

COMPARACIÓN IN VITRO DEL EFECTO PROCINÉTICO DE ERITROMICINA, AZITROMICINA Y CLARITROMICINA EN DUODENO DE *Oryctolagus cuniculus*

IN VITRO COMPARATIVE PROKINETIC EFFECT OF ERYTHROMYCIN, AZITHROMYCIN, AND CLARITHROMYCIN IN DUODENUM OF *Oryctolagus cuniculus*

Julio Alejandro Cerna López¹, Iván Alexander Flórez Lazo¹

RESUMEN

Desde la introducción de la Eritromicina a la práctica por sus propiedades antibacterianas, ha presentado reacciones adversas gastrointestinales. Subsecuentes estudios han demostrado que la estructura de los macrólidos les confiere una acción procinética a estas drogas, como agonistas de la motilina o como estimulante de las vías colinérgicas. El objetivo de nuestro estudio fue comparar el efecto de Eritromicina, Azitromicina y Claritromicina sobre la motilidad intestinal utilizando un modelo experimental de duodeno aislado de *Oryctolagus cuniculus*, el cual se dividió en 3 segmentos y administrándosele por cada segmento los compuestos mencionados a concentraciones distintas de cada macrólido. Se determinó la frecuencia y la amplitud de las contracciones del duodeno aislado antes y después de la administración de Eritromicina, Azitromicina y Claritromicina en cada segmento. Los tres macrólidos estudiados aumentan la amplitud de las contracciones pero no sucede lo mismo con la frecuencia la cual se mantiene manera constante. Se establece que la Eritromicina, Azitromicina y Claritromicina tiene efectos importantes sobre la motilidad del duodeno de *Oryctolagus cuniculus*, llegando a presentar un mayor efecto la eritromicina.

Palabras Claves: Motilidad, *Oryctolagus cuniculus*, Eritromicina, Azitromicina, Claritromicina.

ABSTRACT

Since the introduction of erythromycin into practice for its antibacterial properties, it had presented gastrointestinal adverse reactions. Subsequent studies have shown that the structure of the macrolide prokinetic action confers to these drugs, as motilin agonists or stimulating cholinergic pathways. The aim of our study was to compare the effect of erythromycin, azithromycin and clarithromycin on motility using an experimental model of isolated duodenum *Oryctolagus cuniculus*, which was divided into three segments and then given at each segment mentioned, compounds at different concentrations for each macrolide. We determined the frequency and amplitude of the contractions of the isolated duodenum before and after administration of Erythromycin, Azithromycin and Clarithromycin in each segment. All macrolides in study increased the amplitude of contractions but not so with the frequency which is maintained constantly. We conclude that erythromycin, azithromycin and clarithromycin have important effects on the motility of rabbit duodenum, reaching bigger effect the macrolide erythromycin.

Keywords: Motility, *Oryctolagus cuniculus*, Erythromycin, Azithromycin, Clarithromycin.

¹Químico Farmacéutico-Laboratorio de Farmacología- Facultad de Farmacia y Bioquímica-Universidad Nacional de Trujillo-PERÚ

INTRODUCCIÓN

El término “macrólido” se utiliza para describir a drogas con un anillo de lactona macrocíclica de 12 o más carbonos. Esta clase de compuestos incluye una variedad de agentes bioactivos que incluyen antibióticos, antimicóticos, procinéticos e inmunosupresores. Los macrólidos de 14, 15 y 16 carbonos son una familia de antibióticos ampliamente utilizados. Ellos tienen una excelente penetración tisular y actividad antimicrobiana, principalmente frente a cocos grampositivos y patógenos atípicos. Los macrólidos además de sus propiedades antibióticas, comúnmente conocidas, también presentan acciones en la estimulación de los receptores de motilina, en el tracto gastrointestinal (Efectos no antimicrobianos), y por lo tanto ejercen efectos procinéticos. El primer macrólido clínicamente explorado fue la eritromicina, el cual, en los experimentos iniciales, mostró propiedades estimulantes de la motilidad^{1,2,3}.

