

"IN VITRO" AND "IN VIVO" DISTRIBUTION OF AMIKACIN IN PERITONEAL MACROFAGES USING CARRIER ERYTHROCYTES

*Elsa Briones Cuesta, Clara Isabel Colino Gandarillas, Carmen Gutiérrez Millán,
José Martínez Lanao.*

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.

Resumen / Abstract

Aminoglycosides are a group of very effective antibiotics against extracellular infections produced by Gram- bacteria, but not against intracellular ones, because of their low cellular uptake. The purpose of this study is to enhance the accumulation of aminoglycoside antibiotics in phagocytic cells using carrier erythrocytes. Amikacin carrier erythrocytes were prepared by means of a hypotonic dialysis method using a hypoosmotic buffer of 90 mOsm/kg and a resealing buffer of 500 mOsm/kg. "In vitro" studies were carried out by incubation of amikacin solution and amikacin loaded erythrocytes with a peritoneal macrophage monolayer at different times. "In vivo" studies were performed in two groups of rats who received amikacin solution and amikacin loaded erythrocytes respectively by intraperitoneal administration. After 24 hours, peritoneal macrophages were extracted and isolated. Concentrations of amikacin were determined by an HPLC technique. The results show that cellular accumulation increase with carrier erythrocytes in both "in vitro" and "in vivo" experiments. It seems to indicate the usefulness of amikacin carrier erythrocytes to deliver this antibiotic to macrophages, which might be useful in therapy for the treatment of pathogens located in phagocytic cells.

Los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos muy efectivos frente a infecciones

extracelulares producidas por bacterias Gram -, pero no frente a las intracelulares, debido a su baja penetración en las células. El objetivo de este estudio es incrementar la acumulación de antibióticos aminoglucósidos en células fagocíticas usando eritrocitos portadores. Los eritrocitos conteniendo amicacina fueron preparados mediante un método de diálisis hipotónica, usando un tampón hipoosmótico de 90 mOsm/kg y un tampón de resellado de 500 mOsm/Kg. Los estudios "in vitro" se llevaron a cabo mediante la incubación de una solución de amicacina y eritrocitos cargados con amicacina con una monocapa de macrófagos peritoneales a diferentes tiempos. Los estudios "in vivo" se realizaron en dos grupos de ratas que recibieron solución o eritrocitos cargados con amicacina respectivamente, mediante administración intraperitoneal. Tras 24 horas se extrajeron y aislaron los macrófagos peritoneales. Las concentraciones de amicacina se determinaron mediante una técnica de HPLC. Los resultados muestran que la acumulación celular aumenta utilizando eritrocitos como portadores, tanto en los experimentos "in vitro" como "in vivo". Esto parece indicar la utilidad de los eritrocitos portadores de amicacina para llevar el antibiótico a los macrófagos, lo que puede ser útil en terapéutica para el tratamiento de patógenos localizados en células fagocíticas.

Introducción

Los aminoglucósidos son antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones por gérmenes Gram -. Una de las limitaciones que plantean es su baja penetración en el interior de las células (1). El uso de sistemas portadores, como los eritrocitos (2) podría solucionar este problema, permitiendo la utilización de estos agentes en el tratamiento de infecciones intracelulares. Además, los estudios en células fagocíticas son de gran utilidad para predecir la eficacia de estos antibióticos en el tratamiento de infecciones intracelulares.

Los objetivos del presente trabajo han sido la puesta a punto de un método de aislamiento e incubación de macrófagos peritoneales de rata así como estudiar la penetración de antibióticos aminoglucósidos (amicacina) en células fagocíticas utilizando eritrocitos portadores obtenidos mediante diálisis hipotónica, tanto "in vitro" como "in vivo".

Materiales y Métodos

Los eritrocitos cargados con amicacina se prepararon mediante un método de diálisis hipotónica utilizando un tampón hipoosmótico de 90 mOsm/kg y un tampón de resellado de 500 mOsm/kg. (3, 4) Los macrófagos de rata se obtuvieron a partir del fluido peritoneal cuatro días después de una inyección intraperitoneal de 2 mL de solución de tioglicolato al 3 %. Una vez lavados, fueron resuspendidos en medio de cultivo RPMI suplementado con suero bovino fetal, L-glutamina y una mezcla de antibióticos al 1% a una concentración de células de $4 \cdot 10^6$ células/mL. Para los estudios "in vitro", la suspensión de macrófagos peritoneales se colocó en pocillos de incubación (1mL por pocillo) y se incubaron durante 2 horas a 37°C, en atmósfera humidificada de aire/CO₂ (95/5 %). Las células no adheridas se eliminaron por aspiración y la monocapa de macrófagos adherida se cubrió con 1 mL de una solución de amicacina (0.5 mg/mL) o 1 mL de eritrocitos cargados con amicacina con un hematocrito del 50%. Tras la incubación durante 30, 60, 90 y 120 minutos, se eliminaron los eritrocitos no

