

MECANISMO DE CESIÓN *IN VITRO* DE CIPROFLOXACINO A PARTIR DE IMPLANTES OSTEOINTEGRABLES

E. Sánchez, C. Castro y C. Evora

Dpto. de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna

Introducción

El tratamiento y prevención de infecciones óseas requiere niveles bactericidas de antibiótico en la zona infectada. Debido a los grandes inconvenientes de la vía sistémica, una alternativa es el uso de sistemas de cesión controlada *in situ*. Muchas de las investigaciones realizadas se han centrado en el uso de gentamicina en distintos vehículos (1,2,3,4,5,6). Sin embargo, recientemente se han propuesto diversos sistemas que ceden fluorquinolonas como alternativa terapéutica a la gentamicina (7, 8,9). No obstante, en muchos de ellos no se mencionan los mecanismos de cesión desde esos sistemas.

El objetivo de este trabajo es estudiar los factores que afectan la cesión *in vitro* de ciprofloxacino desde implantes biodegradables y osteoconductores compuestos por fosfatos, DL-PLA y ciprofloxacino, con el fin de conocer los mecanismos de cesión y optimizar el sistema para proporcionar niveles óptimos del antibiótico durante 6 semanas en el foco de infección.

Materiales y Métodos

Elaboración de implantes. Se prepararon 4 lotes de implantes con una mezcla de fosfatos (P): hidroxiapatita (HAP) (Osteosynth) y fosfato tricálcico (FTC) (Panreac) en la proporción 25:75. A esta mezcla se le añadió una cierta cantidad de DL-PLA de 30 kD (Boehringer Ingelheim) y ciprofloxacino HCl (CFX) (cedido por Laboratorios Bayer). Los lotes se obtuvieron por compresión directa utilizando una prensa hidráulica (Calver), con punzones de 6 mm,

aplicando una presión de 312 MPa. Posteriormente se incubaron en solución tamponada de fosfato isotónico, pH 7,4 a 37°C, durante 8 semanas. Los componentes de los implantes se caracterizaron en cuanto al peso molecular, análisis térmico y estructura cristalina mediante GPC, DSC y difracción de Rayos x, respectivamente.

Resultados y Discusión

Para simplificar la nomenclatura los lotes fueron designados de tal forma que reflejen la proporción de PLA-30 con respecto a los fosfatos y la carga de CFX, por ejemplo, el lote F-20-10 fue elaborado con una mezcla 20/80 de PLA-30/fosfatos y un 10% de CFX. El porcentaje de incorporación de CFX fue del $99,5 \pm 3,4\%$. El peso y el tamaño de los implantes fue de $499 \pm 0,967$ mg y $9,0 (\pm 1,01) \times 6,0 (\pm 0,02)$ mm, respectivamente.

Estudios de cesión *in vitro*

Antes de analizar la cesión de CFX se prepararon dos nuevos lotes, para explicar los cambios observados en la estructura del implante y su influencia sobre la cinética de cesión de CFX. Uno de los lotes se elaboró con todos los componentes de la formulación excepto el antibiótico (implantes blancos) y el segundo fue elaborado únicamente con CFX. Ambos implantes se comprimieron a 312 MPa y se incubaron en el medio de cesión durante 8 semanas, evaluando los cambios macroscópicos, cristalográficos y térmicos.

Los implantes blancos permanecen intactos no apreciándose ningún cambio a lo largo del

ensayo. El pico de transición de los fosfatos varió ligeramente hacia temperaturas más altas, lo que podría ser debido a la transformación de HAP en otra con distinto contenido en Ca^{++} (6) o a una interacción entre el PLA-30 y los fosfatos. Sin embargo, la temperatura de transición vítrea (T_g) y los pesos moleculares medios del PLA-30 no variaron durante el ensayo. Por tanto los cambios en los implantes no pueden ser atribuidos a los fosfatos o al PLA-30.

En los implantes de CFX se aprecia un proceso de hinchamiento que tiene lugar en los primeros 10 minutos de estar en contacto con el medio de cesión. Los difractogramas de Rx (DRX) de los implantes de CFX se recogen en la figura 1.

