

## Captación y actividad intrafagocítica de la teicoplanina en neutrófilos humanos

A. B. Rodríguez\*, E. Ortega y C. Barriga

Departamento de Fisiología  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Extremadura  
06071 Badajoz (España)

(Recibido el 2 de diciembre de 1992)

A. B. RODRÍGUEZ, E. ORTEGA and C. BARRIGA. *Uptake and Intraphagocytic Activity of Teicoplanin in Human Neutrophils*. Rev. esp. Fisiol., 49 (3), 163-168, 1993.

The incorporation of antibiotics in phagocytes is necessary for their activity against intracellular microorganisms. The ability of Teicoplanin to enter in human polymorphonuclear leukocytes (PMNs) after infection with *Candida albicans* was investigated using an *in vitro* model previously described. Human PMNs were preincubated with *Candida albicans* for 30 min, after which antibiotic (100 mg/l) was added to cell suspension during 1, 5, 15, 30 and 60 min. The results were expressed as the ratio of the cellular concentration of antibiotic to the extracellular concentration (C/E). Teicoplanin bound rapidly to phagocytes (with a C/E = 2.12 after 1 min of incubation), being the cell-associated drug approximately similar during the entire incubation period. At the same time, Teicoplanin increases the percentage of mortality of *Candida albicans* previously ingested, which was dependent of the incubation period in its presence.

Key words: Teicoplanin, Neutrophils, Intracellular activity.

La teicoplanina es un antibiótico glicopeptídico derivado de *Actinoplanes teicomyceticus* que presenta una potente actividad *in vitro* contra organismos Gram positivos. Es similar a la vancomicina en cuanto a su estructura y mecanismo de acción y su vida media es de 48 horas, lo que explica su relativa eficacia teniendo en cuenta, además, su baja toxicidad (3, 4).

Se ha visto que un cierto número de agentes infecciosos son capaces de sobrevivir intracelularmente y multiplicarse después de ser fagocitados por los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) por lo que los antibióticos usados para tratar infecciones causadas por microorganismos intracelulares deben ser capaces de incorporarse rápidamente a los fagocitos y destruir dichos microorganismos (5, 12, 13).

\* A quien debe dirigirse toda la correspondencia.

En este trabajo se ha estudiado la capacidad de incorporación y la actividad intrafagocítica de la teicoplanina en neutrófilos humanos. Los resultados son expresados como la relación entre la concentración intracelular y extracelular del antibiótico (C/E), evaluándose paralelamente la muerte intrafagocítica del material ingerido.

### Material y Métodos

#### *Polimorfonucleares neutrófilos (PMNs).*

— Fueron obtenidos a partir de sangre venosa heparinizada procedente de donantes voluntarios sanos de ambos sexos y con edades comprendidas entre los 20 y los 40 años. Las células se aislaron utilizando un gradiente de densidad de 1.114 constituido por Ficoll-Hipaque (Monopoly-Resolving-Medium). Una vez lavada la suspensión celular con PBS (Solución salina tamponada con fosfato) se ajustó a  $10 \times 10^6$  células/ml de medio.

*Antibiótico.* — La teicoplanina fue proporcionada en forma de polvo valorado por Marion Merrell Dow. Se preparó una solución madre de 10 mg/l y se conservó a  $-20^\circ\text{C}$ , diluyéndola en PBS a la concentración requerida para el estudio, hasta su utilización.

*Suero.* — El suero utilizado para la opsonización de *Candida albicans* se obtuvo a partir de sangre venosa sin heparinizar de donantes voluntarios sanos.

*Microorganismos.* — Se utilizó *Candida albicans* como microorganismo a fagocitar por los PMNs cultivada en Mueller-Hilton-Agar y ajustada a  $30 \times 10^6$  células/ml de PBS. La utilización de *C. albicans* en este modelo experimental proporciona una evaluación rápida por microscopía del número de ellas que ha sido fagocitada por los PMNs a la vez que permite calcular por tinción las que han sido además destruidas. Para la realización de la curva pa-

trón del antibiograma se utilizó *Escherichia coli* (ATCC 35218 strain).

