

TD-55-1

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Se registra esta Tesis Doctoral  
al libro 25 número 100 del libro  
correspondiente.

Sevilla, 31 OCT. 1994  
El Jefe del Negociado de Tesis.

*[Handwritten signature]*

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en el Dto. de Microbiología  
de esta Universidad desde el día 4 de Noviembre  
hasta el día

Sevilla 7 de Noviembre de 1994  
EL DIRECTOR DE Departamento

*[Handwritten signature]*

R. 12705

**PENETRACION Y ACTIVIDAD INTRACELULAR  
DE CINCO FLUORQUINOLONAS EN  
LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES  
HUMANOS**

Trabajo realizado en el Departamento  
de Microbiología de la Universidad de  
Sevilla, para optar al grado de  
doctor, por la licenciada D<sup>a</sup> Sofía  
Ballesta Mudarra.

*[Handwritten signature]*

Sevilla, 1.994



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

D. Evelio J. Perea Pérez, catedrático del Departamento de microbiología de la Universidad de Sevilla y D. Alvaro Pascual Hernández, profesor titular del mismo Departamento,

**CERTIFICAN:**

Que D<sup>a</sup> Sofía Ballesta Mudarra ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulada "Penetración y actividad intracelular de cinco fluorquinolonas en leucocitos polimorfonucleares humanos".

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmamos el presente certificado , en Sevilla a 20 de Octubre de 1.994.

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup> Prof. E. J. Perea

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup> Prof. A. Pascual

*A la memoria  
de mi padre.*

**AGRADECIMIENTOS.**

A los profesores Evelio. J. Perea y Alvaro Pascual que me brindaron la oportunidad de participar en su equipo. Por su inestimable dirección y apoyo para la realización de este estudio.

A M<sup>a</sup> del Carmen Conejo por iniciarme en las técnicas del trabajo en laboratorio.

A la profesora Isabel García por su desinteresada y continúa asistencia.

A Esperanza Ballesta, José M<sup>a</sup> Piñar y Rafael Ramos, por la tolerancia y facilidades que me han ofrecido para poder llevar a cabo este proyecto.

A Nuria Salas y Rafael García por su colaboración en la confección de este documento.

# INDICE

I.-	INTRODUCCION . . . . .	Pag. 1
II.-	HIPOTESIS DE TRABAJO . . . . .	Pag. 44
III.-	MATERIAL . . . . .	Pag. 47
IV.-	METODOS . . . . .	Pag. 59
V.-	RESULTADOS . . . . .	Pag. 74
VI.-	DISCUSION . . . . .	Pag. 131
VII.-	CONCLUSIONES . . . . .	Pag. 151
VIII.-	BIBLIOGRAFIA . . . . .	Pag. 155

# **I. INTRODUCCION**

# I.- INTRODUCCION

1.	CELULAS FAGOCITICAS; LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTROFILOS . . . .	Pag. 3
2.	ACTIVIDAD MICROBICIDA DE LOS PMN . . . .	Pag. 6
	2.1. Mecanismos independientes de oxígeno	Pag. 6
	2.2. Mecanismos dependientes de oxígeno .	Pag. 9
3.	INTERACCIONES DE AGENTES ANTIMICROBIANOS CON PMN . . . . .	Pag. 13
	3.1. Efectos indirectos . . . . .	Pag. 16
	3.2. Efectos directos . . . . .	Pag. 17
4.	ESTUDIOS DE PENETRACION INTRACELULAR DE ANTIMICROBIANOS . . . . .	Pag. 20
	4.1. Mecanismos básicos de penetración intracelular . . . . .	Pag. 24
5.	ESTUDIOS DE ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LOS ANTIMICROBIANOS . . . . .	Pag. 27
6.	QUINOLONAS . . . . .	Pag. 32
	6.1. Clasificación . . . . .	Pag. 32
	6.2. Mecanismo de acción . . . . .	Pag. 35
	6.3. Actividad in vitro . . . . .	Pag. 37
	6.4. Farmacocinética . . . . .	Pag. 38
	6.5. Metabolismo y excreción . . . . .	Pag. 39
	6.6. Estabilidad . . . . .	Pag. 40

## **1. CELULAS FAGOCITICAS; LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTROFILOS (PMN)**

El desarrollo de una enfermedad infecciosa, una vez que el microorganismo responsable ha conseguido superar las barreras mecánicas que suponen las superficies cutáneas y mucosas, dependerá en gran medida de la capacidad que tengan las células fagocíticas para combatir la invasión microbiana<sup>(1)</sup>.

Entre las células fagocíticas se incluyen los monocitos circulantes, los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y eosinófilos. Los PMN son las células fagocíticas más numerosas circulando en sangre periférica, siendo además las primeras en llegar al lugar de la infección.

Los PMN surgen de células hematopoyéticas (o formadoras de sangre) de la médula ósea<sup>(2,3)</sup>. De células madres pluripotenciales no diferenciadas, mieloblastos, se originan por mitosis los mielocitos neutrófilos y es durante esta transición de fases cuando el neutrófilo adquiere los "gránulos primarios". Una vez que el mieloblasto se convierte en mielocito, cesan las divisiones celulares y éste último sufre un proceso de maduración a través de etapas conocidas como metamielocito neutrófilo, neutrófilo en banda y finalmente neutrófilo segmentado o granulocito polimorfonuclear neutrófilo. Durante este proceso de maduración se producen múltiples alteraciones nucleares y citoplásmicas, tales como la formación de "gránulos secundarios".

Los PMN circulantes en sangre periférica representan sólo el 5% del total corporal. La mitad aproximadamente de la población intravascular de los PMN no se encuentran circulando por el torrente sanguíneo, sino que está adherida al endotelio de los pequeños vasos, fenómeno conocido con el nombre de marginación. La vida media de los PMN en sangre es de 6 a 8 horas. Después se localizan en los tejidos, donde permanecen funcionales durante uno o dos días. Las células senescentes son eliminadas por los macrófagos esplénicos o a través de las superficies mucosas.

Cuando se produce una infección o inflamación, los neutrófilos migran hacia el lugar en respuesta a sustancias químicas originadas localmente en un proceso conocido como **quimiotaxis**. Las sustancias quimiotácticas pueden ser generadas por bacterias (por ejemplo, formilmetionilpéptidos), por macrófagos o neutrófilos en el lugar de la infección (por ejemplo, el leucotrieno  $LTB_4$ ) o por activación del sistema del complemento (fundamentalmente  $C_{5a}$ ). Los neutrófilos son capaces de detectar concentraciones nanomolares de estas sustancias, reconocer diferencias a lo largo del tiempo en la ocupación de receptores quimiotácticos de distintas partes de su superficie celular, integrar esta información y trasladarse con un movimiento direccional hacia el lugar donde se localiza la inflamación. Una vez en presencia de estas señales quimiotácticas, los PMN se adhieren al endotelio capilar, a otros tejidos y a la superficie de los microorganismos. Este fenómeno de la **adherencia** es específico, es decir, mediado por receptores. Se reconocen en el neutrófilo receptores para el fragmento  $C_{3b}$  del complemento y para los componentes de la matriz extracelular laminina y fibronectina. La laminina, fibronectina y la fracción  $C_{3b}$  del complemento pueden unirse a otros tejidos del huésped o a la superficie de los microorganismos facilitando así la fijación del neutrófilo.

Para que el microorganismo sea fácilmente reconocido e ingerido por la célula fagocítica, sufre un proceso de **opsonización** en el cual las partículas que deben ser fagocitadas se cubren de unas sustancias denominadas opsoninas. El sistema de opsoninas está formado por unas opsoninas termoestables, representadas por la inmunoglobulina G principalmente, y unas opsoninas termolábiles, representadas por la fracción  $C_{3b}$  del complemento. Ambas se unen a receptores específicos de la superficie bacteriana, desencadenando el proceso de **fagocitosis** una vez que entran en contacto con las células fagocíticas

Una vez opsonizado, el microorganismo es fácilmente reconocido e ingerido por las células fagocíticas. El proceso de fagocitosis comprende, pues, la adherencia e ingestión. En la fase de **ingestión** la célula fagocítica emite desde la membrana plasmática, pseudópodos que rodean al microorganismo a ingerir. Este proceso se produce mediante la contracción de los filamentos de actina y miosina del citoplasma de la célula. Cuando los pseudópodos envuelven completamente al microorganismo y se fusionan entre sí, se forma una vesícula rodeada de membrana, denominada fagosoma. En este momento los lisosomas migran hacia los fagosomas y se fusionan con ellos, liberando su contenido en el interior. Tras este proceso denominado degranulación los fagosomas pasan a denominarse fagolisosomas.

## 2. ACTIVIDAD MICROBICIDA DE LOS PMN

Son dos las principales armas de la actividad microbicida de los PMN: mecanismos dependientes de oxígeno y mecanismos independientes de oxígeno. Los mecanismos independientes de oxígeno son los responsables de la destrucción microbiana en medios anaeróbicos tales como el tracto gastrointestinal, grietas gingivales y mucosa vaginal. Para ello utilizan el contenido enzimático de los gránulos con capacidad microbicida (Tabla I). Los mecanismos dependientes de oxígeno cuentan con moléculas tóxicas producidas como resultado de la explosión respiratoria.<sup>(4,5,6,7)</sup>

### 2.1. Mecanismos independientes de oxígeno.

Los gránulos primarios (azurófilos) que contienen mieloperoxidasa, hidrolasas ácidas, lisozimas, catepsina G, BPI (Factor Bactericida estimulador de la permeabilidad), defensinas y proteasa ácidas,<sup>(5)</sup> se funden con el fagosoma, después de la fagocitosis y desarrollan su actividad microbicida a nivel local. Estos gránulos contienen agentes que pueden facilitar la penetración de los PMN en los tejidos y la formación de cavidades y abscesos. Los productos de estos gránulos pueden inactivar a los quimioatrayentes y a los mediadores inflamatorios y de este modo, pueden participar en limitar la respuesta inflamatoria.

Los gránulos secundarios (específicos) contienen lactoferrina, lisozima, citocromo b, proteínas de unión de la vitamina B<sub>12</sub> y ciertos receptores de moléculas. Gran parte del contenido de estos gránulos es vertido al exterior de la célula, donde se piensa que ejercen una función reguladora de la respuesta inflamatoria.<sup>(5)</sup> Los gránulos secundarios aumentan la respuesta inmune normal. Generan quimioatrayentes tales como el C<sub>5a</sub> mediante escisión enzimática de C<sub>5</sub>. Estos gránulos también contienen un quimioatrayente de monocitos y de este modo pueden aumentar el reclutamiento de PMN y monocitos en las áreas de inflamación. Algunos de los mediadores liberados de los gránulos secundarios tienen una actividad antimicrobiana potencial. La lactoferrina, una glicoproteína, puede limitar el hierro disponible a los microorganismos para el crecimiento. Los gránulos secundarios también son importantes para la quimiotaxis.

