

## PENETRACIÓN DE FOSFOMICINA EN CÉLULAS HEP-2 Y SU INTERACCIÓN CON DEOXINIVALENOL

MARTÍNEZ G<sup>1,2</sup>, SORACI AL<sup>1,3</sup>, TAPIA MO<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Área Toxicología, Dpto. de Fisiopatología, Fac. Cs. Veterinarias, UNCPBA-Tandil

<sup>2</sup> CIC, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

<sup>3</sup> CONICET, Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

**RESUMEN:** Fosfomicina (FOS) es un antimicrobiano utilizado en producción porcina para prevención y tratamiento de bacterias resistentes durante el post destete. Su presentación como sal cálcica permite incorporarse en el alimento o agua de bebida. Diversos estudios evidencian la presencia del antibiótico en tejidos y fluidos como pulmón y secreciones bronquiales. La línea celular HEP-2 (células laringeas) constituye un modelo para estudiar la penetración de FOS disponible sistémicamente. Deoxinivalenol (DON) es una micotoxina producida por *Fusarium* sp. que contamina las materias primas e influye negativamente el rendimiento de las pjaras. El objetivo del trabajo fue estudiar la penetración de FOS en líneas de cultivos celulares y evaluar el potencial efecto interactivo de DON sobre la penetración del antibiótico en líneas de cultivos celulares. Los resultados muestran que las concentraciones de antibiótico intracelular en células HEP-2 incubadas con 130 ppm de FOS cálcica, oscilaron entre 0.4 y 1.12 µg/ml con un  $t_{max}$  de 8 h. Cuando las células HEP-2 fueron incubadas con FOS y DON, la penetración celular del antibiótico no presentó variación significativa, en relación a la  $C_{max}$  (1.10 ppm) y  $t_{max}$  (12 h). Se concluye que la presencia de la micotoxina no modificaría la distribución celular de FOS en cerdos.

**Palabras claves:** fosfomicina, deoxinivalenol, células HEP-2, cerdos

## PENETRATION OF FOSFOMYCIN IN HEP-2 CELLS AND ITS INTERACTION WITH DEOXYNIVALENOL

**ABSTRACT:** Fosfomicin (FOS) is an antibiotic used in swine production for the treatment and prevention of resistant bacteria during the post weaning. The calcium salt form can be used in food or drinking water. Several studies showed the presence of this antibiotic in tissues and fluids such as lungs and bronchial secretions. The HEP-2 line cell is a model to study the penetration of systemically available FOS. Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin produced by *Fusarium* sp. that contaminates the raw materials and influences the performance of pigs negatively. The aim of this work was to study the penetration of FOS in cell culture lines and evaluate the interactive effect of DON on the penetration of the antibiotic in cell culture lines. The results showed that intracellular antibiotic concentrations in HEP-2 cells incubated with 130 ppm of calcium FOS oscillated between 0.4 and 1.12 mg/ml with a  $t_{max}$  of 8 h. When HEP-2 cells were incubated with FOS and DON, a significant variation was not observed on the cellular penetration of the antibiotic, as regard the  $C_{max}$  (1.10 ppm) and  $t_{max}$  (12 h). It is concluded that the presence of the mycotoxin would not alter the cellular distribution of FOS in pigs.

**Key Words:** fosfomicin, deoxynivalenol, HEP-2 cells, pigs

Fecha de recepción: 05/05/11

Fecha de aprobación: 20/10/11

**Dirección para correspondencia:** Martínez Guadalupe. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, CP 7000, Buenos Aires, Argentina.

**E-mail:** [guadam@vet.unicen.edu.ar](mailto:guadam@vet.unicen.edu.ar)

## INTRODUCCIÓN

En producción animal intensiva con el fin de obtener buenos rendimientos, se utilizan, entre otros xenobióticos, a los antibióticos, ya sea como aditivos promotores del crecimiento (incorporados al alimento o agua de bebida a dosis subterapéuticas) o como agentes terapéuticos, metaflácticos y profilácticos (1, 2). La fosfomicina (FOS) es un antimicrobiano de naturaleza hidrosoluble muy utilizado en las producciones intensivas tal como ocurre en producción porcina donde es empleada como una alternativa clínica para la prevención y tratamiento de bacterias resistentes durante el post destete, período productivo crítico del lechón.