*Capacidad de incorporación del antibiótico a los PMNs y relación con su actividad microbicida.* — Se siguió la técnica descrita por RODRÍGUEZ *et al.* (10). *C. albicans* (0,5 ml) fue inicialmente incubada con 100  $\mu\text{l}$  de suero durante 15 min a  $37^\circ\text{C}$  en baño maría. Tras la preincubación, se añadieron 0,5 ml de la suspensión de neutrófilos (proporción 3 *C. albicans*/ 1 PMN), incubándose 30 min en las condiciones anteriores, tiempo suficiente para que se produzca la fagocitosis. Posteriormente, las muestras se lavaron 2 veces durante 5 min a 300 g con PBS, para eliminar las *C. albicans* libres que no se hubiesen fagocitado. A continuación, el precipitado de cada muestra se resuspendió en 1 ml de medio en controles, o en 1 ml de antibiótico (100 mg/l) en las muestras problemas y se incubó durante 1, 5, 15, 30 y 60 min. Finalizado cada uno de estos tiempos, se realizó una rápida centrifugación en frío (3 min a  $600 \times g$ ), tras la que se despreciaron los sobrenadantes controles y se tomaron los de las muestras con antibiótico. Estos últimos se conservaron a  $-20^\circ\text{C}$ . El precipitado de uno de los duplicados de cada muestra problema fue igualmente congelado y resuspendido en 1 ml de medio (muestras para el antibiograma). El otro duplicado, igual que los precipitados controles, recibió como colorante vital azul de metileno. Se contabilizó en hemocitómetro de Neubauer el número de *C. albicans* fagocitadas muertas en 100 PMNs, para hallar el porcentaje de las muertas.

*Preparación del agar.* — El agar (Mueller-Hilton, 38 %) en agua destilada se esterilizó en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  y 1,5 atmósferas de presión durante 15 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y sin dejar que se solidificara se dosificó en placas Petri (7 ml) que se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$ . Se prepararon tubos con 3 ml de agar líquido que se mantuvieron en baño

maría a 48 °C. Los tubos recibieron 0,1 ml de solución de microorganismos sensibles *Escherichia coli* al 75 %. Inmediatamente se añadió el contenido de los tubos sobre las placas Petri obteniéndose una doble capa de agar donde la superficial contenía el microorganismo.

*Niveles de antibiótico en los sobrenadantes y precipitados problemas.* — Antes de la realización del antibiograma —método de ANHALT (1)—, se sonicaron los precipitados de las muestras problemas para provocar la ruptura de los neutrófilos y la libre salida del antibiótico, evitando el atrapamiento del mismo en el interior de los fagocitos. Se añadieron 20 µl de cada muestra a los discos para antibiograma y se incubaron las placas Petri a 37 °C durante 24 h midiéndose a continuación los diámetros de inhibición de los sobrenadantes y precipitados de las muestras problemas, a los distintos tiempos de incubación indicados. Paralelamente se realizó una curva patrón con diferentes concentraciones del antibiótico, desde 0,5 a 100 mg/l, para la interpretación de los resultados, que se calcularon como mg antibiótico/l en los sobrenadantes y como mg antibiótico/l en  $5 \times 10^6$  células en los precipitados problemas. Finalmente, los valores fueron expresados como la relación entre la concentración celular y extracelular del antibiótico (C/E).

*Análisis estadístico.* — Todos los resultados se expresaron como la media  $\pm$  S.D. del conjunto de determinaciones realizadas por duplicado para un mismo tiempo. En el estudio estadístico, los resultados fueron analizados utilizando la *t*-Student, siendo  $p < 0,05$  el menor nivel de significación.

**Resultados**

La tabla I muestra la muerte intrafagocítica de *C. albicans* en valores medios

Tabla I. Muerte intrafagocítica (%) de *C. albicans* en PMNs controles e incubados con teicoplanina (100 mg/l)

Cada valor representa la media  $\pm$  S. D. de 10 determinaciones realizadas por duplicado.