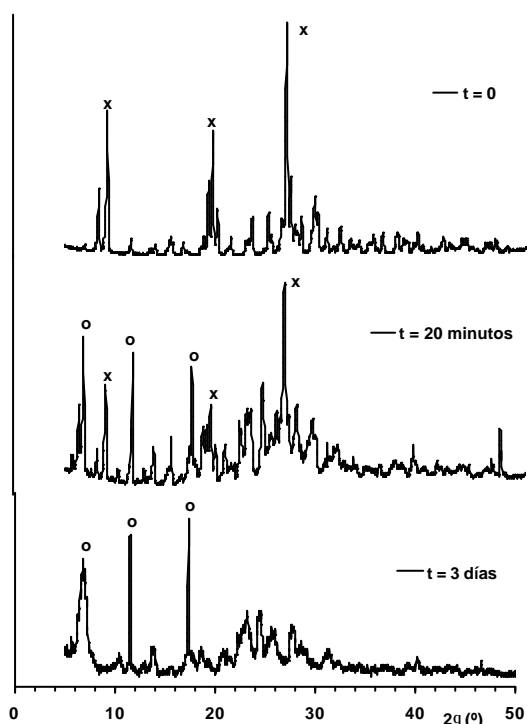


Figura 1. Perfil de DRX de CFX a lo largo de 3 días de incubación en tampón fosfato, pH 7,4; Picos de Bragg: fase seca (x) y fase húmeda (o).

En los DRX de CFX se reflejan cambios cristalininos, diferenciándose a tiempo cero una fase "seca", a los 20 min se observan, junto con algunos picos de Bragg de la fase "seca", nuevos picos correspondientes a una fase "húmeda" y a los 3 días sólo se observan picos correspondientes a la fase "húmeda". Es evidente que se ha producido un cambio

estructural drástico, pasando de una fase "seca" a otra fase "húmeda". Por tanto, se produce un proceso de hinchamiento junto con la formación de una nueva forma, probablemente, una forma hidratada de CFX, que afectará la cesión de CFX desde las diferentes formulaciones.

Efecto de la relación PLA/P. Para evaluar la influencia de este factor sobre la velocidad de cesión de CFX se compararon los lotes F-0-10 frente a F-20-10 y F-50-10, (figura 2).

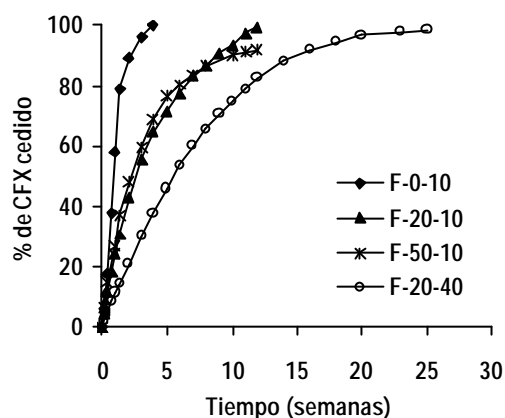


Figura 2. Efecto de la relación PLA/P y de la carga de CFX sobre el perfil de cesión in vitro a partir de las formulaciones F-0-10, F-20-10, F-50-10 y F-20-40.

La formulación sin PLA (F-0-10) fue mucho más porosa. La presión ejercida intramatrix por el hinchamiento llevó a una mayor erosión-disgregación, provocando una cesión de CFX más rápida. La diferencia en el perfil de cesión fue significativa con respecto a las que contienen PLA ($f_2 < 50$). A pesar de que a mayor proporción de PLA se produce un mayor hinchamiento, no se encontraron diferencias entre F-20-10 y F-50-10 ($f_2 = 67,8$). Sin embargo, este hecho se puso de manifiesto en la última fase de la curva donde se observa que, mientras que los implantes de F-20-10 han cedido el CFX en su totalidad, en F-50-10 queda un 15 % remanente debido a una disgregación más lenta. Por tanto, los implantes con PLA-30 mantienen su integridad durante mas tiempo y sufren un mayor hinchamiento dependiente de la concentración. El PLA proporciona cierto grado de plasticidad que aumenta la resistencia a la disgregación y por tanto, la erosión-disgregación

ocurre más tarde, resultando una velocidad de cesión más reducida.