FOS ( $C_3H_7PO_4$ , PM 138.06 g/mol) es un antibiótico natural no relacionado estructuralmente con otros agentes antimicrobianos, descubierto en 1961 (3, 4, 5). El uso de FOS en animales y humanos es recomendado por presentar una baja toxicidad y excelente eficiencia y espectro antimicrobiano contra bacterias gram-positivas y gram-negativas (6). Su actividad bactericida es mediada por bloqueo de la biosíntesis de la pared celular en la primera etapa de la síntesis del peptidoglicano (7). FOS no posee resistencia cruzada con ningún otro antibiótico o quimioterápico (8). La molécula de FOS se encuentra disponible bajo diferentes sales, adaptadas a la vía enteral (FOS-cálcica y trometamol) y parenteral (FOS disódica) (9). En animales, su presentación en forma de sal cálcica permite ser utilizada fácilmente al incorporarse al agua de bebida o al alimento. Una vez que la droga es absorbida en intestino y alcanza la circulación sistémica, la unión de FOS a proteínas es insignificante. Su distribución dentro de las células es pobre predominando en el espacio extracelular. Algunos estudios han evidenciado la presencia del antibiótico en distintos tejidos como músculo, pulmón y secreciones bronquiales, ojo, hueso, líquido cefalorraquídeo, tejido linfático y fluidos purulentos. Una proporción pequeña de la molécula pasa por bilis, leche y calostro (10). Si bien se conoce que la fosfomicina llega a distintos tejidos, existe escasa información sobre la concentración de droga biodisponible que ingresa a las células de diferentes tejidos del organismo. Teniendo en cuenta que la droga se detecta en pulmón y secreciones bronquiales, la línea celular HEp-2 (células laringeas) puede representar un modelo adecuado para estudiar *in vitro* la penetración de fosfomicina biodisponible.

En cuanto a los factores asociados a la alimentación que pueden afectar la producción de una piara, la presencia de compuestos antinutricionales en la dieta influye negativamente en el rendimiento productivo. En esta región del país, las micotoxinas producidas por *Fusarium* entre ellas el deoxinivalenol (DON) son contaminantes comunes de materias primas, particularmente del

maíz, principal componente de la dieta del cerdo. Se ha reportado que concentraciones superiores a 1 mg DON/kg alimento desarrollan efectos depresivos sobre la performance en porcinos (11). La enfermedad clínica por efectos de DON en cerdos se caracteriza por menor consumo, rechazo del alimento, vómitos, inmunosupresión y hemorragias (12). DON actúa sobre las células inhibiendo la síntesis proteica y tiene acción citotóxica sobre tejidos de rápido crecimiento y recambio (13). Luego de ingresar por vía oral, DON se absorbe rápidamente en estómago y primera porción del duodeno (14, 15). Goyarts y Dänicke (16) demostraron que más del 50% de la concentración de DON presente en la dieta se absorbe rápidamente y distribuye a distintos tejidos donde pobremente es metabolizado. Luego de 24 h. de la administración oral de DON, la toxina no se encuentra en plasma. Si bien ha sido ampliamente estudiado el efecto de la toxina sobre las células del organismo en intoxicaciones agudas y crónicas, no se ha descrito las potenciales interacciones que podría ocurrir cuando la toxina se encuentra en bajas concentraciones (situaciones subclínicas) frente a otros xenobióticos de utilización frecuente en producción porcina, como lo son los antibióticos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar *in vitro*, la penetración del antibiótico FOS en líneas de cultivos celulares y evaluar el potencial efecto interactivo de DON sobre la penetración del antibiótico en líneas de cultivos celulares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 CULTIVO DE CÉLULAS HEP-2