Esta capacidad de la eritromicina se atribuyó en primer lugar por producir efectos secundarios gastrointestinales frecuentemente por sus propiedades antibióticas que producen un cambio en la flora intestinal. Sin embargo, dos estudios indicaron que la eritromicina tiene un efecto directo sobre la motilidad gastrointestinal y que esto puede ser el mecanismo por el cual los efectos secundarios gastrointestinales son inducidos. Pilot *et al* informaron el efecto de la eritromicina por vía intravenosa en la actividad motora antral-gástrica, duodenal e ileal en perros en ayunas. La perfusión intravenosa de una dosis subterapéuticas de eritromicina (1 mg/kg) estimuló un aumento considerable de las contracciones que se originaron en la parte proximal del estómago que se propagaron al íleon^{2,3,4}.

Las características de la acción estimulante motora de la eritromicina en el tracto gastrointestinal son similares a los de la motilina, sin embargo, aunque los valores plasmáticos de motilina se incrementan en perros, esto no parece ser así en el hombre. La eritromicina puede, sin embargo, actuar como un agonista de

los receptores de motilina y de hecho hay buena evidencia de que esto es así. La eritromicina provoca una contracción dependiente de la dosis de tiras aisladas de músculo duodenal de conejo, y (en menor medida) de estómago, músculo ileal y colónico. Este efecto es específico de la especie; en contraste al conejo, el músculo liso de rata y cobayo no se contraen en presencia de eritromicina. Y en relación a esto, las contracciones del músculo liso en el conejo no fueron inhibidas por la atropina, hexametonio, naloxona, difenhidramina, metisergida, procaína, tripsina, indometacina o nitroprusiato de sodio, pero si por el nifedipino, lo que indica que la acción de la eritromicina es dependiente de calcio^{5,6}.

El descubrimiento, por primera vez en perro y luego en el hombre, de la relación entre la motilina y el patrón de actividad motora de ayuno conocido como el complejo motor migratorio (CMM) fue muy importante debido a que los niveles endógenos de plasma de motilina se levantan antes del inicio de la fase 3 del CMM en el estómago y porque la administración exógena de motilina induce la fase 3. Las cuatro fases del CMM fueron descritos por primera vez por Szurszewski, indicando que existen 4 fases típicas del CMM en el perro. La fase I es la quietud. La fase II es la actividad contráctil irregular. La fase III se caracteriza por contracciones intensas y rítmicas que comienzan en el esfínter esofágico inferior (EEI) y el estómago y la migración por el intestino delgado hasta el íleon terminal. En la Fase IV, la actividad disminuye rápidamente hasta el reposo completo. Itoh *et al* demostraron que la administración exógena de la motilina inicia contracciones prematuras de fase III en el estómago, siendo muy similares a los que se producen espontáneamente en la fase III de CMM en perros. Esta idea es apoyada por un estudio realizado por Peeters *et al*. que describen que las actividades de la fase III en el estómago o el duodeno superior están asociados con picos plasmáticos de motilina^{7,8}.

Desde la introducción de la eritromicina en la práctica clínica, los efectos secundarios gastrointestinales, náuseas, vómito, dolor abdominal tipo cólico superior, y la diarrea, se han reportado frecuentemente. La eritromicina, única entre los antibióticos, es un agonista del receptor de motilina con un profundo efecto sobre actividad motora gastroduodenal. Esta es la acción, que es responsable de muchos de sus efectos no deseados en el intestino^{3,9}.

Existe un considerable interés en la posibilidad de que los ligandos activos en el receptor de motilina (motilina-R) podrían jugar un papel importante en el tratamiento de trastornos gastrointestinales asociados con los patrones de hipomotilidad. Desde el descubrimiento de que el antibiótico eritromicina podría activar la motilina-R, varios derivados de eritromicina han sido identificados como activadores más potentes de este receptor y estimulantes efectivos de la motilidad gástrica. Una característica común en la caracterización de estos compuestos ha sido el uso de aislados de preparados gastrointestinales de conejo para ensayos farmacológicos del receptor^{10,11}.

