

MODIFICACIONES EN LA DISTRIBUCIÓN TISULAR DE AMICACINA EN RATAS UTILIZANDO ERITROCITOS PORTADORES

Carmen Gutiérrez Millán, Aránzazu Zarzuelo Castañeda,

M^a Luisa Sayalero Marínero, José M. Lanao

Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Avda Campo Charro s/n, 37007 Salamanca

Resumen / Abstract

The aim was to study the modifications in the pharmacokinetics and tissue distribution of the aminoglycoside amikacin in rat using erythrocytes as carriers. Amikacin was encapsulated in rat erythrocytes using an hypotonic dialysis method. The pharmacokinetics of Amikacin was studied in 60 Wistar rats divided in two groups. The antibiotic was administered intravenously in single doses of 7.5 mg/kg as a free substance or incorporated in autologous carrier erythrocytes. Samples of blood, liver, kidney, spleen and lung were obtained at previously programmed times. Amikacin was determined in plasma and tissue samples by a validated ion-paired HPLC technique. A sustained release of Amikacin in plasma was observed after administration of carrier erythrocytes. The peak drug concentration and its elimination rate were lower for loaded erythrocytes administration than for free Amikacin administration. A significant increase in the terminal $t_{1/2}$ of amikacin was observed ($p < 0.001$). "In vivo" tissue distribution studies indicated that Amikacin carrier erythrocytes were accumulated in the different studied tissues, mainly in liver and spleen. Amikacin carrier erythrocytes may act as a slow release system of the antibiotic and may achieve the selective targeting of the drug to specific tissues.

Se han estudiado las modificaciones en la farmacocinética y en la distribución tisular del antibiótico aminoglucósido amicacina en ratas utilizando eritrocitos autólogos como portadores del antibiótico. La encapsulación de amicacina en eritrocitos se realizó mediante un método de diálisis hipotónica. La farmacocinética del antibiótico se estudió en 60 ratas Wistar, que se dividieron en 2 grupos, administrando la amicacina por vía i.v. mediante una dosis única en una disolución acuosa de 7,5 mg/kg al grupo control e incorporada en los eritrocitos autólogos al grupo experimental. A tiempos previamente programados se sacrificaron las ratas y se tomaron muestras de sangre, hígado, riñón, bazo y pulmón. Las concentraciones de amicacina en plasma y tejidos se determinaron mediante una técnica validada de HPLC de par iónico. Tras la administración de eritrocitos portadores, se observó una liberación sostenida de la amicacina. La concentración máxima y la constante de eliminación observadas, cuando se administraron eritrocitos portadores, fueron menores que las obtenidas tras la administración de la disolución de amicacina libre, produciéndose un incremento significativo en la $t_{1/2}$ en plasma del antibiótico ($p < 0,001$). Los estudios de distribución "in vivo" demostraron que la amicacina administrada mediante eritrocitos portadores se acumuló en los diferentes tejidos estudiados, principalmente en hígado y bazo. Los eritrocitos portadores de amicacina pueden actuar como un sistema de lenta liberación del antibiótico e inducir una vectorización selectiva del fármaco a tejidos específicos.

Introducción

La utilización de eritrocitos como portadores biológicos ha sido ampliamente estudiada para gran variedad de moléculas con actividad farmacológica (1). Los eritrocitos portadores pueden actuar como reservorio de fármacos, induciendo una liberación sostenida del mismo en el organismo y modificando su farmacocinética (2).

El objetivo del presente trabajo es estudiar las modificaciones en la farmacocinética y distribución tisular en rata, del aminoglucósido amicacina, tras la administración de eritrocitos portadores.

Materiales y Métodos

Para la encapsulación de amicacina en eritrocitos se utilizó un método de diálisis hipotónica (figura 1) utilizando un tampón hipotónico de 90 mOsm/Kg y un tampón de resellado de 500 mOsm/Kg (3,4).