Se ha identificado un tercer tipo de gránulos, "gránulos terciarios", que contienen gelatinasa, citocromo b y el receptor de carácter glicoproteico MAC-1, importante mediador en la adherencia. El papel de estos gránulos en la función de los PMN no es del todo conocido.

Tabla I. Componentes microbicidas de los gránulos de los PMN.

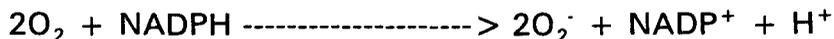
Componentes antimicrobianos en los gránulos de los PMNs	Localización	Concentración en PMN $\mu\text{g}/10^6$
* Lisozimas	Gránulos azurófilos y específicos	3
* Lactoferrina	Gránulos específicos	2 - 6
* Factor incrementador de la permeabilidad (BPI)	Gránulos azurófilos	< 1
* Catepsina G	Gránulos azurófilos	1 - 2
* Defensinas	Gránulos azurófilos	4 - 6

## 2.2. Mecanismos dependientes de oxígeno.

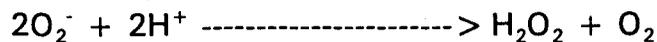
El término explosión respiratoria hace referencia a una serie de cambios abruptos en el metabolismo del oxígeno que ocurren cuando el fagocito ingiere bacterias u otras partículas, o contacta con diferentes estimuladores de membrana, como es el caso del acetato de forbol miristato (PMA), ionóforos, fracción C<sub>5a</sub> del complemento y una serie de péptidos sintéticos o naturales.

Una vez que los PMN han sido estimulados, se produce un aumento brusco en el consumo de oxígeno por parte de los mismos y comienzan a liberar grandes cantidades de aniones superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al medio circundante. Al mismo tiempo, las células comienzan a oxidar grandes cantidades de glucosa por la vía de la hexosa monofosfato.

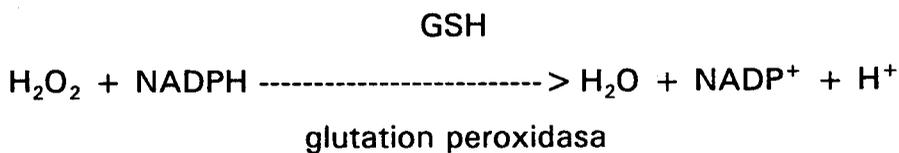
La primera reacción que se produce consiste en la reducción del oxígeno a O<sub>2</sub><sup>-</sup> a expensas de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH), que actúa como dador de electrones:



La mayor parte del O<sub>2</sub><sup>-</sup> es rápidamente convertida en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por dismutación:



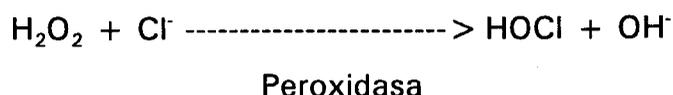
La NADPH también participa como dador de electrones en una reacción encaminada a eliminar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dependiente del glutatión:



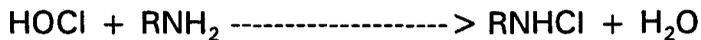
El aumento en el consumo de NADPH activa la oxidación de la glucosa por la vía de la hexosa monofosfato, conduciendo a la reposición del NADPH que se había consumido.

Por la activación de la explosión oxidativa se generan agentes microbicidas resultantes de la reducción parcial del oxígeno. El anión superóxido y el peróxido de hidrógeno son muy importantes, pues constituyen los productos iniciales de una gran cascada que conducirá a la formación de sustancias altamente tóxicas para los microorganismos. Estos potentes microbicidas pueden ser de dos tipos: halógenos oxidados y radicales oxidantes.

Los halógenos oxidados son potentes antimicrobianos (por ejemplo el Clorox, que no es más que una solución de hipoclorito sódico). En el PMN es el Cl<sup>-</sup> el sustrato de la reacción catalizada por una hemoproteína que se localiza en los gránulos azurófilos, la mieloperoxidasa, y en la que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es utilizado para oxidar este sustrato:

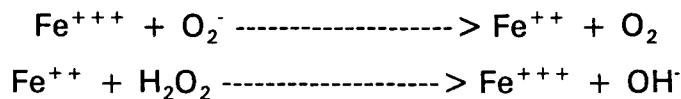


En los tejidos, el HOCl reacciona con aminas ambientales para formar variadas cloraminas con distintas propiedades biológicas<sup>(8)</sup>.



Algunos de estos compuestos, como la cloramina (NH<sub>2</sub>Cl) son incluso más potentes microbicidas que el propio HOCl.

Los radicales oxidantes son menos conocidos. Entre ellos se encuentra el radical hidróxilo (OH<sup>·</sup>).<sup>(9)</sup> Este radical reacciona casi instantáneamente con la mayoría de las moléculas orgánicas que encuentra, y se produce en la llamada "reacción de Haber-Weiss", en la que el Fe<sup>+++</sup> es reducido a Fe<sup>++</sup> por el O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, para después volver a ser oxidado a Fe<sup>+++</sup> por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con la consiguiente producción de OH<sup>·</sup>



La fuente de hierro para esta reacción ha sido muy discutida. Actualmente se piensa que el mejor candidato es la ferritina, que liberaría Fe<sup>++</sup> al medio, cuando está expuesta al O<sub>2</sub><sup>·-</sup><sup>(10)</sup>.

Los productos de la explosión respiratoria son fundamentales para conseguir la muerte intracelular de los microorganismos, resultando particularmente importantes en el caso de *Staphylococcus aureus*. Esto se pone de manifiesto en los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica. Los granulocitos de estos pacientes no presentan defectos en la quimiotaxis, fagocitosis ni degranulación, pero son incapaces de destruir las bacterias una vez que las han

ingerido, por presentar defectos en la actividad microbicida oxígeno-dependiente.<sup>(1,4,11)</sup> En la mayoría de los pacientes se trata de una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X, caracterizada por anormalidades cuantitativas o cualitativas en el citocromo b<sub>558</sub>, proteína compleja involucrada en el transporte de electrones hasta la formación de aniones superóxido. En una minoría de casos, sin embargo, la herencia es autosómica recesiva y existe un déficit de proteínas citosólicas que actúan como cofactores en la activación de la cadena respiratoria del PMN.<sup>(11)</sup> La ausencia de productos de la explosión oxidativa en los PMN de estos pacientes tiene como traducción clínica el padecimiento de infecciones recidivantes, siendo *Staphylococcus aureus* uno de los patógenos más frecuentemente involucrados.

### **3. INTERACCIONES DE AGENTES ANTIMICROBIANOS CON PMN.**

La modulación de los mecanismos de defensa por los antimicrobianos ha constituido un importante foco de atención en los últimos 30 años. Actualmente, aún aceptando que la principal razón para utilizar los antimicrobianos se fundamenta en la capacidad que tienen para destruir o inhibir el crecimiento de los microorganismos, existen suficientes evidencias para apoyar que la acción estimuladora o supresora de estas sustancias sobre los mecanismos defensivos del huésped puede, en ocasiones, desempeñar un importante papel en el éxito o fracaso de un tratamiento antibiótico.

Las interacciones de los agentes antimicrobianos con las funciones de las células fagocíticas han sido estudiadas exhaustivamente, y los resultados han sido objeto de excelentes revisiones en los últimos años <sup>(12-18)</sup>.

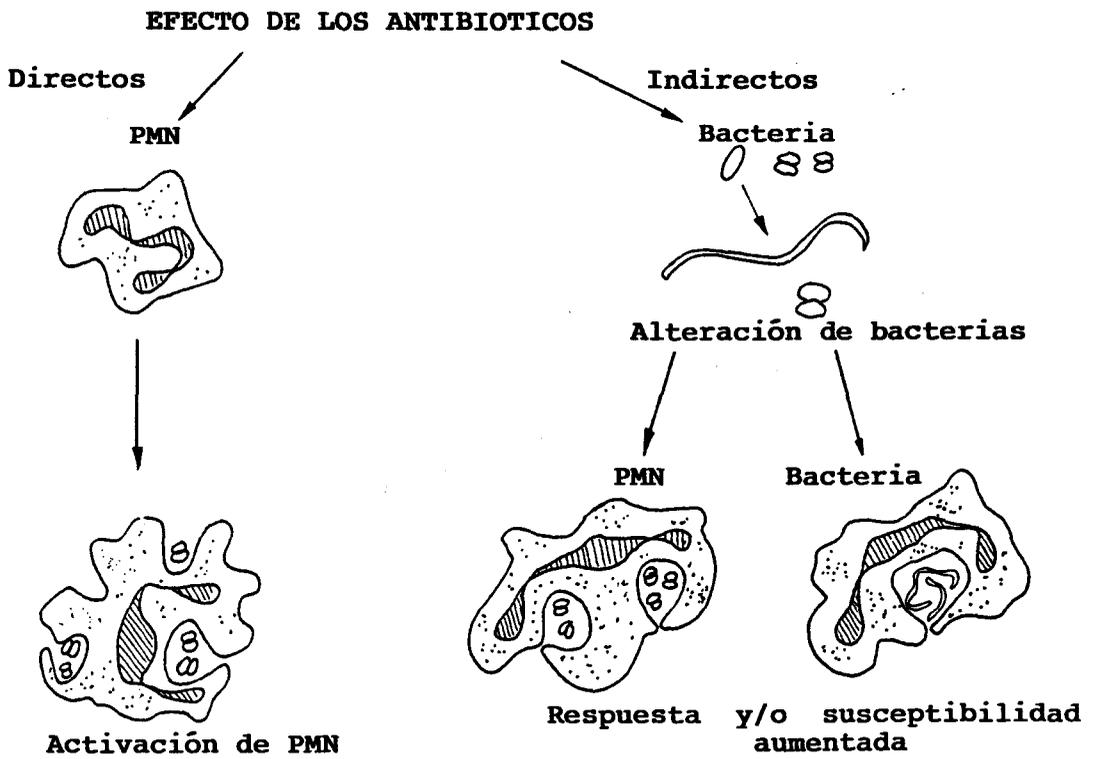
Las células fagocíticas más frecuentemente utilizadas en los diferentes estudios han sido los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, debido a su papel relevante en la lucha contra la infección.