Efecto de la carga de CFX. En la figura 2 se muestra también el efecto de la carga sobre la cesión de CFX para los lotes F-20-10 y F-20-40. El porcentaje cedido desde los implantes conteniendo un 40% de CFX fue menor que el de un 10% ($f_2 < 50$), indicando que la velocidad de cesión de CFX disminuye al aumentar la carga. Este efecto podría estar relacionado con la menor porosidad de los implantes con mayor carga: 9,43% (F-20-40) y 15,3% (F-20-10). Al aumentar la carga, disminuye la porosidad inicial, el implante se hincha en una mayor extensión y el porcentaje de CFX cedido disminuye. Estos resultados están en desacuerdo con lo publicado por otros autores (8), por lo que se procedió a caracterizar estos dos lotes.

Porosidad, captación de agua y pérdida de masa. En las figuras 3 y 4 se observa que la cesión de CFX en porcentaje, al final de la primera semana, se relaciona con el aumento de porosidad e hidratación respectivamente, para cada lote. Sin embargo a pesar del aumento de porosidad y captación de agua más acusado de F-20-40 que de F-20-10 durante la 1ª semana, este efecto no se refleja en el porcentaje cedido pero sí en la cantidad de CFX cedida. A partir de este tiempo la porosidad y la captación de agua permanecen prácticamente constantes, mientras que el CFX continúa cediéndose.

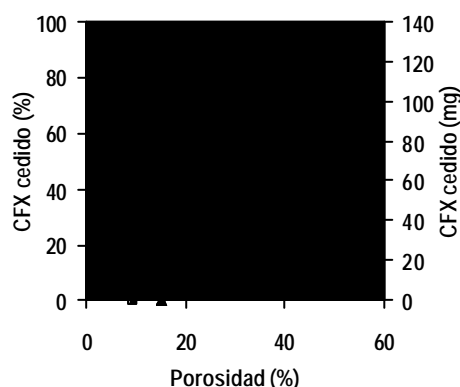


Figura 3. Efecto de la porosidad sobre la cesión in vitro de CFX a lo largo de 8 semanas, desde las formulaciones F-20-10 (triángulo) y F-20-40 (cuadrado); % cedido (símbolo relleno); mg cedidos (símbolo vacío).

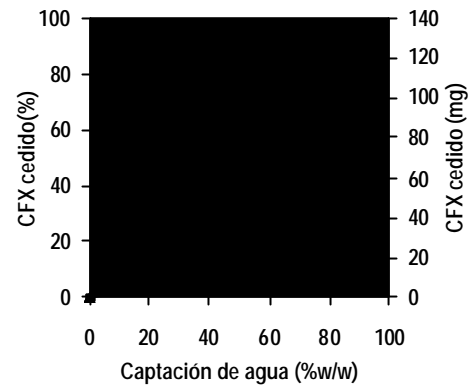


Figura 4. Efecto de la captación de agua sobre la cesión in vitro de CFX a lo largo de 8 semanas, desde las formulaciones F-20-10 (triángulo) y F-20-40 (cuadrado); % cedido (símbolo relleno); mg cedidos (símbolo vacío).

La formulación F-20-10 tiene una relación fármaco:excipientes 1:9, mientras que la relación para F-20-40, con una carga mayor, es de 1:1.5, lo que explicaría que se produzca una mayor captación de agua partiendo de una porosidad menor. El aumento de tamaño y de porosidad tan acusado observado en estos implantes en los primeros tiempos del ensayo, se explican por la presión que ejerce desde el interior el CFX al hincharse, efecto que se refleja en un aumento de porosidad.

En la figura 5 se observa que tanto el porcentaje como la cantidad cedida de CFX están relacionados con la pérdida de masa. Una mayor porosidad y pérdida de componentes del implante debe facilitar la liberación del fármaco.