Además de la Eritromicina, existen en el mercado farmacéutico nacional, otros macrólidos, los cuales presentan un amplio uso en nuestro medio, siendo estos la Azitromicina y la Claritromicina por lo que el objetivo de este estudio es proveer información sobre sus efectos sobre la motilidad intestinal y a la vez realizar una diferencia entre estos mismos como estimulantes de las contracciones intestinales por medio de su unión al receptor de motilina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: La población y muestra estuvo constituida por 18 especímenes machos jóvenes de *Oryctolagus cuniculus* de tipo albino con un peso promedio de 1.5 Kg y con una edad promedio de 4 meses, que fueron adquiridos de un criadero de manera aleatoria y trasladados al bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica alimentados con comida balanceada

(Conejina®). Se mantuvieron en ayuno de 24 horas antes de los experimentos y bajo un ritmo circadiano natural (12 horas luz; 12 horas oscuridad). En el momento del procedimiento experimental fueron aleatoriamente seleccionados del 1^{er} al 18^o *Oryctolagus cuniculus*.

Equipo de Órgano Aislado: Constituido por un contenedor que presenta dos compartimentos, uno interno y otro externo, el primero contiene el Segmento de duodeno en estudio en una solución nutritiva (Tyrode) y el segundo funciona como un baño maría para mantener el tejido a una temperatura de 37°C. Las contracciones se registran por medio de un transductor, el cual convierte las señales eléctricas en ondas. Se tomó como variables de estudio la frecuencia y amplitud^{9,10,12,13}.

Preparación del Duodeno (Preparación de Magnus): Se mantuvo en ayunas a los animales 24 h antes del experimento, se les sacrificó por dislocación cervical y fueron desangrados, seccionando los vasos del cuello. Luego se realizó una laparotomía y se aisló un segmento de intestino (duodeno) de 15 cm de longitud, el cual se sumergió en solución nutritiva (Tyrode) a 37°C, cortándolo en segmentos de 5 cm de longitud, resultando en 3 segmentos, por conejo (denominados S1, S2 y S3), previamente despojado de su envoltura mesentérica y atando ambos extremos del intestino delgado con seda quirúrgica 6/0 sin ocluir la luz intestinal. El intestino delgado una vez preparado se colocó en el baño para órganos aislados que contuvo 25 mL de solución de Tyrode a 37°C. La solución fue suministrada de Oxígeno (O₂)^{14,15,16}.

Procedimiento: Una vez efectuado el anterior procedimiento, Se registra la actividad contráctil espontánea del tejido por 5 minutos después de su estabilización, obteniendo el basal^{14,15,16}.

Se inicia la administración de la primera dosis la cual se instila sobre la solución nutritiva calculando toda la

dilución para saber la dosis exacta. Una vez obtenido el registro con esta dosis se procede al recambio del baño del tejido, con la finalidad de eliminar el medicamento administrado. Esto se hace dejando salir todo el líquido del compartimiento interno del dispositivo y reemplazándolo con 25 ml de solución de nutrición mantenida a 37°C, dicho proceso se denomina lavado y se realiza las veces que sea necesario hasta que se obtenga una inscripción semejante a la del patrón de base. Después se hace la instilación de la segunda dosis de la misma forma y se repite igual hasta la cuarta dosis^{14,15,16}.

Las tres concentraciones finales crecientes en el compartimiento interno de

Eritromicina, Azitromicina y Claritromicina fueron: 0.046 mg/mL, 0.089 mg/mL y de 0.129 mg/mL.

Análisis Estadístico: Los resultados obtenidos se procesaron empleando el programa SPSS, versión 19.0, reportándose tablas estadísticas resumen para cada grupo: media aritmética y desviación estándar. Para evaluar la diferencia entre los efectos de los fármacos respecto a la amplitud y frecuencia en estudio se utilizó ANOVA con un nivel de significancia estadística $p < 0.05$. Para analizar cuál de los macrólidos tuvo mayor efecto se aplicó la prueba de HSD de Tukey.