Tiempo de incubación (min)	N.º de <i>C. albicans</i> fagocitadas y muertas por 100 PMNs	
	Control	Teicoplanina
1	12,22 $\pm$ 4,63	19,53 $\pm$ 3,44 <sup>a</sup>
5	14,22 $\pm$ 2,30	25,18 $\pm$ 8,55 <sup>a</sup>
15	13,86 $\pm$ 3,95	29,75 $\pm$ 8,97 <sup>a,c</sup>
30	16,68 $\pm$ 1,75 <sup>c</sup>	29,88 $\pm$ 7,47 <sup>a,d</sup>
60	18,77 $\pm$ 3,63 <sup>c,e,g</sup>	40,01 $\pm$ 7,52 <sup>b,e,f,g</sup>

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  y (<sup>b</sup>)  $p < 0,01$  respectoa los valores controles.  
<sup>c</sup>  $p < 0,05$ ; (<sup>d</sup>)  $p < 0,01$  y (<sup>e</sup>)  $p < 0,001$  respecto a los valores obtenidos a 1 minuto de incubación.  
<sup>f</sup>  $p < 0,05$  respecto a los valores obtenidos a los 5 minutos de incubación.  
<sup>g</sup>  $p < 0,01$  respecto a los valores obtenidos a los 15 minutos de incubación.

(poder candidicida) en PMNs incubados con 100 mg/l de teicoplanina o con un medio control sin antibiótico. En presencia de teicoplanina se induce un significativo aumento en el porcentaje de *C. albicans* muertas de entre las fagocitadas por 100 neutrófilos, existiendo a todos los tiempos de incubación diferencias estadísticas en

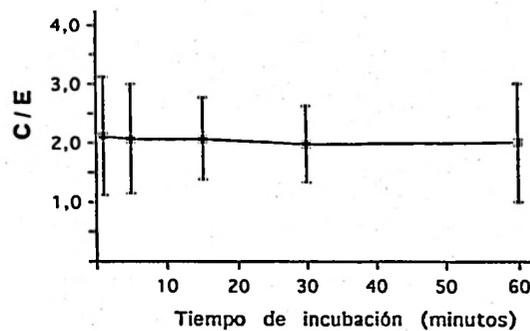


Fig. 1. Relación entre la concentración celular (C) y extracelular (E) de teicoplanina en PMNs humanos incubados con 100 mg/l de antibiótico a diferentes tiempos (1, 5, 15, 30 y 60 min). Cada punto representa la media  $\pm$  D. S. de 10 determinaciones realizadas por duplicado.

relación a las muestras controles realizadas en ausencia del antibiótico. Además, y como es lógico pensar, el tiempo de incubación también influye en el poder candidicida, obteniéndose tanto en controles como en presencia del antibiótico los mayores porcentajes de muerte de *C. albicans* al mayor de los tiempos de incubación estudiados (60 min).

Los valores medios de los resultados encontrados en la capacidad de incorporación del antibiótico en PMNs a los distintos tiempos de incubación se encuentran representados gráficamente en la figura 1, como la relación de la concentración celular y extracelular (C/E). Como puede observarse, la capacidad de incorporación de teicoplanina a PMNs durante el primer minuto de incubación es muy alta (C/E = 2,12) manteniéndose prácticamente todo el antibiótico en el interior de estas células a lo largo del tiempo de incubación.

### Discusión

Uno de los problemas más importantes de la actividad de los antibióticos frente a los microorganismos es que hay bacterias patógenas capaces de sobrevivir intracelularmente en los fagocitos después de su ingestión. Esta capacidad puede llevar a infecciones prolongadas, ya que los microorganismos se protegen así del suero y de los antibióticos extracelulares (7). Una terapia óptima para estas infecciones podría ser el uso de antibióticos con capacidad de unirse o incorporarse a las células fagocíticas e inactivar a los organismos intracelulares (6).

En el presente estudio se ha observado que la teicoplanina es incorporada muy rápidamente a los PMNs (a 1 minuto de incubación la relación C/E es 2,12) y su permanencia en ellos es larga, siendo la concentración celular prácticamente el doble que la extracelular a todos los tiempos estudiados (1, 5, 15, 30 y 60 min). Además, se observa un incremento significa-

tivo en la muerte intrafagocítica de *C. albicans* en presencia del antibiótico, en relación a los controles. Similares resultados fueron encontrados por otros autores (2, 9) con la utilización del antibiótico marcado radiactivamente, demostrando que la teicoplanina es rápida y ávidamente concentrada en PMNs, liberándose al medio extracelular muy lentamente a la vez que incrementa la muerte intracelular.

En general, la mayoría de los agentes antimicrobianos estudiados tienen una baja capacidad de penetración y sólo unos pocos como rifampicina, cloranfenicol, tetraciclina, polimixina B, etambutol y clindamicina pueden permanecer a una aceptable concentración dentro de los fagocitos por un largo período de tiempo (8, 11), lo mismo que parece ocurrir con teicoplanina. Pero no siempre un alto nivel intracelular está directamente relacionado con una alta capacidad microbicida. Así, HAND y KING-THOMSON (5) vieron que la gentamicina, que se incorpora difícilmente a los fagocitos, causa una muerte específica de *S. aureus* mayor que otros agentes antimicrobianos usados a dosis más altas.