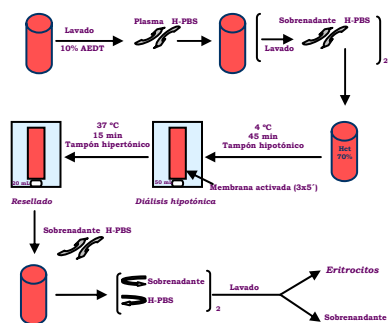


Figura 1. Procedimiento de encapsulación de amicacina en eritrocitos de rata.

Una vez obtenidos los eritrocitos conteniendo amicacina, se estudió su morfología mediante microscopía electrónica de barrido a 20 kV con un microscopio Carl Zeiss DMS-940.

La liberación de amicacina "in vitro" desde los eritrocitos portadores se estudió mediante la incubación de los mismos en plasma autólogo (Hct 50 %) a 37°C. A tiempos previamente programados se tomaron muestras de plasma y eritrocitos para su posterior valoración.

Posteriormente se estudió la farmacocinética de amicacina en 60 ratas Wistar ($262,19 \pm 20,16$ g) divididas en dos grupos (control y experimental). El antibiótico fue administrado vía i.v. en un bolus de 7,5 mg/kg de amicacina en disolución acuosa para el grupo control, e incorporado en eritrocitos autólogos para el grupo experimental. El segundo grupo recibió 1 mL de eritrocitos portadores con una concentración media de amicacina de $0,78 \pm 0,29$ mg/mL.

Tras el sacrificio del animal a tiempos previamente programados (5, 15, 30 minutos y 1, 2, 4, 6, 12, 24 y 48 horas), se tomaron muestras de sangre, pulmón, hígado, bazo y riñón.

Se determinó la amicacina en plasma y en muestras de tejidos (5) mediante una técnica validada de HPLC de par iónico usando o-ftaldialdehído y detección de fluorescencia ($\lambda_{excitación} = 360$ nm y $\lambda_{emisión} = 435$ nm) (precisión intra e interdía $CV < 6\%$), expresándose los resultados como relación concentración /dosis.

Resultados y Discusión

Los eritrocitos conteniendo amicacina no presentaron diferencias significativas tanto en sus propiedades morfológicas como en la mayoría de los parámetros hematológicos. La figura 2 muestra comparativamente las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de eritrocitos conteniendo amicacina y eritrocitos control.

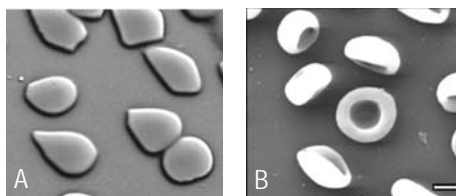
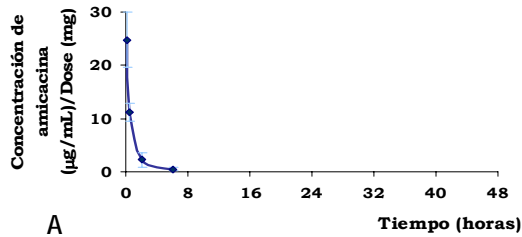


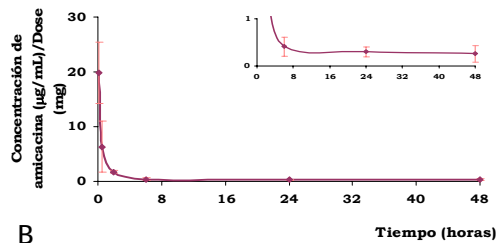
Figura 2. Fotografías de microscopía electrónica de eritrocitos conteniendo amicacina (A) y eritrocitos control (B).

La figura 3 muestra la curva media de niveles plasmáticos de amicacina en el grupo control y en el grupo que recibió los eritrocitos conteniendo amicacina, observándose una

liberación sostenida del antibiótico en el plasma tras la administración de los eritrocitos portadores.



A



B

Figura 3. Concentración media de ampicilina (\pm DE) tras administración i.v. de fármaco libre (A) y de eritrocitos portadores (B).

Las figuras 4 y 5 muestran las curvas de ampicilina en hígado y bazo respectivamente. Estas gráficas demuestran la localización selectiva de la ampicilina en estos tejidos cuando es administrada en eritrocitos portadores.