Para el cultivo, la línea celular HEp-2 (carcinoma laringeo humano) se incorporó en botellas con 80% de Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) y 20% suero fetal bovino (SFB). A las 24 h. se cambio el medio para que continúe la multiplicación celular con crecimiento en monocapa (MEM Y SFB 10%). Cuando estuvieron en confluencia (ocupando el 100% de la superficie de crecimiento), fueron consideradas aptas para repicar (transferencia). En este punto se extrajo el sobrenadante, se lavó con solución salina de buffer fosfato (PBS) y se incorporó tripsina durante 10 min. a 37°C. Como consecuencia de la acción enzimática, se desprendieron las células de la superficie y se rompieron las uniones intercelulares. Posteriormente, las células se resuspendieron en PBS y fueron centrifugadas durante 5 min. a 1500 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en MEM y SFB 10% y fue transferido a otras botellas. Las células se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos y se mantuvieron en estufa a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Los cultivos celulares fueron regularmente testeados. La confluencia de la monocapa celular fue mayor al 80% correspondiendo a una densi-

dad de  $1.2 \times 10^6$  células por pocillo, momento en el cual se consideraron aptas para ser empleadas en los experimentos.

## 2.2 TRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES

Concentraciones de DON utilizadas en células HEP-2: se obtuvieron distintas soluciones de DON a partir de un estándar puro de 200 ppm (Sigma-Aldrich®). Se trabajó con concentraciones descendentes buscando el límite no tóxico del DON sobre las células. El límite no tóxico determinado fue de 1 ppm ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), a dicha concentración no se observó citotoxicidad (desprendimiento de la monocapa celular) transcurrida las 4 h de incubación.

Concentraciones de FOS utilizadas en células HEP-2: el antibiótico empleado fue Fosbac® (fosfomicina cálcica) provisto por el laboratorio Bedson S.A. La concentración de FOS para el tratamiento de los cultivos de células HEP-2 fue de 130 ppm. La misma fue estimada considerando que *in vivo*, la fosfomicina cálcica administrada a razón de 30 mg/Kg de PV en lechones post destete, se absorbe un 20 % (17) y que la volemia de un lechón de 15 Kg es de 0,69 L (4,6 % PV).

## 2.3 PENETRACIÓN INTRACELULAR DE FOSFOMICINA

Se validó una metodología adecuada para estudiar la penetración de fosfomicina en cultivos celulares a partir de modificaciones de la técnica reportada por Darouiche y Hamill en 1994 (18).

Los grupos experimentales fueron tres. Un grupo control de cultivos de células HEP-2 sin antibiótico ni toxina; un segundo grupo de placas de cultivos incubadas con FOS y un tercer grupo incubado con FOS y DON. Las concentraciones del antibiótico y micotóxina fueron solubilizadas en solución fisiológica y posteriormente incorporadas a los cultivos celulares. Las placas de cultivo fueron incubadas en estufa ( $37^\circ\text{C}$ ) a distintos tiempos (0, 5, 10, 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18 y 24 h).

## 2.4 EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Finalizada la incubación, las placas del cultivo fueron lavadas dos veces con 2 ml de agua HPLC, con el fin de eliminar el antibiótico que no penetró a las células. El agua de cada lavado fue recolectada en tubos de polipropileno, rotulados como antibiótico extracelular y centrifugadas a 3.500 rpm durante 6 minutos. Alícuotas de  $30 \mu\text{l}$  del sobrenadante fueron recolectadas en viales y llevadas a 1 ml con agua HPLC (dilución 1:100) para ser analizados en HPLC masa/masa.

Por otro lado, para la determinación del antibiótico intracelular, se incorporaron 2 ml de agua HPLC a cada pocillo de las placas de cultivo. Las mismas se sellaron y sonicaron durante 30

minutos, con el fin de lisar las células y liberar la FOS intracelular. Posteriormente se centrifugaron a 10.000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  durante 6 minutos; el sobrenadante fue filtrado y 1 ml del mismo incorporado en viales para su posterior análisis.