Los agentes antiinfecciosos pueden actuar con los PMNs de dos formas (Figura 1):

- alterando directamente las funciones del PMN.
- modificando las bacterias con consecuencias indirectas sobre la fagocitosis del PMN, destrucción intracelular o respuestas oxidativas<sup>(19)</sup>.

Un tercer modo de interacción sobre el que hay pocos datos disponibles es la modificación de los agentes antiinfecciosos por los PMN; tal es el caso de los macrólidos. Se postula que ocurriría una modificación de la estructura de estos antimicrobianos por interacción con los productos de la explosión oxidativa de los leucocitos, resultando moléculas más tóxicas para los microorganismos<sup>(20)</sup>.

Figura 1. Posibles interacciones de los agentes antiinfecciosos con PMN.



### **3.1. Efectos indirectos de los agentes antimicrobianos sobre los PMNs.**

El efecto de la exposición in vitro de las bacterias a concentraciones subinhibitorias de determinados antimicrobianos determinan modificaciones en éstas que les hacen ser más fácilmente destruidas por la acción de los PMN<sup>(21,22)</sup>.

Este efecto también se puede lograr exponiendo a las bacterias durante muy corto periodo de tiempo a concentraciones altas de los antimicrobianos<sup>(23-25)</sup>.

Los resultados de estos estudios resultan difíciles de interpretar por la falta de uniformidad metodológica entre los distintos autores. Así, existen variaciones en la naturaleza de la cepa bacteriana elegida, el tiempo de exposición a los antimicrobianos, la naturaleza y concentración del antibiótico usado, la función evaluada y la técnica empleada. A pesar de ello, se puede afirmar que los betalactámicos en general, son capaces de determinar modificaciones en microorganismos como *Staphylococcus aureus*, estreptococos del grupo B, algunas enterobacterias y *Haemophilus influenzae* tipo b, que los hace más vulnerables frente a las células fagocíticas. El aumento de la actividad fagocítica por el pretratamiento bacteriano no está del todo aclarado, pero podría ser debido a un cambio en los requerimientos opsónicos de la bacteria o a una estimulación de los mecanismos bactericidas de los leucocitos por parte de las bacterias modificadas<sup>(26-28)</sup>.

Con respecto a los inhibidores de la síntesis proteica, como los macrólidos o clindamicina, ha quedado demostrado que la exposición de cocos gram positivos a concentraciones inhibitorias de los mismos, determina una mejor fagocitosis y muerte intracelular de estos microorganismos. Este efecto es debido más que a una actividad fagocítica mayor, a una facilitación de la opsonización<sup>(29-31)</sup>.

### **3.2. Efectos directos de los agentes antimicrobianos sobre las funciones de los PMNs.**

El estudio de la influencia directa de los antimicrobianos sobre las células fagocíticas ha constituido otro importante foco de atención para los distintos grupos de investigación. Las fases del proceso sobre las que se han centrado diversos estudios han sido:

- Maduración celular (acción tóxica o aumentada sobre las células progenitoras),
- Viabilidad mediante alteración directa de funciones celulares (quimiotaxis, ingestión, mecanismos bactericidas o destrucción intracelular),
- Penetración intracelular bacteriana,
- Fijación de las células (adherencia)<sup>(19)</sup>.

No cabe duda de que determinados agentes antimicrobianos pueden interferir en la función del fagocito a distintos niveles. Algunos de estos efectos son perjudiciales, otros aumentan las funciones de las células fagocíticas.<sup>(32)</sup>

La capacidad bactericida de las células fagocíticas puede ser medida microbiológicamente mediante recuento en agar de las colonias producidas por las bacterias supervivientes en el interior de los fagocitos.

No debemos descuidar la posible interacción del antimicrobiano con la actividad bactericida intrínseca de la célula fagocítica. Determinados fármacos ejercen una acción moduladora sobre la explosión respiratoria, ofreciendo un efecto dual:

**-negativo:** porque pueden inhibir el mecanismo oxidativo del PMN, inhiben la generación de superóxido y peróxido de hidrógeno, interfiriendo en la capacidad de los fagocitos para la destrucción intracelular.

**-positivo:** porque es posible, que aunque inhiban la explosión respiratoria, los derivados de estos antimicrobianos puedan resultar útiles en controlar la respuesta inflamatoria en determinados estados de enfermedad<sup>(33)</sup>. Tal como ocurre con clindamicina y roxitromicina.

Durante el proceso fagocítico se produce una activación del metabolismo leucocitario, que puede evaluarse midiendo la quimioluminiscencia emitida o la producción de radicales tóxicos de oxígeno. Surgen, por esto, controversias a la hora de analizar los resultados obtenidos por los diferentes investigadores. A pesar de ello,

parece existir conformidad sobre el efecto negativo ejercido por las tetraciclinas, posiblemente mediado por una actividad quelante del calcio intracelular por parte de estos antimicrobianos<sup>(34,35)</sup>. Los betalactámicos, en general, no suelen influenciar el proceso fagocítico, aunque algunas cefalosporinas han mostrado un efecto potenciador de los mecanismos bactericidas de los leucocitos PMN<sup>(36,37)</sup>.

#### 4.- ESTUDIOS DE PENETRACION INTRACELULAR DE ANTIMICROBIANOS.

El estudio de penetración y actividad intracelular de los antimicrobianos resulta de gran interés, por el hecho de que existen microorganismos que son capaces de sobrevivir e incluso multiplicarse en el interior de las células fagocíticas y evitan de este modo la acción de los antibióticos que no penetran bien en el interior de las células, como es el caso de los aminoglicósidos y betalactámicos.

Un agente antimicrobiano ideal, no sólo tendría actividad contra organismos extracelulares sino que penetraría en las células fagocíticas y evitaría la supervivencia de organismos intracelulares.

La capacidad de un antimicrobiano para poder penetrar y permanecer activo en el interior de células fagocíticas es un factor importante a la hora de establecer una terapéutica antimicrobiana en infecciones producidas por bacterias que son capaces de sobrevivir e incluso multiplicarse intracelularmente como: *Salmonella spp*, *Brucella spp*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*, *Rickettsia...*, y de aquellas que siendo patógenos extracelulares conocidos, como *Staphylococcus aureus*, pueden comportarse en ciertas circunstancias como patógenos intracelulares. <sup>(38,39,40)</sup>

En la mayoría de los casos, las directrices marcadas en el diseño de la estructura molecular de un antimicrobiano y los ensayos realizados durante el periodo de experimentación, se han dirigido fundamentalmente hacia la lucha frente a bacterias extracelulares.

Los estudios de actividad in vitro (antibiograma) utilizan exclusivamente bacterias extracelulares, obviando la complejidad que implica la interacción in vitro entre bacterias, antimicrobianos y células fagocíticas del huésped. Los parámetros más interesantes a tener en cuenta son:

- Capacidad de concentrarse el antimicrobiano en la célula fagocítica.
- Condiciones físico-químicas bajo las que tiene lugar la interacción antimicrobiano-bacteria.
- Efecto del antimicrobiano en la actividad bactericida intrínseca de la célula fagocítica.

Para estudiar la penetración y actividad intracelular de un antimicrobiano existen dos tipos de métodos:

**a) Medida directa del antimicrobiano intracelular:**

Determinación de la penetración del antimicrobiano.

**b) Medida indirecta del antimicrobiano intracelular:**

Determinación de la actividad intracelular del antimicrobiano frente a determinados patógenos intracelulares.

Básicamente se han descrito cuatro métodos de medida directa para el estudio de la penetración de antimicrobianos. El método radiométrico, descrito por Klemperer y cols.<sup>(41)</sup>; es sensible y reproducible, pero requiere la utilización de antimicrobianos marcados con radioisótopos. La obtención de éstos puede resultar costosa y difícil y su manipulación requiere disponer de instalaciones adecuadas. El método microbiológico es relativamente poco sensible, laborioso e inadecuado para estudios cinéticos<sup>(42)</sup>. La cromatografía líquida de alta presión también se ha utilizado para medir concentraciones intracelulares de antimicrobianos, pero al ser un método menos sensible que el radiométrico, requiere la utilización de grandes volúmenes celulares y concentraciones extracelulares altas, casi siempre superiores a las terapéuticas<sup>(43)</sup>. Finalmente, el método fluorométrico, descrito por Pascual y cols.<sup>(44)</sup>, cuyo uso queda confinado a aquellos antimicrobianos que posean fluorescencia natural en su núcleo.

La penetración intracelular de antimicrobiano se expresa universalmente como el cociente entre la concentración intracelular y extracelular del mismo ( $C_i/C_e$ ).

En general, y con independencia de la metodología utilizada, hay antibióticos que no se concentran en el interior de las células fagocíticas, ofreciendo valores de  $C_i/C_e$  inferiores a 1, como es el caso de los betalactámicos<sup>(45,46)</sup> y aminoglicósidos<sup>(47-49)</sup>. Lincosamidas, clindamicina fundamentalmente<sup>(50)</sup>, macrólidos<sup>(45)</sup>, quinolonas<sup>(42,44)</sup> y otros (rifampicinas, tetraciclinas, cloranfenicol...)<sup>(51)</sup>, se acumulan en mayor o menor grado en el interior de las células fagocíticas. (Tabla II).

Tabla II. Valores de penetración intracelular de antimicrobianos en PMNs humanos.

ANTIMICROBIANO	Ci/Ce <sup>a</sup>
Betalactámicos	0.01 - 0.2
Aminoglicósidos	0.3 - 0.7
Lincosamidas	3 - 20
Macrólidos	20 - 50
Fluoroquinolonas	4 - 7
Rifampicina	4 - 8
Tetraciclina	4
Cloranfenicol	4 - 10

a) Ci/Ce: Cociente de las concentraciones intracelulares y extracelulares tomado de diversos autores.

## **4.1. Mecanismos básicos de penetración intracelular.**

### **Transporte de moléculas pequeñas a través de la membrana.**

Las bicapas lipídicas que forman la membrana citoplásmica de las células permiten el paso por simple difusión física a moléculas liposolubles, pequeñas y apolares. Sin embargo, estas membranas son altamente impermeables a la mayoría de las moléculas polares. Con el fin de transportar estas moléculas hacia el interior, las membranas plasmáticas poseen muchas proteínas específicas de transporte, cada una de las cuales es responsable de la transferencia de determinados solutos a través de la membrana. Estas proteínas de transporte forman vías proteicas continuas a través de la bicapa<sup>(52)</sup>.