adheridos y se lisaron los adheridos con NH₄Cl 150mM, pH 7,4. Finalmente, se recogieron los macrófagos adheridos a la placa con 1 mL de NaOH 1M/Tritón X-100 0.025% (5). Los estudios "in vivo" se llevaron a cabo en dos grupos de ratas que habían recibido tres días antes una inyección de tioglicolato al 3% por vía intraperitoneal: uno recibió una solución de amicacina a una dosis de 7,5 mg/Kg y el otro 1 mL de eritrocitos conteniendo amicacina, en ambos casos por vía intraperitoneal. Después de 24 horas se extrajeron y aislaron los macrófagos peritoneales tras varios lavados y lisis de los eritrocitos con NH₄Cl 150 mM, pH 7,4. Las concentraciones de amicacina en el medio de cultivo y los macrófagos se determinaron mediante una técnica de HPLC (C.V. <5,5%) usando una derivatización con o-phtaldialdehído y detección de fluorescencia ($\lambda_{excitación}=360$ y $\lambda_{emisión}=435$) (6).

Resultados y Discusión

En los estudios "in vitro", usando un cultivo de macrófagos con amicacina libre las concentraciones intracelulares son inferiores que las concentraciones extracelulares. Utilizando eritrocitos como sistemas portadores las concentraciones intracelulares siguen siendo inferiores que las extracelulares si bien se observa un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,001$) en la relación de concentraciones intracelulares/extracelulares, como puede observarse en la figura 1:

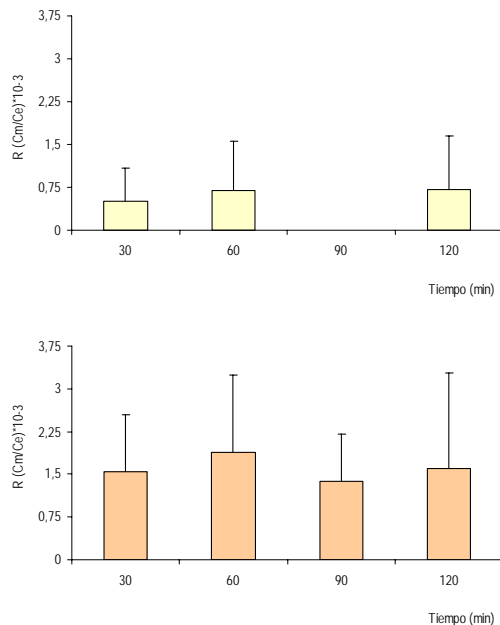


Figura 1. Variación de la relación (R) entre la concentración de amicacina en macrófagos peritoneales (C_m) y la concentración extracelular (C_e) utilizando disoluciones acuosas (A) y eritrocitos portadores (B) conteniendo amicacina, en estudios "in vitro".

Los experimentos "in vivo" muestran una distribución relativa en los macrófagos con un aumento significativo de las concentraciones intracelulares de aminoglucósidos utilizando un tratamiento de 24 horas con eritrocitos cargados con amicacina (Figura 2).

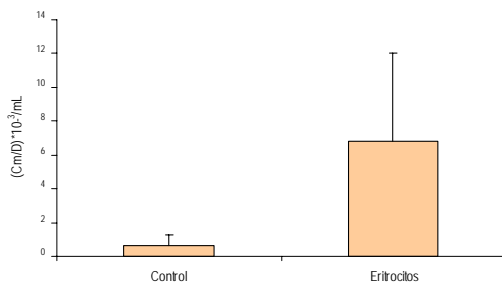


Figura 2. Variación de la relación entre la concentración de amicacina en macrófagos peritoneales (C_m) y la dosis administrada (D) utilizando solución acuosa de amicacina y eritrocitos portadores de amicacina, en estudios "in vivo".

Bibliografía

1. M. Maurin and D. Roault. Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 2977-2986 (2001).
2. M. Hamidi and H. Tajerzadeh. Carrier erythrocytes: an overview. *Drug Delivery*, 10, 9-20, (2003).
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 (2004) 132-140.
4. C. Gutiérrez Millán, M. Arévalo, A. Zarzuelo Castañeda, F.G. López, M.L. Sayalero, J.M. Lanao. Encapsulation and in vitro evaluation of amikacin-loaded erythrocytes. *Drug Delivery*, (in press).
5. J. A. Jordán, F. J. Álvarez, L. A. Lotero, A. Herráez, J. C. Díez y M. C. Tejedor. In vitro phagocytosis of carrier mouse red blood cells is increased by Band 3 cross-linking or diamine treatment. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 34 (2001) 143-149.
6. 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) (2002). 463-473.

Autor de contacto:

Nombre y apellidos: Clara Isabel Colino Gandarillas

e-mail: ganda@usal.es

Institución: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Dirección: Avda Campo Charro s/n

Ciudad: Salamanca

Telf.: 923294536

Fax: 923294515

