

## ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD DEL SALBUTAMOL EN CÉLULAS CACO-2: CLON TC7

Belén Valenzuela<sup>1,2</sup>, Adela Martín-Villodre<sup>1</sup>, Amparo Nácher<sup>1</sup>

(1) Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia. Avda. Vicente A. Estellés s/n 46100 Burjassot (Valencia)

(2) Dpto. de Ingeniería, división de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Miguel Hernández de Elche. Ctra. Alicante- Valencia km. 87-03550 San Juan de Alicante.

### Introducción

El salbutamol es un agonista  $\beta_2$  que se utiliza en la práctica clínica para el tratamiento del asma bronquial por sus importantes efectos broncodilatadores. La incidencia del asma, sobre todo en niños, está sufriendo un crecimiento continuo. De hecho, según datos de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica, se estima que la proporción de afectados hoy en día puede duplicar a la que había hace sólo dos décadas, siendo actualmente la enfermedad infantil más frecuente. La biodisponibilidad oral del salbutamol, cuando se administra en forma de comprimidos, resulta variable y baja, del orden del 50 % e incluso inferior. Ello se puede atribuir a su metabolismo hepático e intestinal y a su baja permeabilidad intestinal (1).

Bibliografía reciente ha demostrado que la secreción intestinal de fármacos se debe a la acción de numerosos sistemas transportadores que modulan su incorporación al organismo. En la actualidad se conocen diferentes sistemas secretores que se encuentran en el tejido epitelial intestinal, y que limitan la incorporación al organismo de numerosos fármacos. Los dos sistemas de secreción intestinal más representativos son el sistema MDR (Multidrug Resistance) y el MRP (Multi-drug resistance-associated protein).

En este trabajo se estudia "in vitro" la influencia de estos dos sistemas en la permeabilidad del salbutamol utilizando células Caco-2, clon TC7. Este clon fue aislado a partir de pases tardíos de células Caco-2 y constituye un modelo completamente validado para el

estudio de permeabilidad tanto de fármacos como de xenobióticos en general (2).

### Materiales y Métodos

Las células Caco-2 TC7 se han sembrado en un medio de cultivo adecuado.

Para los experimentos de transporte, las células se siembran con una densidad de  $4 \cdot 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, sobre filtros permeables de policarbonato. Estos filtros presentan un área de 1.13 cm<sup>2</sup> y un diámetro de poro de 0.45  $\mu$ m. Se montan sobre anillos insertados en una placa multipocillo para cultivo.

Dada la densidad de la siembra inicial, las células adquieren la confluencia a las 48 horas, a partir de este momento se inicia un proceso espontáneo de diferenciación que se estabiliza, a partir del día 17 al 21 posterior a la siembra.

El monoestrato celular diferenciado sobre el filtro de policarbonato forma un sistema de dos compartimentos: uno APICAL (Ap), que corresponde in vivo al lumen intestinal, y uno BASOLATERAL (Bl), que corresponde in vivo al espacio intersticial en contacto con los capilares sanguíneos. Ambos se encuentran separados por el filtro que contiene el monoestrato, tal como se representa en la Figura 1.

Este sistema garantiza el libre acceso de los nutrientes a ambos lados del monoestrato celular y permite determinar el flujo trans-epitelial de moléculas.

La integridad de las monocapas se ha determinado midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Solamente se han utilizado

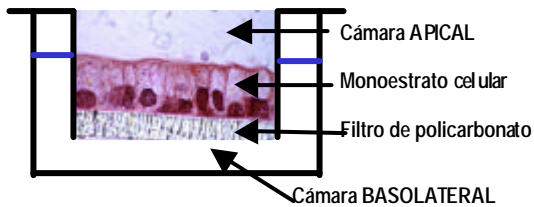


Figura 1. Esquema del montaje experimental

las monocapas celulares que presentaron un valor de TEER > 600  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Valores de TEER inferiores no aseguran la integridad de la monocapa y pueden inducir a errores en el cálculo de la permeabilidad transepitelial de los fármacos.

Por una lado, se ha evaluado el paso transepitelial del salbutamol 100  $\mu\text{M}$  en el sentido apical-basolateral (Ap-BI) y en sentido contrario basolateral-apical (BI-Ap). Por otro lado, se han incorporado diferentes inhibidores de los sistemas activos de secreción, en concentración 100  $\mu\text{M}$ , a las soluciones de salbutamol. Se ha utilizado el verapamilo como inhibidor de la glicoproteína P intestinal (3), y el probenecid como inhibidor específico del sistema secretor MRP2 (4). Se ha utilizado, también, zumo de pomelo natural como un inhibidor de la glicoproteína P y del citocromo P450 (5).

El salbutamol se ha valorado mediante HPLC, utilizando un método validado previamente en nuestro laboratorio.