### **Transporte pasivo.**

El transporte pasivo de las moléculas se realiza, sin aporte de energía, a favor de un gradiente electroquímico cuya dirección viene determinada por su gradiente de concentración (diferencia de concentración a ambos lados de la membrana) y por su gradiente eléctrico total a través de la membrana (gradiente de voltaje), siendo el interior de la membrana negativo con respecto al exterior. Si el soluto transportado carece de carga, tan solo su diferencia de concentración determinará la dirección del transporte pasivo.

Algunas de las proteínas que median el transporte pasivo, forman canales acuosos que permiten que los solutos de un tamaño

y carga apropiados atraviesen la bicapa por simple difusión; estas proteínas reciben el nombre de proteínas de canal. Otras, denominadas proteínas transportadoras, se unen a la molécula que debe ser transportada y la transfieren a través de la membrana en un proceso de difusión facilitada.

Aunque se desconocen los detalles moleculares de cómo funcionan las proteínas transportadoras, es muy poco probable que este proceso implique la oscilación y movimiento de las proteínas a través de la bicapa lipídica. Es más probable que se trate de proteínas transmembranas que sufren un cambio reversible de conformación al transferir el soluto.

### **Transporte activo.**

Algunas proteínas de transporte funcionan como bombas que impulsan activamente el movimiento de solutos en contra de sus gradientes electroquímicos, mediante el denominado transporte activo. A diferencia del transporte pasivo, debe estar estrechamente acoplado a una fuente de energía. Esto implica la hidrólisis de ATP o cotransporte de  $\text{Na}^+$  o  $\text{H}^+$  a favor de sus gradientes electroquímicos.

Su funcionamiento es similar al de las proteínas transportadoras en el transporte pasivo, pero lleva acoplado una fuente de energía.

Las proteínas transportadoras, tanto en el transporte activo como en el pasivo, se comportan como enzimas unidos a la membrana. Una proteína transportadora se une y transfiere

específicamente una molécula de soluto a través de la bicapa lipídica. Este proceso se parece a una relación enzima sustrato, y los transportadores implicados se comportan como enzimas especializados ligados a la membrana. Cada tipo de proteína transportadora tiene un centro de unión específico para el soluto (sustrato). Cuando el transportador está saturado, es decir, cuando todos los centros de unión están ocupados, la velocidad del transporte es máxima. Esta velocidad máxima es característica del transportador específico. Cada proteína transportadora tiene además una constante característica de unión para su soluto,  $K_m$ , igual a la concentración de soluto a la cual la velocidad de transporte es la mitad del valor máximo. Pero la analogía enzima sustrato es limitada, ya que el soluto transportado no suele ser modificado por la proteína transportadora.

### **Transporte de macromoléculas a través de la membrana.**

Aunque las proteínas de transporte permiten el paso a través de las membranas celulares de un gran número de pequeñas moléculas polares, no pueden transportar macromoléculas. Los mecanismos que utilizan las células para este proceso suponen la formación y fusión secuencial de vesículas rodeadas de membranas. La sustancia que debe ser ingerida se rodea progresivamente de una pequeña porción de membrana plasmática que, primero se invagina y luego se estrangula formando una vesícula intracelular que contiene el material ingerido. Este proceso recibe el nombre de endocitosis. Según el tamaño de las vesículas formadas, se distinguen dos tipos de endocitosis: la **pinocitosis** o ingestión de líquidos o solutos mediante vesículas pequeñas y la **fagocitosis** que implica la ingestión de grandes partículas, tales como microorganismos o residuos celulares.

## 5. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LOS ANTIMICROBIANOS.

Una elevada concentración intracelular de un antimicrobiano no garantiza una excelente actividad intracelular del mismo. Lo realmente importante a la hora de establecer una terapéutica en infecciones intracelulares es que el antibiótico se concentre y permanezca activo en el lugar donde se localice la bacteria, debe ser capaz de alcanzar a la bacteria, que a menudo se va a localizar en vacuolas especializadas denominadas fagosomas, y ciertos factores intracelulares, como enzimas lisosomiales y el pH ácido intracelular, no deben interferir en su actividad<sup>(50)</sup>. Los factores que intervienen en la actividad de los antimicrobianos frente a bacterias intracelulares se muestran en la figura 2.

Un antimicrobiano puede concentrarse en el interior de la célula fagocítica, y sin embargo, ser inactivo bajo las condiciones físico-químicas en el lugar específico de acción<sup>(33)</sup>. Parece ser que tetraciclinas, eritromicinas y clindamicinas; antibióticos que se concentran en el interior de la célula fagocítica, permanecen activos en el citoplasma, pero probablemente no en el fagolisosoma, lugar donde se encuentran localizadas la mayoría de las bacterias intracelulares, debido al pH ácido del mismo<sup>(53)</sup>. Esto explicaría el hecho de que estos antimicrobianos sean activos frente a bacterias intracelulares que impiden la fusión fagosoma-lisosoma o eviten la acidificación<sup>(54,55)</sup> y no muestren actividad frente a otras, *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, que no presenta estas características<sup>(33)</sup>.

Por tanto, es extraordinariamente importante completar los estudios de penetración intracelular de antimicrobianos con estudios de actividad y destrucción intracelular.

La actividad intracelular de los antibióticos se ha estudiado utilizando diferentes técnicas; todas ellas miden el número de bacterias viables en el interior de las células fagocíticas después de su exposición a la acción del antimicrobiano. La más empleada mide el número de colonias viables mediante la siembra en placas de agar: método microbiológico<sup>(56)</sup>. El método radiométrico las mide por la cantidad de aminoácido, marcado radioactivamente, incorporado a la bacteria después de haber estado en contacto con el antibiótico en el interior de la célula fagocítica<sup>(57)</sup>. También se ha cuantificado el número de bacterias viables mediante tinción con naranja de acridina (método de fluorescencia)<sup>(58)</sup>. El método biofotométrico calcula la viabilidad de las bacterias según el tiempo que tardan en alcanzar una determinada densidad óptica<sup>(59)</sup>, y por último, el método descrito por M.S. Sánchez<sup>(60)</sup> utiliza un cultivo de PMN en monocapa para medir la actividad intracelular de los antibióticos.

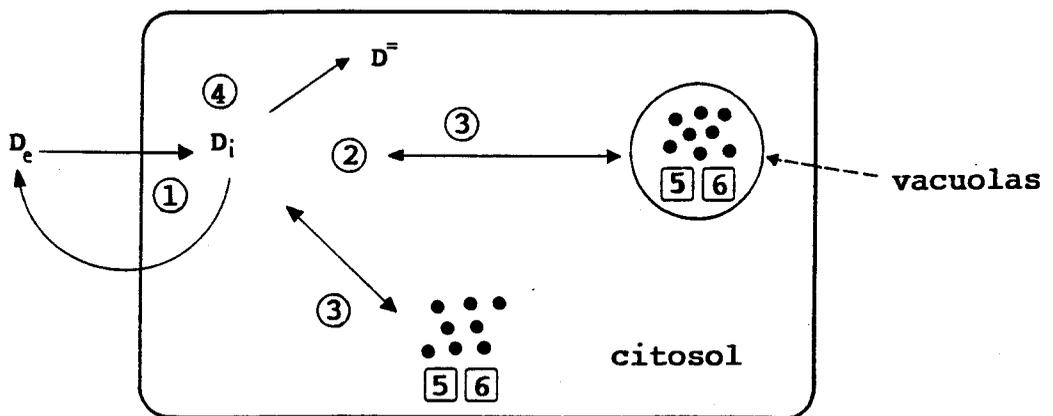
Actualmente existen antimicrobianos con un amplio espectro antibacteriano y muy buenas características farmacológicas que, sin embargo, son poco eficientes frente a bacterias intracelulares ya que, o bien no se concentran en el interior de la célula, tienen una localización inadecuada, o son inactivos intracelularmente<sup>(33,50,61)</sup>.

De manera general se puede decir que los betalactámicos no ofrecen actividad intracelular, al concentrarse escasamente en las células fagocíticas<sup>(33)</sup>. (Tabla III). Sin embargo, los aminoglicósidos,

que inicialmente también alcanzan concentraciones bajas, han mostrado cierta actividad intracelular en diferentes estudios. La actividad intracelular de lincosamidas y macrólidos es controvertida, habiendo sido estudiada exhaustivamente frente a diferentes microorganismos con resultados contradictorios<sup>(45,46)</sup>. Rifampicina<sup>(51)</sup> y las nuevas quinolonas<sup>(42,44)</sup> han mostrado, en todos los estudios realizados, buena actividad intracelular contra diferentes microorganismos, si bien la metodología empleada ha sido muy heterogénea.

El diseño de nuevas moléculas, derivadas en muchos casos de antimicrobianos existentes, que se acumulan en el interior de la célula fagocítica y que sean activas frente a bacterias intracelulares, abre nuevos horizontes en el tratamiento de infecciones producidas por patógenos intracelulares, tal es el caso de las quinolonas.

Figura 2. Esquema de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos implicados en la actividad de un antimicrobiano frente a bacterias intracelulares.



$D_e$  = Antibiótico extracelular  
 $D_i$  = Antibiótico intracelular

$D^=$  = Metabolitos  
 ● = Bacteria

**Parámetros farmacocinéticos**

- ① Penetración y retención
- ② Acumulación
- ③ Disposición subcelular y biodisponibilidad
- ④ Metabolización e inactivación

**Parámetros farmacodinámicos**

- ⑤ Expresión de actividad
- ⑥ Respuesta bacteriana

Tabla III. Correlación entre penetración y actividad intracelular de los principales grupos de antimicrobianos.

ANTIMICROBIANOS	PENETRACION	ACTIVIDAD
Betalactámicos	NINGUNA	0
Aminoglicósidos	BAJA	0/+
Lincosamidas	ALTA	0/+/+++
Macrólidos	ALTA	0/+/+++
Rifampicina	ALTA	+++
Quinolonas	ALTA	++

## 6. QUINOLONAS

Los componentes de este grupo son productos de síntesis, que tienen en común en su estructura un ácido carboxílico con átomos de oxígeno alrededor, que les son necesarios para ejercer su actividad antibacteriana. Inhiben las topoisomerasas o girasas del DNA, por lo que se les denomina también inhibidores de la girasa del DNA.

### 6.1. Clasificación.

Existen actualmente numerosos compuestos con diferentes espectros de acción y potencia. Podemos clasificarlos sobre la base de su estructura química en cuatro grupos<sup>(62)</sup>:

- **Grupo a:** Naftiridinas; ácidos nalidíxico y pirimídico.
- **Grupo b:** Oxacinas; cinoxacina y ácido oxolínico.
- **Grupo c:** 4-Quinolonas con un grupo piperazinil; ácido pipemídico y rosoxacina.
- **Grupo d:** Compuestos fluorados con un grupo piperazinil; amifloxacina, ciprofloxacina, enoxacina, norfloxacina, ofloxacina, pefloxacina, lomefloxacina, fleroxacina y levofloxacina.