Teniendo en cuenta que la solubilidad del fármaco en tampón fosfato pH 7,4 es de aproximadamente 130 µg/ml, el mecanismo de cesión será por erosión y posterior disolución del fármaco ya que el CFX retenido en el interior del implante se encuentra a saturación. Los resultados obtenidos por GPC y DSC del PLA-30 indican que el polímero no se degrada y por tanto es el hinchamiento del CFX lo que contribuye a la disgregación del implante.

En resumen, los procesos que tienen lugar a lo largo del ensayo de cesión son: hinchamiento, hinchamiento + erosión y disgregación.

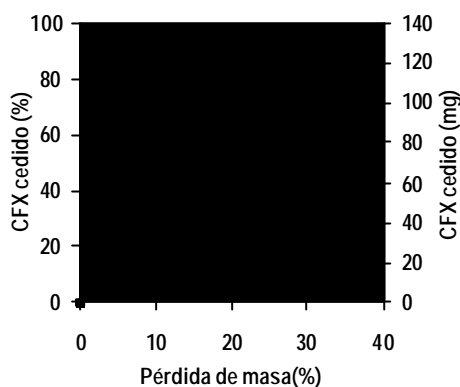


Figura 5 Efecto de la pérdida de masa sobre la cesión in vitro de CFX a lo largo de 8 semanas, desde las formulaciones F-20-10 (triángulo) y F-20-40 (cuadrado); % cedido (símbolo relleno); mg cedidos (símbolo vacío).

De los resultados presentados, es la solubilidad de CFX la que tiene un papel más importante en el mecanismo de cesión desde implantes de PLA/fosfatos, necesitándose el proceso de erosión-disgregación para la completa liberación del antibiótico.

Bibliografía

- Henry S.L. y Galloway K.P. Local Antibacterial therapy for the management of orthopaedic infections. Pharmacokinetic considerations. Clin Pharmacokinet., 29, 36, (1995).
- Thomazeau H. y Langlais F., Relargage d'antibiotiques par implantation osseuse de phosphate tricalcique, Chirurugie, 121, 663, (1996).
- Garvin K.L., Miyano J.A., Robinson D., Giger D., Novak J. y Radio S., "Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model, J. Bone Joint Surg. Am., 76, 1500, (1994).
- Schmidt C., Wenz R., Nies B. y Moll F., Antibiotic in vivo/in vitro release, histocompatibility and biodegradation of gentamicin implants based on lactic acid polymers and copolymers, J. Control. Rel., 37, 83, (1995).
- Meyer J.D., Falk R.F., Kelly R.M., Shively J.E., Withrow S.J., Dernel W.S., Kroll D.J., Randolph T.W. y Manning M.C., Preparation and in vitro characterization of gentamicin-impregnated biodegradable beads suitable for treatment of osteomyelitis, J.Pharm.Sci., 87, 1149, (1998).
- Baro M., Sánchez E., Delgado A., Perera A., y Evora C., In vitro-in vivo characterization of gentamicin bone implants, J.Control. Rel., (2002).
- Overbeck J.P., Winckler S.T., Meffer R., Törmälä P., Spiegel H.U. y Brug E., Penetration of ciprofloxacin into bone: A new bioabsorbable implant, J.Invest.Surg., 8, 155, (1995).
- Ramchandani M. y Robinson D., In vitro in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants, J.Control.Rel., 54, 167, (1998).
- Kanellakopoulou K., Kolia M., Anastassiadis A., Korakis T., Giamarellos-Bourboulis E.J., Andreopoulos A., Dounis E. y Giamarellou H., Lactic acid polymers as biodegradable carriers of fluorquinolones: an in vitro study, Antimicrob. Agents Chemother., 43, 714, (1999).

Autor de contacto:

Esther Sánchez Sánchez

esanchez@ull.es

Dpto. de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna.

Campus de Anchieta. Avda. Astrofísico Francisco Sánchez

La Laguna-Tenerife

Telf.: 922-318-509

Fax: 922-318-514