKE.
- **C.V.:** Coeficiente de variación.
- **N.S.:** Nivel de significación.
- **S.D.:** Desviación estándar.
- **S.E.:** Error estándar.

C. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

- **AUC:** Área bajo la curva, calculada según métodos no compartimentales.
- **Cl:** Aclaramiento plasmático calculado en función del área bajo la curva.
- **C_{max}:** Concentración periférica máxima (administración intravenosa),
concentración plasmática máxima (administración oral).
- **F:** Biodisponibilidad.
- **K₀₁:** Constante de absorción.
- **K₁₀:** Constante de eliminación.
- **K₁₂:** Constante de transferencia al compartimento periférico.

- **K_{21}** : Constante de retorno desde el compartimento periférico.
- **MRT**: Tiempo medio de residencia.
- **T_{max}**: Tiempo en el que se alcanza la concentración periférica máxima (administración intravenosa), tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima (administración oral).
- **$t_{1/2}$** : Vida media del fármaco.
- **V_{ss}** : Volumen de distribución aparente en estado estacionario.
- **V_z** : Volumen de distribución aparente en función del área bajo la curva.