Figura 3. Estructura general de las quinolonas.

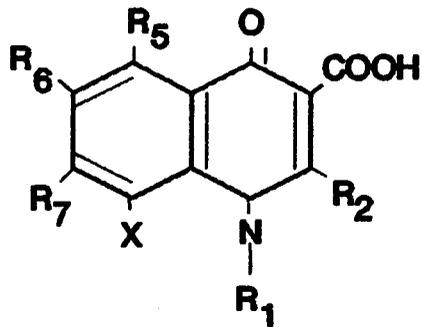
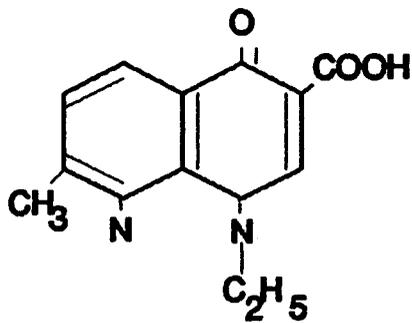


Figura 4. Estructura del ácido nalidíxico.



La molécula básica, el ácido nalidíxico (FIG.4), tenía un espectro de actividad que incluía la mayoría de las enterobacteriáceas, pero las pseudomonas y las bacterias gram-positivas eran resistentes. Esta molécula fue modificada, produciendo quinolonas que a pesar de tener una mayor actividad in vitro que la del ácido nalidíxico contra las bacterias gram-positivas, no ha supuesto un avance significativo en el tratamiento de las infecciones clínicas como resultado de la gran emergencia de resistencia bacteriana<sup>(63)</sup>.

La suma tanto de una "7-piperazina" como de una "6-fluorina" a la molécula, ha dado como resultado un nuevo grupo de quinolonas piperazinil fluoradas; estos agentes antibacterianos se han descrito generalmente como fluorquinolonas. (FIG.5)

El radical piperazinil confiere a la molécula actividad sobre las pseudomonas, y la adición de un átomo de flúor en la posición 6 aumenta su actividad antibacteriana y amplía su espectro de acción, llegando a comprender a las gram-positivas<sup>(64,65)</sup>. Con lo cual, esta nueva generación de quinolonas ha intensificado notablemente las actividades contra las enterobacterias y tiene una amplia actividad antibacteriana que incluye *P.aeruginosa*, así como cocos gram-positivos, especialmente estafilococos, que se mostraban resistentes a la molécula original. La adición de una segunda molécula de flúor les confiere mayor actividad frente a gram-positivas, especialmente *Streptococcus*<sup>(66)</sup>. Estas quinolonas difluoradas son fleroxacina y lomefloxacina.

Los datos disponibles muestran que casi todas las fluorquinolonas probadas hasta ahora se acumulan en células fagocíticas. En

el caso de antibióticos como clindamicina, eritromicina y roxitromicina, la entrada celular es dependiente de viabilidad celular y de una temperatura ambiental fisiológica<sup>(51,63,67,68)</sup>, lo cual demuestra que la captación de estos fármacos es activa y dependiente de energía<sup>(69)</sup>. Además, los inhibidores metabólicos del origen predominante de energía disminuyen la captación de estos antibióticos.<sup>(70)</sup> El análisis cinético de la captación de clindamicina y roxitromicina revela que la entrada de ambas drogas muestran saturaciones cinéticas, característico de un sistema mediado de transporte de membrana<sup>(67,68,71)</sup>.

El sistema de transporte por el cual las fluorquinolonas se acumulan en las células es incierto, y no se puede presentar un modelo simple con los resultados encontrados hasta ahora.

## **6.2. Mecanismo de acción.**

El punto de acción de estos antimicrobianos son las topoisomerasas o girasas del ADN, específicamente la subunidad  $\alpha$  de la topoisomerasa II, y algunas también actúan sobre la topoisomerasa II'. La inhibición de estas enzimas conduce a la muerte bacteriana<sup>(62,65)</sup>.

La subunidad  $\alpha$  de la topoisomerasa tipo II actúa realizando incisiones a intervalos en sitios específicos del ADN de una sola banda y posteriormente los une, corrigiendo estos cortes; los inhibidores de la girasa impedirían la reparación de estas incisiones.

El mecanismo de acción común en todas las quinolonas se debe a la constante afinidad del compuesto particular por la enzima

bacteriana impidiendo la reparación de las incisiones que se producen en el ADN, lo que induce a perder la forma superenrollada, aumentando el volumen y creando una gran necesidad de espacio intracelular<sup>(72)</sup>. Las roturas de ADN mantenidas por la acción de las quinolonas serán el punto de acción de exonucleasas inducibles, que destruirán el ADN.

Es razonable asumir que la actividad antibacteriana de las quinolonas es el resultado de la combinación de la actividad inhibitoria de la girasa de DNA y de la penetración intrabacteriana<sup>(73,74)</sup>.

Los nuevos inhibidores de la girasa, fluorquinolonas, si los comparamos con los más antiguos, son más activos y de mayor capacidad bactericida, por lo que son suficientes dosis más bajas para el tratamiento.

En combinación con la mayoría de los antibióticos, la actividad de las fluorquinolonas es aditiva; el antagonismo puede existir para las fluorquinolonas cuando se combinan con el cloranfenicol.

Mientras la resistencia natural a todos los compuestos de fluorquinolonas parece rara, la resistencia adquirida es cada vez más observada y estudiada. La resistencia adquirida se selecciona por una exposición seriada de la bacteria a concentraciones de droga incrementada. Se desarrolla por uno de los siguientes mecanismos:

- o bien un cambio de un aminoácido en la girasa del DNA que le impida ser reconocida por la fluorquinolona.
- o bien por un descenso en la permeabilidad bacteriana a la fluorquinolona.

Una vez que una cepa adquiere resistencia contra una fluorquinolona específica, esta resistencia se mantiene contra todas las fluorquinolonas existentes. No se ha descrito hasta ahora ninguna resistencia mediada por plásmidos.

### 6.3. Actividad in vitro.

En general, las quinolonas tienen una excelente potencia in vitro contra la mayoría de las *Enterobacteriáceas*, bacilos gram negativos, incluyendo especies de *haemophilus*, y cocos gram negativos tales como *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *Moraxekka catarrhalis*<sup>(64,75)</sup>. Las quinolonas son activas contra *Pseudomonas aeruginosa* pero son menos activas contra otras especies de *pseudomonas*. También tienen una buena actividad contra *Staphylococcus aureus* y otros estafilococos pero son menos activos contra especies de estreptococos y enterococos. Tienen una actividad mínima contra anaerobios y ninguna contra *Candida albicans*. Las quinolonas son activas contra los bacilos gram negativos que son resistentes a múltiples antibióticos, especies de *S. aureus* resistentes a meticilina, especies de *N. gonorrhoeae* resistentes a penicilina, y especies de *Haemophilus influenzae* productoras de betalactamasa. Ciprofloxacina y ofloxacina son activos contra *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii* y *M. xenopi*, pero su actividad contra *M. avium* es pobre. Ciprofloxacina, ofloxacina, temafloxacina y otros, son activas contra *Clamidia trachomatis*, especies de *mycoplasma* y especies de *legionella*. Las quinolonas son también activas in vitro contra especies de *rickettsia*, *Coxiella burnetti* y *Plasmodium falciparum*<sup>(76)</sup>.

Las quinolonas tienen actividad bactericida contra la mayoría de especies de bacterias, con concentraciones bactericidas mínimas típicamente iguales o dos veces mayores que las concentraciones mínimas inhibitorias. Aunque su actividad bactericida puede ser antagonizada por cloranfenicol o rifampicina, la importancia clínica de esta interacción es incierta<sup>(77)</sup>. Las combinaciones de quinolonas con un antibiótico betalactámico o un aminoglicósido producen efectos aditivos y raramente sinérgico o antagónico<sup>(78)</sup>.

No se ha observado resistencia cruzada con las penicilinas, cefalosporinas, aminoglicósidos y tetraciclinas, y los organismos resistentes a estos antibióticos generalmente son sensibles a las fluorquinolonas<sup>(79)</sup>.

#### **6.4. Farmacocinética.**

Todas las fluorquinolonas se absorben bien vía oral, excepto norfloxacin; los alimentos interfieren de forma significativa en su absorción. Pefloxacin y lomefloxacin presentan un 100% de absorción tras la administración oral en todas las dosis, pero la absorción de norfloxacin es sólo de un 30-40%, de ofloxacin se absorbe un 90% y la absorción de ciprofloxacina es de 70-80%. Todas ellas están unidas a las proteínas del suero en el mismo grado (10-30%) y su biodisponibilidad varía entre el 60-95% para las distintas fluorquinolonas.(TABLA IV)

Tras las dosis orales equivalentes, ofloxacin logra las más altas concentraciones en suero (TABLA V). Para el resto de

fluorquinolonas, los niveles sanguíneos tras la administración oral son aproximadamente iguales.

Las fluorquinolonas tienen una vida media en suero relativamente larga (TABLA V) que permite, para la mayoría de los compuestos, una administración de dos dosis al día. Fleroxacina, pefloxacina y lomefloxacina poseen el mayor  $t_{1/2}$ , permitiendo una administración de una vez al día.

Las fluorquinolonas penetran particularmente bien en huesos y cartílagos, en secreciones bronquiales y tejido pulmonar, en la mucosa faríngea, en el tracto intestinal, en la saliva, en la piel y músculos y en el riñón y la próstata. Su penetración en el CSF y en compartimentos oculares se considera marginal y alcanza concentraciones terapéuticas sólo contra cepas muy susceptibles.

## **6.5. Metabolismo y excreción.**

Pefloxacina es la única fluorquinolona que experimenta un metabolismo importante (80%), formándose metabolitos transformados en su mayor parte a norfloxacina. (TABLA IV). El metabolismo de otras fluorquinolonas es bastante limitado (10%); los principales cambios metabólicos tienen lugar en el círculo de piperazina y la mayoría de los metabolitos son menos activos que el compuesto original. Excepto para pefloxacina, cuyo 13% se excreta en la orina y el resto en los tractos biliar y gastrointestinal, todas las fluorquinolonas se excretan en la orina en un grado de un 65-75%, dejando entre un 25-35% para que sea excretado en el tracto alimenticio.

## **6.6. Estabilidad.**

Todos los agentes tienen una duración relativamente larga bajo condiciones ambientales. Las soluciones tienen una vida útil de 2-4 días y tienen que ser protegidas de la luz.