RESULTADOS

Tabla 1: Efecto de Eritromicina, Azitromicina y Claritromicina sobre Amplitud y Frecuencia a las concentraciones de 0.04615 mg/mL, 0.089 mg/mL y 0.129 mg/mL; en los segmentos S1, S2 y S3 de duodeno de *Oryctolagus cuniculus*.

		Basal	ERITROMICINA			AZITROMICINA			CLARITROMICINA			Ach
			C ₁	C ₂	C ₃	C ₁	C ₂	C ₃	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
S1	A	0.92	2.15*	2.00**	1.84##	1.49++	1.12	1.18	1.41	1.41	1.64	3.27
	F	14	14	14	14	14	14	15	15	14	14	7
S2	A	0.92	2.72	2.18#	1.83	1.98	1.18	1.07	1.86	1.99+	1.71	3.04
	F	14	14	15	14	14	13	13	14	15	14	8
S3	A	0.92	2.05	1.56	1.16	1.39	1.35	1.25	1.81	1.85	1.75	2.82
	F	14	14	14	14	14	14	15	14	14	14	8

*La C₁ de Eritromicina presenta un $p < 0.05$ con respecto al basal y la C₁ de Claritromicina
 **La C₂ de Eritromicina presenta un $p < 0.05$ con respecto al basal
 # La C₂ de Eritromicina presenta un $p < 0.05$ con respecto al basal
 ## La eritromicina a la C₃ presenta un $p < 0.05$ con relación al basal e intersegmentos
 + Claritromicina a la C₂ presenta un $p < 0.05$ en relación en relación al basal e intersegmentos
 ++ Azitromicina a la C₁ presenta un $p < 0.05$ en relación en relación al basal e intersegmentos
 C₁: Concentración 1, 0.04615 mg/mL
 C₂: Concentración 2, 0.0923 mg/mL
 C₃: Concentración 3, 0.13845 mg/mL
 A: Amplitud
 F: Frecuencia

DISCUSIÓN

En 1902, Boldyreff en un estudio observó cuatro periodos de actividad motora gástrica y secreción pancreática exocrina sincrónica en un perro durante 6.5 horas de ayuno. Al repetir el experimento en varios perros, se dio cuenta que los periodos de actividad motora gástrica y secreción pancreática alternaban con periodos de inactividad. La fase de la actividad fue de aproximadamente 20 minutos de contracciones gástricas de gran amplitud, y la fase de reposo tuvo una duración de 80 min. La alimentación interrumpió este patrón de actividad motora, pero cuando el estómago estaba vacío devolvió el ritmo periódico. Boldyreff encontró que el intestino también siguió este ritmo periódico de actividad. 10 años después de esta primera descripción, Cannon y Washburn observaron contracciones periódicas en ayunas en un voluntario humano y relacionado con la sensación de hambre. Esto fue el inicio de muchos trabajos, encontrándose que tal efecto se originaba por elevaciones coordinadas en sangre de la hormona polipeptídica denominada como Motilina. Más tarde se observó este mismo efecto por la administración de Macrólidos. En nuestro estudio Comparamos el efecto procinético de 3 macrólidos (Eritromicina, Azitromicina y Claritromicina) a concentraciones de 0.046 mg/mL (C₁), 0.089 mg/mL (C₂) y 0.129 mg/mL (C₃); en una porción de duodeno en *Oryctolagus cuniculus* que fue dividido en 3 segmentos (S1, S2 y S3)^{17,18}.

En la tabla se observa que la amplitud aumenta con respecto al basal para cada macrólido para las distintas concentraciones en cada segmento, verificando con esto el efecto contráctil de Eritromicina, Azitromicina y Claritromicina. Si bien la Motilina y sus

agonistas, los macrólidos de 14 y 15 miembros en este estudio, presentan un efecto estimulante de la contracción, los mecanismos de transducción que median la contracción del músculo liso por esta hormona no se han explorado completamente³.