## 2.5 ANÁLISIS

Las concentraciones intracelular y extracelular de fosfomicina fueron determinadas por triplicado en cromatografía líquida de alta performance masa-masa (HPLC MS/MS) según el método de Soraci et al (2010) (17). El volumen celular en células HEP-2 fue calculado multiplicando el número de células HEP-2 por pocillo ( $1,2 \times 10^6/1 \text{ ml}$  de agua HPLC) con el volumen promedio de agua intracelular de células mononucleares ( $3,75 \times 10^{-6} \mu\text{l}$ ) (19).

Los resultados correspondientes a los distintos grupos experimentales fueron analizados estadísticamente bajo test t- student con el empleo del programa SAS.

## RESULTADOS

Las concentraciones de antibiótico intracelular en las placas incubadas con 130 ppm de FOS cálcica, oscilaron entre 0,4 y  $1,12 \mu\text{g}/\text{ml}$  en los distintos tiempos de incubación. Se observó que el antibiótico ingresa y sale de las células en forma continua, alcanzando la concentración máxima ( $C_{\text{max}}$ ) de  $1,12 \text{ ppm}$  a un tiempo ( $t_{\text{max}}$ ) de 8 h (figura 1). Bajo esta forma detectamos que solo menos del 1 % del antibiótico tratado logró ingresar a las células; permaneciendo en mayor proporción en el espacio extracelular. La sumatoria de las concentraciones obtenidas de FOS intracelular y extracelular para cada tiempo de incubación, coincidió con la concentración inicial del antibiótico (130 ppm) que se incorporó a los cultivos celulares (figura II).

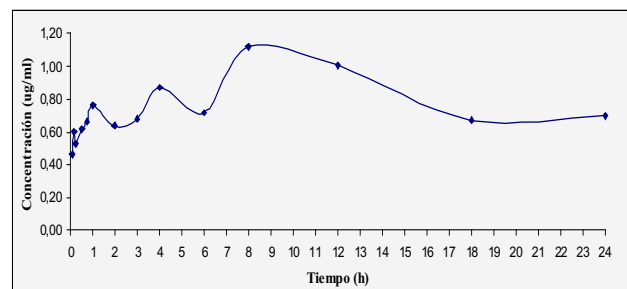


Figura 1. Comportamiento intracelular FOS en HEP-2 correspondiente a placas de cultivo incubadas con 130 ppm FOS cálcica.

Las placas de cultivo incubadas con 130 ppm FOS cálcica y 1 ppm DON, mostraron una concentración de FOS intracelular que fluctuó entre 0,3 y  $1,10 \text{ ppm}$  (figuras 3 y 4). Se obtuvo un comportamiento muy similar a las observadas en las células HEP-2 incubadas sin toxina. En este

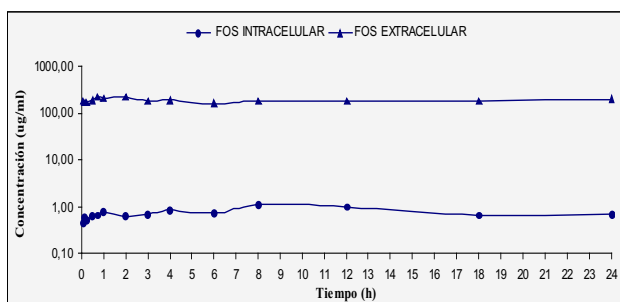


Figura 2. Comportamiento intracelular y extracelular FOS en HEP-2 correspondiente a placas de cultivo incubadas con 130 ppm FOS cálcica.

grupo experimental la Cmax de FOS intracelular fue de 1,10 ppm vs. 1,12 ppm de FOS intracelular de las placas incubadas únicamente con antibiótico. La diferencia radicó en que el pico de Cmax (1,10 ppm) se presentó con un tmax de 12 h, significando 4 h posteriores al tmax obtenido en células HEP-2 tratadas sin toxina. A pesar de ello, el análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), las diferencias sólo se deben al azar.