Tabla IV. Características farmacológicas de las fluorquinolonas.

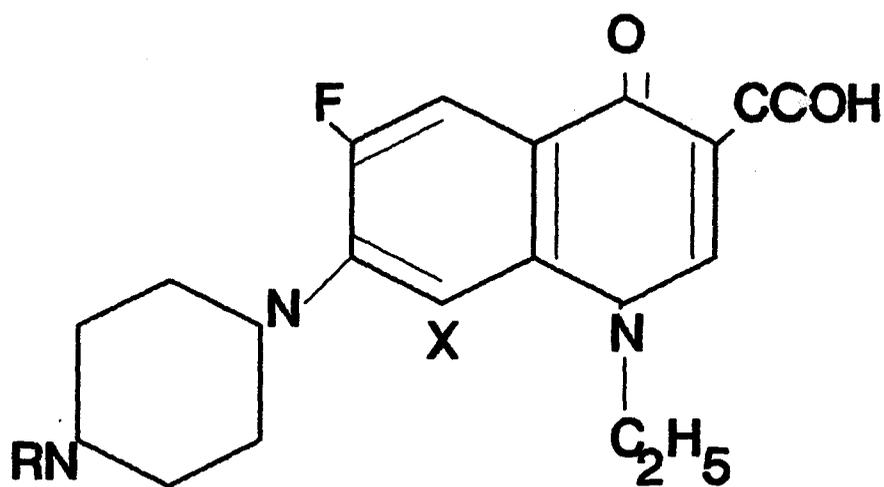
FLUORQUINOLONA	ABSORCION	UNION A PROTEINAS DEL SUERO	METABOLISMO	EXCRECION		
				ORINA	BILIS	HECES
PEFLOXACINA	100%	25%	80%	13%	42%	45%
LOMEFLOXACINA	100%	20%	10 - 20%	65 - 75%	-	25 - 35%
NORFLOXACINA	30 - 40%	15%	10 - 20%	65 - 75%	5%	25 - 35%
OFLOXACINA	90%	27%	10%	65 - 75%	1 - 5%	25 - 35%
CIPROFLOXACINA	70 - 80%	30%	10 - 20%	65 - 75%	5%	25 - 35%

Tabla V. Vida media y concentración en suero de las fluorquinolonas.

FLUORQUINOLONA	VIDA MEDIA SUERO (H)	CONCENTRACION* EN SUERO (mg/L)
- NORFLOXACINA	3 - 4,5	2
- CIPROFLOXACINA	3 - 6	2
- ENOXACINA	5 - 7	2.3
- FLEROXACINA	11 - 13	5
- LOMEFLOXACINA	7,8	3
- OFLOXACINA	5 - 7	6
- PEFLOXACINA	9,5 - 12	3.5
- TEMAFLOXACINA	6,5	3.4

\*Después de una dosis oral de 500 mg.

Figura 5. Estructura general de las quinolonas piperazinil fluoradas.



## **II. HIPOTESIS DE TRABAJO**

La finalidad de este estudio ha sido determinar la capacidad de un grupo de quinolonas; fluorquinolonas, de penetrar en el interior de los leucocitos polimorfonucleares humanos, estudiar los mecanismos involucrados en dicha penetración y su posible actividad intracelular contra determinadas bacterias.

## **1 ESTUDIOS DE PENETRACION INTRACELULAR DE LAS FLUORQUINOLONAS.**

**1.1 Determinación de la penetración de las fluorquinolonas en leucocitos polimorfonucleares humanos.**

**1.2 Caracterización de la penetración de las fluorquinolonas en PMN humanos.**

1.2.1 Estudios de sus cinéticas de penetración celular.

1.2.2 Evaluación del efecto de la concentración extracelular.

1.2.3 Efecto de la viabilidad celular y la temperatura.

1.2.4 Efecto del pH del medio extracelular.

1.2.5 Efecto de los inhibidores metabólicos.

1.2.6 Reversibilidad de la unión de fluorquinolonas a los componentes celulares.

**2 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LAS FLUORQUINOLONAS.**

**2.1 Determinación del efecto de concentraciones terapéuticas de estos fármacos sobre los mecanismos bactericidas dependientes de oxígeno de los PMNs.**

2.1.1 Producción de peróxido de hidrógeno.

2.1.2 Producción de radicales superóxido.

**2.2 Determinación de la actividad intracelular de las fluorquinolonas frente a *Staphylococcus aureus*.**

### **III. MATERIAL**

### III. MATERIAL

1.	CEPA BACTERIANA .....	Pag. 49
2.	LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS (PMN) .....	Pag. 49
3.	MEDIOS DE CULTIVO .....	Pag. 49
4.	SOLUCIONES TAMPON .....	Pag. 50
5.	REACTIVOS. COMPUESTOS QUIMICOS Y BIOLOGICOS .....	Pag. 51
6.	INHIBIDORES METABOLICOS .....	Pag. 52
7.	REACTIVOS PARA AISLAMIENTO DE PMN ..	Pag. 53
8.	REACTIVOS PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS BACTERICIDAS DEPENDIENTES DE OXIGENO EN LOS PMN .....	Pag. 53
9.	COLORANTES .....	Pag. 55
10.	ANTIMICROBIANOS .....	Pag. 55

## 1. CEPA BACTERIANA.

Se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para su posterior empleo se conservaron congeladas en alícuotas repartidas en leche descremada al 10% en agua destilada, a -20°C. En su posterior recuperación se empleó medio Agar Mueller Hinton.

## 2. LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS (PMN).

En todos los experimentos se utilizaron leucocitos polimorfonucleares humanos procedentes de sangre venosa periférica de donantes adultos sanos.

## 3. MEDIOS DE CULTIVO.

### AGAR MUELLER HINTON (DIFCO)

Infusión de carne . . . . .	300 g
Hidrolizado de caseína . . . . .	17.5 g
Almidón . . . . .	1.5 g
Agar . . . . .	17 g
Agua destilada . . . . .	1000 cc

**MEM (SIGMA)**

Medio esencial mínimo utilizado para cultivo de leucocitos polimorfonucleares humanos. Para su empleo se suplementó con suero bovino fetal al 1% (Sigma Chemical Company. St. Louis.USA.).

**4. SOLUCIONES TAMPON.****TAMPON FOSFATO SALINO (PBS) pH 7.2**

$\text{KH}_2\text{PO}_2$ . . . . .	144 mg
NaCl . . . . .	8.5 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . . . . .	795 mg
Agua destilada . . . . .	1000 cc

**SOLUCION SALINA EQUILIBRADA DE HANKS.**

Modificada, sin rojo fenol ni  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7.4. (Sigma Chemical Company. St. Louis. USA).

$\text{CaCl}_2$ . . . . .	140 mg
KCl . . . . .	400 mg
$\text{KH}_2\text{PO}_2$ . . . . .	60 mg
NaCl . . . . .	6.8 g
$\text{Na}_2\text{HPO}$ . . . . .	48 mg
$\text{MgSO}_4$ . . . . .	97.7 mg
Glucosa . . . . .	1 g
Agua destilada . . . . .	1000 cc

Para su utilización con PMN y para evitar la agregación espontánea y adherencia de las células a las paredes de los viales, se adicionó con gelatina a concentración final de 0,1% (GHBSS).

#### TAMPON GLICINA 0.1 M pH 3

H <sub>2</sub> N CH <sub>2</sub> COOH	7.507 g
Agua destilada	1000 cc

## 5. REACTIVOS. COMPUESTOS QUIMICOS Y BIOLÓGICOS.

### MATERIAL RADIATIVO Y LIQUIDO DE CENTELLEO.

- Agua tritiada (Amershan Internacional, UK).
- (<sup>14</sup>C)Polietilen glicol 4000; solución acuosa con etanol al 3%. 10-20 mCi/g. (Amershan Internacional, UK).
- Cóctel de centelleo líquido Beckman Read y Micro (Beckman Instruments, Inc. USA); líquido de centelleo especial para soluciones acuosas con solvente orgánico incorporado.

**FUENTE OPSONICA.**

Mezcla de sueros humanos (HPS), obtenidos de 10 donantes sanos, que fueron debidamente mezclados y distribuidos en alícuotas de 1 ml y almacenados a -70°C.

**6. INHIBIDORES METABOLICOS.**

**CIANURO SODICO (CNa).**

(Sigma Chemical Company. St. Louis, Mo.). Solución madre 9.2 mg/5 ml. La solución de trabajo tenía una concentración final en las células de 1.5 mM.

**FLUORURO SODICO (FNa).**

(Sigma Chemical Company. St. Louis, Mo.). Solución madre 7.9 mg/5ml. La solución de trabajo tenía una concentración final en las células de 1.5 mM.

**2,4 DINITROFENOL.**

(Sigma Chemical Company. St. Louis, Mo.). Solución madre 4,6 mg/5ml. Concentración final en las células 0,1 mM.

**CARBONIL CIANURO CLOROFENOL HIDRAZONA.**

(Sigma Chemical Company. St. Louis, Mo.). Solución madre 2,55 mg/10ml. Concentración final en las células 0,05 mM.

## **7. REACTIVOS PARA AISLAMIENTO DE PMN.**

- Dextrano. Para la sedimentación de eritrocitos se utilizó solución de dextrano T-70 (Sigma Chemical Company. St. Louis. USA) al 6% en solución salina.
- Ficoll-Paque. Medio de separación de linfocitos (Pharmacia LKB Biotechnology. AB, Uppsala. Sweden).
- Cloruro amónico. Para la lisis de eritrocitos se utilizó solución al 0,85% de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Merck) en agua destilada.

## **8. REACTIVOS PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS BACTERICIDAS DEPENDIENTES DE OXIGENO EN LOS PMN.**

- Superóxido dismutasa (3000 U/mg) (Sigma Chemical Company. St. Louis. USA).
- Acetato de forbol miristato (PMA) (Sigma Chemical Company. St. Louis. USA). Se prepararon dos soluciones madre que se distribuyeron en alícuotas de 1 ml y se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso:

- . Solución madre 1 : solución de PMA en dimetilsulfóxido (DMSO) (Panreac. Montplet y Esteban SA. Barcelona-Madrid) a una concentración de 1 mg/ml.
  
- . Solución madre 2 : resultado de diluir 1 volumen de la solución madre 1 en 4 de DMSO (concentración final 0,2 mg/ml).

La solución de PMA de trabajo tenía una concentración de 2000 nM (30,8 l de solución madre nº 2 en 5 ml de GHBSS).

- Citocromo C (Sigma Chemical Company. St. Louis. USA).
  