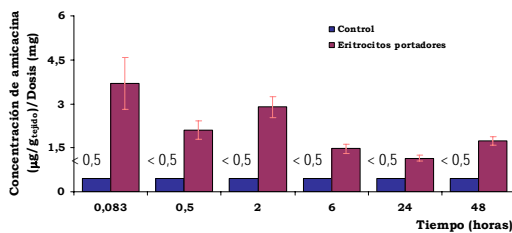


Figura 4. Niveles medios de ampicilina (\pm DE) de ampicilina en hígado frente al tiempo.

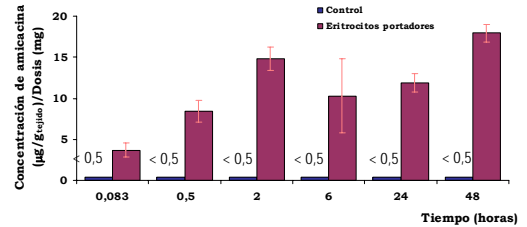


Figura 5. Niveles medios de ampicilina (\pm DE) en bazo frente al tiempo.

De los resultados obtenidos en este estudio se desprenden las siguientes conclusiones:

- 1.- El procedimiento de diálisis hipotónica utilizado en el presente trabajo ha demostrado ser un método excelente de encapsulación de ampicilina en eritrocitos.
- 2.- La lenta liberación "in vitro" de ampicilina desde los eritrocitos cargados, sugiere que la administración "in vivo" podría inducir cambios en la farmacocinética del antibiótico, así como su vectorización hacia el sistema retículo-endotelial.
- 3.- Se ha observado una liberación sostenida de ampicilina en plasma tras la administración i.v. de eritrocitos portadores. El pico de concentración del fármaco y su eliminación aparente fueron menores en el caso de la administración de eritrocitos portadores en comparación con la administración del fármaco como disolución acuosa. Se observó un incremento significativo de la $t_{1/2}$ en plasma (control $t_{1/2} = 1,51 \pm 0,57$ h; eritrocitos portadores $t_{1/2} = 63,00 \pm 9,73$ h).
- 4.- Los estudios de la distribución tisular "in vivo" muestran que la ampicilina administrada en eritrocitos portadores presenta una distribución selectiva especialmente en tejidos como hígado y bazo.
- 5.- Los eritrocitos portadores de ampicilina pueden actuar como un sistema de liberación sostenida del antibiótico así como conseguir la vectorización selectiva del fármaco a tejidos específicos.

Bibliografía

1. C. Gutiérrez Millán, M.L. Sayalero Marinero, A. Zarzuelo Castañeda, J.M. Lanao. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. *J. Control. Release* 95, 27 (2004).
2. H.G. Eichler, S. Gasic, K. Bauer, A. Korn, S. Bacher. In vivo clearance of antibody-sensitized human drug carrier erythrocytes. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 40 (3) 300 (1986).
3. C. Gutiérrez Millán, A. Zarzuelo Castañeda, M.L. Sayalero Marinero, J.M. Lanao. Factors associated with the performance of carrier erythrocytes obtained by hypotonic dialysis. *Blood cells, Mol. & Dis.* 33 132 (2004).
4. C. Gutiérrez Millán, M. Arévalo, A. Zarzuelo Castañeda, F. G. López, M. L. Sayalero Marinero, J. M. Lanao. Encapsulation and *in vitro* evaluation of amikacin-loaded erythrocytes. *Drug Delivery* (in press).
5. B. Santos, M.L. Sayalero, A. Zarzuelo, J.M. Lanao. Determination of amikacin in biological tissues by HPLC. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 25 (3) 463 (2002).

Autor de contacto:

Nombre y apellidos: Carmen Gutiérrez Millán

e-mail: carmengutierrez@usal.es

Institución: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Salamanca

Dirección: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Avda Campo

Charro s/n 370007

Ciudad: Salamanca

Tel.: 923294536

Fax: 923294515