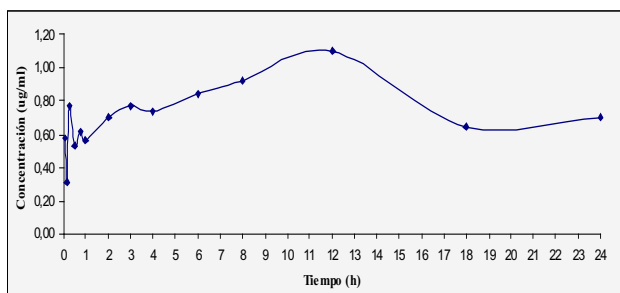


Figura 3. Comportamiento intracelular FOS en HEP-2 correspondiente a placas de cultivo incubadas con 130 ppm FOS cálcica y 1 ppm DON.

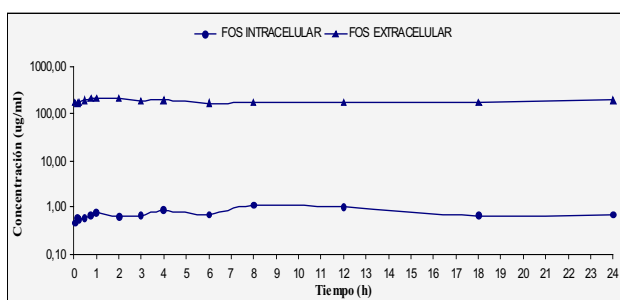


Figura 4. Comportamiento intracelular y extracelular FOS en HEP-2 correspondiente a placas de cultivo incubadas con 130 ppm FOS cálcica y 1 ppm DON.

## DISCUSIÓN

La concentración de fosfomicina intracelular en células HEP-2 es baja permaneciendo en alta proporción como antibiótico extracelular. La escasa concentración de antibiótico dentro de las células se debería a la naturaleza hidrosoluble de FOS (8) lo que dificultaría el pasaje por difusión

pasiva a través de la membrana celular. En base a ello, su presencia en el interior de las células podría ser explicada a partir de una difusión activa de transmembrana. Kahan y cols. en 1974 (20) demostraron la existencia de mecanismos activos de transporte para FOS que permiten su entrada a las bacterias. Uno de ellos es el que transporta el L- $\alpha$ -glicerol-fosfato y otro, inducible, que lleva a la D-glucosa-6-fosfato al interior de la célula bacteriana (8, 10). En nuestro estudio se demostró la presencia FOS dentro de las células HEP-2 y ello podría deberse a un mecanismo de transporte similar al que se describe en las bacterias. Además, la escasa proporción de FOS intracelular podría estar relacionada en forma directa por el escaso número de transportadores de membrana en las células HEP-2. La presencia de FOS dentro de las células también fue demostrada por Höger et al. en 1985 (21) al trabajar con células polimorfonucleares humanas.

Por otro lado, es conocido que DON afecta la síntesis de proteínas (16, 22) y por ende interfiere con proteínas transportadoras como GLUT, SGLT-1 y transportadores de aminoácidos (23). Si bien no existieron diferencias significativas entre las placas de cultivo incubadas con FOS y aquellas incubadas con FOS y DON, el comportamiento de entrada celular activa del antibiótico podría verse comprometido cuando se acompaña con concentraciones potencialmente tóxicas de micotoxina.

El empleo de cultivos de células HEP-2 significó ser una herramienta útil para evaluar la proporción de antibiótico que ingresaría a células sistémicas a partir de la fosfomicina biodisponible en plasma porcino.

## AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento dirigido a Guillermo H. Arroyo, Personal de Apoyo de CONICET, por su ayuda técnica en los cultivos celulares. También el agradecimiento a Denisa S. Pérez, Becaria de CONICET, por su colaboración en los diferentes ensayos realizados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Carro MD, Ranilla MJ. Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. 2002. Disponible en: <http://www.midiatecavipec.com>.
2. Torres C, Zarazaga M. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? Gac Sanit 2002; 16 (2): 109-112.
3. Hendlin D, Stapley EO, Jackson M, Wallick H, Miller AK, Wolf FJ, et al. Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of Streptomycetes. Sci 1969; 166 (901): 122-123.
4. Gattinger R, Mayer B, Heinz G, Guttman C, Zeitlinger M, Joukhadar C, et al. Single-dose pharmaco-

- kinetics of fosfomicin during continuous venovenous haemofiltration. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58 (2): 367-371.
5. Sumano LH, Ocampo CL, Gutierrez OL. Intravenous and intramuscular pharmacokinetics of a single-daily dose of disodium-fosfomicin in cattle, administered for 3 days. *J Vet Pharmacol Ther* 2007; 30 (1): 49-54.
  6. Gallego A, Rodriguez A, Mata JM. Fosfomicin: pharmacological studies. *Drugs Today* 1974; 10: 161-168.
  7. Hernández S, García J, Muñoz J. Actividad *in vitro* de fosfomicina frente a enterobacterias de origen urinario productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Rev Esp Quimioter* 2009; 22 (1): 25-29.
  8. Gobernado M. Fosfomicina. *Rev Esp Quimioter* 2003; 16 (1): 15-40.
  9. Escolar-Jurado M, Azanza-Perea JR, Sádaba-Díaz de Rada B, Honorato-Pérez J. Tetraciclinas, cloranfenicol y fosfomicina. *Med* 1998; 7 (76): 3524-3532.
  10. Popovic M, Steinort D, Pillai S, Joukhadar C. Fosfomicin: an old, new friend?. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 127-142.
  11. Avantaggiato G, Havenaar R, Visconti A. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food Chem Toxicol* 2004; 42 (5):817-824
  12. Lawlor P, Brendan-Lynch P. Mycotoxins in pig feeds 2: clinical aspects. *Ir Vet J*. 2001; 54 (4):172-176
  13. Desjardins AE. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology. APS Press. St. Paul, Minnesota. 2006 .
  14. Eriksen GS, Pettersson H, Lindberg JE. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. *Arch Anim Nutr* 2003; 57 (5):335-345.
  15. Dänicke S, Valenta H, Klobasa F, Döll S, Ganter M, Flachowsky G. Effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated wheat in diets for fattening pigs on growth performance, nutrient digestibility, deoxynivalenol balance and clinical serum characteristics. *Arch Anim Nutr* 2004; 58:1-17.
  16. Goyarts T, Dänicke S. Bioavailability of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. *Toxicol Lett* 2006; 163 (3):171-182.
  17. Soraci AL, Pérez DS, Martínez G, Dieguez SN, Tapia MO. Disodium-fosfomicin pharmacokinetics and bioavailability in post weaning piglets. *Res Vet Sci* 2010. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003452881000247X> .
  18. Darouiche RO, Hamill RJ. Antibiotic penetration of a bactericidal activity within endothelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(5):1059-1064.
  19. Kiem S, Schentag JJ. Interpretation of antibiotic concentration ratios measured in epithelial lining fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(1): 24-36.
  20. Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. The mechanism of action of fosfomicin (phosphonomycin). *Ann NY Acad Sc* 1974; 235: 364-386.
  21. Höger PH, Seger RA, Schaad UB, Hitzig WH. Chronic granulomatous disease: uptake and intracellular activity of fosfomicin in granulocytes. *Pediatr Res* 1985; 19 (1): 38-44.
  22. Dänicke S, Goyarts T, Döll S, Grove N, Spolders M, Flachowsky G. Effects of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol on tissue protein synthesis in pigs. *Toxicol Lett* 2006; 165 (3): 297-311.
  23. Awad WA, Aschenbach JR, Setyabudi FMCS, Razzazi-Fazeli E, Böhm J, Zentek J. *In vitro* effects of Deoxynivalenol on small intestinal D -glucose uptake and absorption of Deoxynivalenol across the isolated jejunal epithelium of laying hens. *Poult Sci* 2007; 86: 15-20.