- Peroxidasa de rábano picante (200 U/mg) (Sigma Chemical Company. St. Louis. USA).
  
- Peróxido de hidrógeno 30% (8,8235 N) (Foret, SA. Barcelona).
  
- Hidróxido sódico, NaOH 3M en agua destilada.

## 9. COLORANTES.

- Solución de azul tripan al 0,5% (Flow Laboratories, Ayrshire. Scotland).
- Solución de Türk: ácido acético y violeta de genciana en solución para recuento de leucocitos (Merck, Darmstadt, Germany).
- Colorante de Wright. (Fluka Química. Madrid). Solución azul de metil eosina.

## 10. ANTIMICROBIANOS.

En todos los casos se utilizó polvo valorado, que fue pesado en una balanza de precisión de acuerdo a su actividad específica.

Se emplearon solventes específicos para disolver el polvo seco y así obtener soluciones madre que fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  en alícuotas. Posteriormente se utilizaron diluyentes apropiados para preparar las soluciones de trabajo.

## **IV. METODOS**

## **IV. METODOS**

### **I. METODOS PARA EL ESTUDIO DE PENETRACION INTRACELULAR DE FLUORQUINOLONAS EN PMN**

1. AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS (PMN) . Pag. 59
2. DETERMINACION DE LA PENETRACIÓN DE QUINOLONAS EN PMN. . . . . Pag. 61
3. CARACTERIZACION DE LA PENETRACIÓN INTRACELULAR DEL ANTIMICROBIANO. . . . . Pag. 63
  - 3.1. Efecto de la temperatura y viabilidad celular. . . . . Pag. 63
  - 3.2. Efecto del pH . . . . . Pag. 63
  - 3.3. Efecto de los inhibidores metabólicos . Pag. 63
  - 3.4. Elusión del antimicrobiano intracelular . Pag. 64

### **II. METODOS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LAS FLUORQUINOLONAS**

1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB). . . . . Pag. 65

2.	OPSONIZACION DE BACTERIAS . . . . .	Pag. 67
3.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LOS ANTIMICROBIANOS	Pag. 68
4.	EFFECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS EN LOS MECANISMOS BACTERICIDAS DEPENDIENTES DE OXÍGENO EN LOS PMN.	Pag. 70
4.1.	Producción de radicales superóxido . .	Pag. 70
4.2.	Producción de peróxido de hidrógeno .	Pag. 71

### **III. METODO PARA EL ANALISIS ESTADISTICO**

1.	ANALISIS ESTADISTICO. . . . .	Pag. 73
----	-------------------------------	---------

# **I. METODOS PARA EL ESTUDIO DE PENETRACION INTRACELULAR DE FLUORQUINOLONAS EN LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS (PMN)**

## **1. AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.**

Para el aislamiento de los leucocitos polimorfonucleares se utilizó el método de Böyum modificado<sup>(80)</sup>.

Se mezclaron suavemente 10 ml de sangre fresca venosa heparinizada de adulto sano con 3 ml de solución de dextrano al 6% en suero fisiológico. Se dejó la mezcla durante 40 minutos a temperatura ambiente para permitir la sedimentación de los eritrocitos. Posteriormente, el plasma rico en leucocitos se depositó suavemente en tubos que contenían 3 ml de Ficoll-Paque (volumen de plasma por tubo de 8 ml), evitando que se mezclasen ambas capas, y se centrifugaron durante 35 minutos a 1200 rpm a 18°C. Se obtenía así una capa en la interfase plasma-Ficoll formada por las células mononucleares y un sedimento en el fondo de cada tubo constituido por los polimorfonucleares y eritrocitos residuales, separados por gradiente de densidad. Se descartó el sobrenadante con pipeta Pasteur, comenzando por la capa de mononucleares y continuando con las de Ficoll y plasma sucesivamente.

Para lisar los eritrocitos residuales se mezclaron los botones de PMN-hematíes con 10 ml de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 0,85% en agua destilada en un agitador (50 rpm) durante 10 minutos, centrifugándolos posteriormente durante 10 minutos a 800 rpm a 4°C. Se descartó el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se resuspendieron los botones celulares en GHBSS. Finalmente se lavaron dos veces más y se resuspendieron en GHBSS.

El recuento se realizó por método hemocitométrico, utilizando una cámara de Bürker-Türk (Schreck-Hofheim. Germany). La suspensión final se ajustó a  $5 \times 10^6$  PMN/ml o  $2,5 \times 10^6$  PMN/ml, según el experimento que se fuese a realizar.

Después de cada aislamiento se comprobó la viabilidad celular mediante tinción con azul tripán, en la cual los núcleos teñidos de azul revelaban el número de células muertas. Las células vivas no teñían sus núcleos, siendo éstas superiores al 95% en todos los casos.

Las células se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su utilización. Durante todo el procesamiento de las células se utilizó material plástico.

## 2. DETERMINACIÓN DE LA PENETRACIÓN DE QUINOLONAS EN LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS.

La penetración de las fluorquinolonas dentro de los fagocitos se evaluó mediante un ensayo fluorométrico descrito por Pascual y colaboradores<sup>(44)</sup> basado en la fluorescencia natural del núcleo de las quinolonas. Se incubaron  $2.5 \times 10^6$  PMN en 0.5 ml de una solución salina balanceada de Hanks conteniendo el antimicrobiano. Tras distintos tiempos de incubación a 37°C, se separaron los PMNs de la solución extracelular por centrifugación a través de una barrera de aceite de silicona impermeable al agua en un tubo de microcentrifuga. La porción del tubo conteniendo las células enteras se colocó en 2 ml de buffer glicina-HCl 0.1 M (pH 3.0) y se agitó vigorosamente en un agitador vortex. Una incubación durante 2 horas a la temperatura ambiente fue suficiente para liberar completamente el agente antimicrobiano intracelular. Las muestras se centrifugaron durante 5 min. a  $5.600 \times g$ , y la cantidad del antimicrobiano se determinó mediante la emisión de fluorescencia de los sobrenadantes con un espectrofotómetro de fluorescencia. La fluorescencia de excitación y emisión máximas se muestran en la tabla VI. Se realizaron controles sin antimicrobiano para determinar la fluorescencia de fondo.

El volumen intracelular se mide mediante el empleo de agua tritiada y el marcador extracelular polietilen-glicol. Los polimorfos se incubaron durante 2 min. a 37°C con estos compuestos y las células se separaron del fluido extracelular mediante gradiente de velocidad de

centrifugación como se describió anteriormente. Mediante un contador de centelleo líquido se determinó el agua atrapada extracelularmente y el contenido total de agua de los PMNs, y de estos dos, el volumen intracelular.

De los valores obtenidos mediante este procedimiento, se calcularon las concentraciones de quinolonas asociadas al PMN y se expresaron con una proporción de la concentración celular a la extracelular ( $C_i/C_e$ ).<sup>(41)</sup>

### **3. CARACTERIZACIÓN DE LA PENETRACIÓN DEL ANTIMICROBIANO.**

#### **3.1. Efecto de temperatura y viabilidad celular.**

El efecto de la viabilidad celular se estudió usando PMNs muertos tras su exposición a formalin al 10% durante 30 min. Estas células fueron entonces lavadas y resuspendidas en medio fresco. La influencia de la temperatura se examinó comparando la penetración de antimicrobiano a 4 y 37°C.

#### **3.2. Efecto del pH.**

Se midió el perfil de pH de la penetración de quinolonas en un medio preajustado a valores de pH externos diferentes (5, 7.2 y 9) mediante la adición de HCl 10 N o NaOH 10 N.

#### **3.3 Efecto de los inhibidores metabólicos.**

Para comprobar el efecto de los inhibidores metabólicos usamos fluoruro sódico, cianuro de sodio, 2,4, dinitrofenol y carbonil cianuro clorofenol hidrazona a una concentración 1,5 mM, 1,5 mM, 0,1 mM y 0,05mM respectivamente. Los PMNs se incubaron en una solución salina equilibrada de Hanks durante 30 min. a 37°C con y sin inhibidores metabólicos. Finalmente, añadimos las fluorquinolonas a una concentración final de 2 µg/ml y medimos la penetración intracelular como describimos anteriormente.

### **3.4. Eflujo del antimicrobiano intracelular.**

Se estudió también la elusión o reversibilidad de la unión de estas fluorquinolonas asociadas a PMNs.

En primer lugar, los PMN se incubaron en agitación durante 20 minutos a 37°C con los antimicrobianos. En segundo lugar, para recuperar los PMN con el antimicrobiano intracelular, las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 1200 r.p.m. y recogidos los PMN. En último lugar, para determinar la elusión del antimicrobiano intracelular, los PMN fueron rápidamente suspendidos en un medio libre de antimicrobiano.

Para evaluar la cantidad de fluorquinolona que permanecía aún en el interior de las células fagocíticas, medimos los valores de concentración intracelular de los antimicrobianos tras distintos tiempos de permanencia en medio libre de antimicrobiano (1, 5 y 20 minutos), según el método descrito anteriormente.

## **II. METODOS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LAS FLUORQUINOLONAS.**

### **1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)**

Para tales determinaciones frente a la cepa de *S.aureus* ATCC 25923, se utilizó el método de macrodilución en caldo<sup>(81)</sup>.

Se prepararon tubos con 1 ml de caldo Mueller Hinton suplementado con  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  conteniendo concentraciones en base 2 de los distintos antimicrobianos.

El inóculo bacteriano se preparó siguiendo el método estándar ( $10^5$  a  $10^6$  ufc/ml)<sup>(82)</sup> y posteriormente se diluyó en caldo Mueller Hinton.

Los tubos con antimicrobiano se siembran con un inóculo que contenga  $5 \times 10^5$  ufc/ml; se agitan para obtener una mezcla homogénea y se incuban a  $35^\circ\text{C}$  durante 18 horas.

Como control del adecuado crecimiento de la cepa se incluyeron tubos de caldo sin antimicrobiano. Igualmente se incluyeron controles

de esterilidad del medio líquido y de los antimicrobianos. Además, una porción de la suspensión bacteriana se pipeteó en una placa Agar Mueller Hinton, extendiéndose en forma de aislamiento para observar la pureza del inóculo.

Se define la CMI como la menor concentración del antimicrobiano que determina una inhibición completa del crecimiento visible en el medio de cultivo tras 18 horas de incubación a 35°C. Haciendo un subcultivo en medio sólido de los tubos sin crecimiento visible y del primero con crecimiento visible, puede establecerse la CMB, definida como la menor concentración de antimicrobiano capaz de matar el 99'9% de las bacterias viables del inóculo.