Al comparar el efecto de los macrólidos en estudio a una misma concentración en los Segmentos S1, S2 y S3 se demuestra que existe diferencia estadísticamente significativa en comparación con el basal mostrándose que a la C₁, C₂ y C₃ la eritromicina presentó un mejor efecto que azitromicina y claritromicina, a la vez en la C₁ en el segmento S2 los tres macrólidos tuvieron el efecto más intenso. Si bien estos compuestos pueden tener como efecto común el aumento de la amplitud, al presentar cada uno una estructura distinta tanto en el número de carbonos y radicales unidos al esqueleto macrocíclico (núcleo de lactona gigante), estas características condicionan su unión al receptor así como los procesos intracelulares que intervienen tras la activación del receptor³.

Dependiendo del número de átomos de carbono en el anillo de lactona, los macrólidos se clasifican en dos categorías; ya sea 14 o 16. Las moléculas de azúcar - ya sea un azúcar dimetilaminoazúcar o uno neutral - están unidos al anillo de lactona por un enlace glucosídico. Los macrólidos de 14 miembros (Eritromicina y Claritromicina) por lo general tienen un dimetilaminoazúcar (desosamina) y un azúcar neutro enlazado al anillo de lactona en paralelo en C-5 y C-3, respectivamente. En los compuestos de 16 miembros, el dimetilaminoazúcar (micaminosa) está unido al anillo de lactona en C-5 y un azúcar neutro (micarosa) se une al C4 principal. Los compuestos dentro de estos dos grupos pueden tener variaciones de

esta estructura básica. Esto sugiere que la estructura molecular del macrólido es crítica en la determinación de su capacidad para estimular la actividad motora intestinal y que un anillo de lactona de 14 miembros, un dimetilaminoazúcar en el C-5 y el azúcar neutro en C-3 son vitales en conferir actividad estimulante. Es más al comparar sólo la estructura de eritromicina y claritromicina; que se diferencian en un solo grupo, el cual está unido al C-6 (OH- en Eritromicina y $-O-CH_3$ en Claritromicina) esto ya proporciona una diferencia en cuanto a la intensidad para generar el efecto contráctil³.

Como se muestra en la tabla 1, sólo hay aumento de la amplitud sin aumento de la frecuencia que caracteriza a la fase III del complejo motor migratorio. En esta fase la frecuencia de las concentraciones suele aumentar de manera notable, aunque la frecuencia no disminuyó, se mantuvo en su ritmo basal, el cual es orquestada por el sistema nervioso entérico que tiene tres componentes: las células intersticiales de Cajal, el plexo submucoso o de Meissner, ambos situados en la submucosa y el plexo mientérico o de Auerbach, situado entre las dos capas musculares. Específicamente, con estos elementos las células intersticiales de Cajal que se ubican en la parte más profunda de la submucosa, en íntima relación con las fibras musculares circulares tienen una función de marcapaso del ritmo intestinal, que en el estómago es de 3 oscilaciones por minuto y en el intestino, entre 8 y 10. El número de células de Cajal varía a lo largo del tubo digestivo, aumenta de proximal a distal, de modo que la mayor cantidad se encuentra en el intestino delgado, es decir, donde las contracciones peristálticas son más intensas y más frecuentes hay mayor cantidad de células intersticiales de Cajal. Estas células, como las musculares lisas,

presentan receptores de motilina; por lo que los agonistas como estas aumentarían el ritmo descarga. Pero teniendo en cuenta el concepto de “procinético” no sería adecuado que aumentara la frecuencia de manera excesiva porque lo que se busca es simular el tono basal con aumento de amplitud, que incluso este no debe ser elevado sino tendría un efecto espasmódico antes que el deseado¹⁸.

En retrospectiva la Acetilcolina muestra un claro mayor efecto que Eritromicina, Azitromicina y Claritromicina en relación a la amplitud en los distintos segmentos; pero disminuye la frecuencia de las contracciones presentando un mayor efecto en ambas variables en el segmento S1.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente no sólo existe diferencias entre los macrólidos, estructura del intestino, sino también en la densidad de receptores de Motilina a lo largo del duodeno, por eso se dividió en 3 segmentos el duodeno extraído. En la tabla 1 se puede observar que esto se evidenció mejor a la C₂ de claritromicina en cada segmento mostrando una diferencia significativa con respecto a Eritromicina y Claritromicina. Aún se necesita muchos estudios para llegar a una conclusión absoluta en cuanto al efecto de estos macrólidos y su diferencia en cuanto a la respuesta, si bien se verifica el efecto superior de Eritromicina, en este trabajo la Claritromicina presenta un mejor efecto que Azitromicina, conclusión a la cual unos y otros autores aún difieren.