Como parámetro representativo del transporte se ha utilizado el coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ), calculado mediante la siguiente ecuación:

$$P_{app}(\text{cm/s}) = \Delta Q \cdot (\Delta t \cdot 60 \cdot A \cdot C_0)^{-1},$$

donde  $\Delta Q \cdot \Delta t^{-1}$  representa la velocidad de paso ( $\mu\text{g}/\text{min}$ ),  $C_0$  es la concentración inicial en el compartimento dador ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), y  $A$  es el área del filtro ( $\text{cm}^2$ ) (6).

## Resultados y Discusión

Se ha determinado el transporte vectorial del salbutamol en las monocapas celulares. Como

se observa en la Figura 2, la  $P_{app}$  determinada en sentido BI-Ap es mayor que en sentido contrario. La  $P_{app}$  Ap-BI determinada ha sido  $(3.00 \pm 0.52) \cdot 10^{-7}$  cm/s ( $n=7$ ), y la  $P_{app}$  BI-Ap ha sido  $(5.59 \pm 1.93) \cdot 10^{-7}$  cm/s ( $n=13$ ). La secreción activa del salbutamol se reduce significativamente en presencia de verapamilo 100  $\mu\text{M}$ . La adición de este inhibidor a las soluciones de salbutamol ha reducido la permeabilidad BI-Ap a  $3.77 \pm 0.65 \cdot 10^{-7}$  cm/s ( $n=6$ ) y en cambio ha aumentado la permeabilidad Ap-BI hasta  $5.58 \pm 0.67 \cdot 10^{-7}$  cm/s ( $n=6$ ). Asimismo, la adición de probenecid (100  $\mu\text{M}$ ) a las soluciones de ensayo ha reducido la permeabilidad BI-Ap a  $2.75 \pm 0.60 \cdot 10^{-7}$  cm/s ( $n=6$ ) y en sentido contrario, Ap-BI, ha aumentado hasta  $5.22 \pm 0.84 \cdot 10^{-7}$  cm/s ( $n=6$ ). En presencia de zumo de pomelo sólo se ha podido determinar el valor de permeabilidad en sentido Ap-BI, ya que ha mostrado ejercer un gran efecto tóxico sobre las células cuando era añadido en la cámara basolateral. El valor  $P_{app}$  Ap-BI determinado ha sido  $6.75 \pm 0.49 \cdot 10^{-7}$  cm/s ( $n=6$ ).

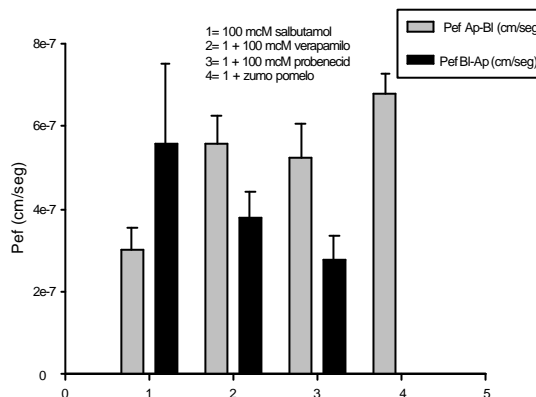


Figura 2. Representación gráfica de las  $P_{app}$  (cm/seg) promedio obtenidas para el salbutamol 100mM en las distintas condiciones de ensayo

Estos resultados parecen sugerir que la secreción del fármaco desde la cara basolateral hacia la apical está mediada, al menos en parte, por la glicoproteína P intestinal y por el sistema MRP2. Ambos actúan como factor limitativo en el rendimiento neto de la permeabilidad del salbutamol a través del epitelio intestinal y

pueden ser un factor crítico en la biodisponibilidad oral del mismo.

### Bibliografía

1. Taburet AM., Schmit B. *Clin. Pharmacokinet.* 26(5): 396 (1994).
2. Caro I., Boluenc X., Rousset M., Meunier V., Bourrié M., Julian B., Joyeux H., Roques C., Berger Y., Zweibaum A., Fabre G. I. J. *Pharm.* 116: 147 (1995).
3. Gatmaitan ZC., Arias M. Advantages in *Pharmacology* 24: 77 (1993).
4. Horikawa M., Kato Y., Sugiyama Y. *Pharm. Res.* 19(9):1345-53 (2002).
5. Takanaga H., Ohnishi A., Matsuo H., Sawada Y. *Biol. Pharm. Bull.* 21(10): 1062 (1998).
6. Artursson P. *J. Pharm. Sci.* 79: 476-482 (1990).

### Autor de contacto:

Amparo Nacher Alonso  
amparo.nacher@uv.es  
Universidad de Valencia  
Avda. Vicente A. Estellés s/n 46100  
Burjassot (Valencia)  
Telf. 96-3544916  
Fax.96-3544911