Se han encontrado diferencias estadísticas apreciables en la muerte de *C. albicans* en presencia del antibiótico a los 15, 30 y 60 min comparándola con la del primer minuto de incubación. Esto indica que la función intrafagocítica del antibiótico es dependiente del tiempo. Algunos autores han demostrado que la teicoplanina es introducida muy rápidamente en PMNs por un activo proceso dependiente de energía, así como que el antibiótico parece quedar localizado superficialmente (asociado a la membrana), lo que estaría relacionado con su función; los PMNs se trasladarían al sitio de la infección y podrían liberar allí el antibiótico para destruir los microorganismos causantes de la infección (2, 9).

Con una relación C/E > 1 en el caso de la teicoplanina, este antibiótico ofrecería ventajas frente a los que no penetran (re-

lación C/E < 1). La mayor concentración celular en el caso de la teicoplanina indica que se concentra eficazmente unido y/o en el interior de los PMNs. Esto, junto a su baja toxicidad y su relativa eficacia sobre microorganismos intrafagocíticos, sugiere que podría tener una buena aplicación clínica.

### Resumen

La incorporación de los antibióticos a los fagocitos es necesaria para su actividad contra los microorganismos intracelulares. Se evalúa la capacidad de incorporación de teicoplanina a leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) tras la infección con *Candida albicans* mediante la utilización de un modelo *in vitro*. Los PMNs se preincubaban con *Candida albicans* durante 30 minutos, tiempo óptimo para la fagocitosis, después de la cual se añaden a la suspensión celular 100 mg/l del antibiótico incubándose durante 1, 5, 15, 30 y 60 min. Los resultados se expresan como la relación entre la concentración celular y extracelular del antibiótico (C/E). La teicoplanina se une rápidamente a los PMNs (C/E = 2,12 después de 1 min de incubación) manteniéndose las concentraciones similares en todos los tiempos. Este antibiótico incrementa el porcentaje de muerte de *Candida albicans* previamente ingeridas, propiedad que resulta ser dependiente del tiempo de incubación.

Palabras clave: Teicoplanina, Neutrófilos, Actividad intracelular.

### Bibliografía

1. Anhalt, S. P.: En «Manual of Clinical Microbiology» (4.ª edic.). (Lennette, E. H. et al. eds.). AMS. Washington DC. 1985. pp. 1009-1014.
2. Carlone, N. A., Cuffini, A. M., Ferrero, M., Tullio, V. y Avetta, G.: *J. Antimicrob. Chemother.*, 23, 849-859, 1989.
3. Carper, H. T., Sullivan, G. W. y Mandell, G. L.: *J. Antimicrob. Chemother.*, 19, 659-662, 1987.
4. Glupczynski, Y., Lagast, H., Van der Auwera, P., Thys, J. P., Crokaert, F. y Yourassowsky, E.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 29, 52-57, 1986.
5. Hand W. L. y King-Thomson, N. L.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 29, 135-140, 1986.
6. Hand, W. L., King-Thomson, N. y Holman, J. W.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31, 1553-1557, 1987.
7. Horwitz, M. A.: *Rev. Infect Dis.*, 4, 104-123, 1982.
8. Koga, H.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31, 1904-1908, 1987.
9. Maderazo, E. G., Breaux, S. P., Woronick, C. L., Quintilliani, R. y Nightingale, Ch. H.: *Chemotherapy*, 34, 248-255, 1989.
10. Rodríguez, A. B., Ortega, E., Benítez, P., Barriga, C. y De la Fuente, M.: *Rev. esp. Quimioterap.*, 2, 329-334, 1989.
11. Van der Auwera, P., Bonnet, H. y Husson, M.: *J. Antimicrob. Chemother.*, 26, 683-688, 1990.
12. Welch, W. D., Davis, D. y Thrupp, L. D.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 20, 15-20, 1981.
13. Yourtee, E. L. y Root, R. K.: En «Advances in Host Defence Mechanism». (Gallin, J. L., Fauci, A. S., ed.). Raven Press. Nueva York, 1982, 187-209.