Conflicto de intereses

No se presentan.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Soichiro K. and Bruce K. Mechanisms of Action and Clinical Application of Macrolides as Immunomodulatory

- Medications. Clin Microbiol Rev, 2010; 23: 591-593.
2. Hasse A. Treatment options for patients with severe gastroparesis. British J M Gut, 2007; 56:877-883.
 3. Catnach S. and Fairclough P. Erythromycin and the gut. Gut (Lond), 1992; 33: 397-401
 4. Peeters T. Old and new targets for prokinetic drugs: motilin and ghrelin receptors. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2008; 12(Suppl 1): 136.
 5. Tetsuro O., Erito M. and Hiroyuki K. 2010. The Roles of Motilin and Ghrelin in Gastrointestinal Motility. International Journal of Peptides, 2010; pp: 1-3.
 6. Dass N., Hill J., Muir A., Testa T., Wise A. and Sanger G. The rabbit motilin receptor: molecular characterisation and pharmacology. Br J Pharmacol. 2003; 140, 948-954.
 7. Ricar B. and Braden K. Upper gastrointestinal promotility drugs: not all uniform?. Indian J Gastroenterol. 2009; 28(4):123-125.
 8. Talley N., Verlinden M., Geenen D., Hogan R., McCallum R. and Mack R. Effects of a motilin receptor agonist (ABT-229) on upper gastrointestinal symptoms in type 1 diabetes mellitus: a randomised, double blind, placebo controlled trial. Gut. 2001; 49:395-401.
 9. Jarvie E., North V., Corcoran S., Bassil A. and Sanger G. Differences between the abilities of tegaserod and motilin receptor agonists to stimulate gastric motility in vitro. Br J Pharmacol. 2007; 150: 455-462.
 10. Stacher G., Peeters T., Bergmann H., Wiesnagrotzki S., Schneider C., Granser-Vacariu G., Gaupmann G. and Kugi A. Erythromycin effects on gastric emptying, antral motility and plasma motilin and pancreatic polypeptide concentrations in anorexia nervosa. Gut. 1993; 34: 166-172.
 11. Annapurna K. and Henry P. Effect of Atilmotin, a Motilin Receptor Agonist, on Esophageal, Lower Esophageal Sphincter, and Gastric Pressures. Dig Dis Sci. 2010; 55(2): 300-306.
 12. Prácticas de Farmacología y Farmacoterapia [fecha de acceso: 13 de junio del 2012]. Disponible en: http://personal.us.es/calarcon/practica/farma_2/bano_uterio.pdf.
 13. Peddireddy M. In vitro evaluation techniques for gastrointestinal motility. Ind J Pharm Edu Res, Apr-Jun, 2011, 45: 184-191.
 14. Merwid A. Trocha M. Ksiadzyna D. Sozański T and Szelağ A. Animal models for the gastrointestinal motility evaluation. Gastroenterol Pol. 2009, 16 (3), 201-206.
 15. Gerhard H. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. 3rd edition. Ed. Springer. 2008. pp: 1246-1248.
 16. Grigorjev C. y Brizuela N. Efectos de ruda ssp. sobre la actividad del musculo liso gastrointestinal aislado de rata. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas 2010; 67(2): 73-76.
 17. Malpartida K. Evaluación del efecto antiespasmódico del extracto fluido de las hojas de *Foeniculum vulgare Will.* "Hinojo" en ileon aislado de cuy. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga. Perú. Ayacucho.2007. pp: 23-25.
 18. Matsumura B. Dong M. Naik S. and Miller L. Differential contributions of motilin receptor extracellular domains for peptide and non-peptidyl agonist binding and activity. The Journal of Biological Chemistry; vol. 281, N°18, pp: 12390-12396.