## **2. OPSONIZACIÓN DE BACTERIAS.**

Para la opsonización se depositaron en viales de polipropileno (Biovials Beckman, Chicago, Il. USA) 0,1 ml de cada suspensión bacteriana ( $2,5 \times 10^8$  ufc/ml) y 0,4 ml de una solución de mezcla de sueros humanos (HPS) al 5% en GHBSS. Los biovials se incubaron en baño de agitación a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo de opsonización se detuvo el proceso mediante la adición de 2 ml de PBS a 4°C, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 0,5 ml de GHBSS, obteniéndose una concentración final de  $5 \times 10^7$  ufc/ml opsonizadas.

### **3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LOS ANTIMICROBIANOS.**

Para evaluar la actividad intracelular de los antimicrobianos, se utilizó el método descrito previamente por Pascual y colaboradores.<sup>(83)</sup>

En una serie de viales de polipropileno se dispensaron 0,1 ml de una suspensión de bacterias opsonizadas con HPS al 5% en GBSS ( $5 \times 10^7$  ufc/ml) y 0,1 ml de PMN ( $5 \times 10^6$  células/ml). Se incubaron en agitación (250 rpm) durante 60 minutos a 37°C.

Transcurrido este tiempo, las bacterias extracelulares fueron eliminadas por centrifugación diferencial (3 ciclos de 10 minutos a 800 rpm), y las células fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de MEM suplementado con suero bovino fetal al 1%.

En este instante, tiempo cero, se adicionaron los antimicrobianos a las concentraciones adecuadas (2, 5, y 10 mg/l) o GBSS a los viales sin quinolonas (controles de tiempo 0 min. y 180 min) y los viales fueron incubados en agitación (250 rpm) a 37°C. En el tiempo cero también se retiró un vial (control tiempo cero). A los 180 minutos de incubación se retiraron viales control y con las distintas concentraciones de antimicrobiano.

Una vez retirados los viales, se lavaron las mezclas celulares con PBS y se les añadió 3 ml de agua destilada estéril. Los agitamos en el vortex durante 20 segundos a una velocidad máxima y tras 15

minutos a temperatura ambiente las células, lisadas debido al choque osmolar, liberan las bacterias fagocitadas. Se diluyeron las diferentes muestras y se inocularon en placas de Agar Mueller Hinton que se incubaron durante 48 horas a 37°C, para permitir el crecimiento del microorganismo.

Los valores se expresaron como porcentaje de supervivencia, tomando como referencia el control del tiempo cero.

Además, con objeto de evaluar la disposición bacteriana, asociada a las células o intracelular, en cada periodo (0, 180 minutos) se efectuó un control microbiológico. Para ello se depositó una muestra de 50  $\mu$ l en un portaobjetos y se realizó una tinción de Wright. Es ésta una tinción policrómica que tiñe de azul las estructuras básicas y de rojo las ácidas. Observados al microscopio óptico aparecen los neutrófilos con gránulos teñidos de violeta y su citoplasma ligeramente rosado.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado utilizando PMN de, al menos, 3 donantes distintos.

#### **4. EFECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS EN LOS MECANISMOS BACTERICIDAS DEPENDIENTES DEL OXÍGENO DE LOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS.**

Al objeto de conocer si los antimicrobianos estudiados tenían alguna influencia en los mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno de los PMN, se midió la producción de radicales superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por dichas células tras exponerlas a distintas concentraciones de los antimicrobianos (2, 5 y 10 mg/l), incluyendo en cada experimento controles conteniendo células no expuestas a antimicrobiano.

El aislamiento de los PMN se realizó siguiendo la técnica descrita en el apartado anterior.

##### **4.1 Producción de radicales superóxido ( $O_2^-$ ).**

La producción de radicales  $O_2^-$  se determinó utilizando una modificación del microensayo de reducción del ferricitocromo C descrito por Pick y Mizel<sup>(84)</sup>.

En el proceso de reducción del ferricitocromo C, el  $O_2^-$  sirve como dador de electrones. La cantidad de citocromo C reducido, proporcional a la cantidad de  $O_2^-$  lanzada al medio por los PMN estimulados, fue determinada midiendo el incremento de su absorbancia a 550 nm. La prueba de que la reducción del citocromo

C era debida a la cesión de electrones por parte del  $O_2^-$  venía dada por el hecho de que dicha reducción era eliminada cuando se incluía en la mezcla de la reacción superóxido dismutasa (SOD).

Inicialmente se dispensaron alícuotas con  $2,5 \times 10^6$  PMN en  $130 \mu\text{l}$  de GHBSS con o sin antimicrobiano en los pocillos de placas de microdilución de 96 pocillos y fondo plano (Flow Laboratories. USA). La mitad de las suspensiones celulares contenían 60 unidades de SOD. Las placas fueron incubadas durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. A continuación se añadió a la mitad de los pocillos  $70 \mu\text{l}$  de una suspensión que contenía el estímulo, acetato de forbol miristato (PMA) a una concentración final de 200 nM, y 60 unidades de citocromo C. Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura de la absorbancia a 550 nm en un fotómetro Multiskan MC (Flow Laboratories, USA). La cantidad de  $O_2^-$  producida se expresó en nmoles de  $O_2^-/\text{mg}$  de proteína.

El contenido proteico de los PMN se determinó por el método de Lowry y colaboradores<sup>(85)</sup>. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con PMN de 5 donantes distintos.

## **4.2 Producción de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).**

Para medir la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por los PMN se utilizó una modificación de la técnica del rojo fenol. Esta técnica se basa en la conversión del rojo fenol por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dependiente de la peroxidasa de

rábano picante (HRPO), en un compuesto con mayor absorbancia a 600-610 nm. El ensayo es leído después de llevar el pH de la mezcla a 12,5, al objeto de eliminar cambios en la absorbancia del rojo fenol debidos a su carácter de indicador de pH.

El ensayo se realizó en placas de microdilución como las descritas en el caso de la producción de  $O_2^-$ . La concentración de células empleadas fue de  $5 \times 10^6$  PMN/ml. Inicialmente se dispensaron alícuotas con  $5 \times 10^6$  PMN/ml en GHBSS con o sin antimicrobiano y se incubaron durante 30 minutos a  $37^\circ C$  en atmósfera de  $CO_2$  al 5%. A continuación se añadió el estímulo y el rojo fenol. Como estímulo se usó PMA (200 nM). Se utilizó una solución de rojo fenol (PRS) constituida por peroxidasa de rábano picante a una concentración 100 U/ml y rojo fenol, sal sódica, 0,72 mg/ml, en una proporción 2/7. Las placas se incubaron a  $37^\circ C$  durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se paró la reacción con NaOH 3M y se procedió a la lectura de la absorbancia a 610 nm en un fotómetro Multiskan MC (Flow Laboratories, USA).

Para poder expresar los resultados en términos de nmoles de  $H_2O_2$ /mg proteína celular, se realizó en cada experimento una curva estándar, usando diluciones de una solución de  $H_2O_2$  de molaridad conocida, mezcladas con PRS, alcanzando concentraciones finales de  $H_2O_2$  por pocillo de 1 a  $50 \mu M$ . Después de 10 minutos de incubación a  $37^\circ C$  se les añadió NaOH 3M, leyendo la absorbancia a 610 nm.

Cada experimento se realizó por triplicado con PMN de donantes distintos.

### **III. METODO PARA EL ANALISIS ESTADISTICO.**

#### **1. ANALISIS ESTADISTICO.**

Todos los datos se expresaron como media aritmética  $\pm$  desviación estándar. El test estadístico utilizado fue el de la t de Student, considerando valores de  $P \leq 0,05$  como estadísticamente significativos.

## **V. RESULTADOS**

## **V. RESULTADOS.**

### **1. PENETRACION INTRACELULAR DE LAS FLUORQUINOLONAS.**

1.1	DETERMINACION DE LA PENETRACIÓN INTRACELULAR DE LAS FLUORQUINOLONAS EN PMN HUMANOS. . . . .	Pag. 77
1.2	CARACTERIZACIÓN DE LA PENETRACIÓN DE LAS FLUORQUINOLONAS EN PMN HUMANOS. . . . .	Pag. 84
1.2.1	Cinéticas de penetración intracelular . .	Pag. 84
1.2.2	Efecto de la concentración extracelular	Pag. 92
1.2.3	Efecto de la temperatura y viabilidad celular . . . . .	Pag. 99
1.2.4	Efecto del pH del medio extracelular . .	Pag. 106
1.2.5	Efecto de los inhibidores metabólicos .	Pag. 109
1.2.6	Reversibilidad de la unión de fluorquinolonas a los componentes celulares . . . . .	Pag. 112

## **2. ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LAS FLUORQUINOLONAS.**

- 2.1 EFECTO DE CONCENTRACIONES TERAPÉUTICAS DE FLUORQUINOLONAS SOBRE LOS MECANISMOS BACTERICIDAS DEPENDIENTES DE OXÍGENO EN LOS PMN HUMANOS. . . . . Pag. 118**
- 2.1.1 Producción de peróxido de hidrógeno . Pag. 118
- 2.1.2 Producción de radicales superóxido . . Pag. 121
- 2.2 ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LAS FLUORQUINOLINAS. . . . . Pag. 123**

# 1. PENETRACION INTRACELULAR DE FLUORQUIONOLONAS.

## 1.1 DETERMINACION DE LA PENETRACION DE FLUORQUINOLONAS EN PMN HUMANOS.

Para determinar la penetración de norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, fleroxacin y lomefloxacin en los PMN humanos, medimos la relación  $C_i/C_e$  en dichas células, incubadas con fluorquinolonas a diferentes concentraciones extracelulares. El tiempo de incubación fue de 20 minutos, la temperatura de 37°C y las concentraciones extracelulares empleadas fueron 2, 5 y 10 mg/l.

La fluorescencia de excitación y emisión máximas se muestran en la tabla VI.

**Norfloxacin.** Con concentraciones extracelulares de 2 y 5 mg/l, los valores  $C_i/C_e$  de norfloxacin fueron  $5'77 \pm 1'47$  y  $5'47 \pm 1'6$  respectivamente, valores superiores a los obtenidos cuando se empleaban concentraciones extracelulares de 10 mg/l ( $3'74 \pm 0'44$ ). Figura 11.

**Ofloxacin.** Con concentraciones extracelulares de 2 mg/l, el valor  $C_i/C_e$  de ofloxacin fue  $6'28 \pm 0'51$ , valor ligeramente superior a los obtenidos con concentraciones extracelulares de 5 y 10 mg/l ( $4'17 \pm 1'39$  y  $4'54 \pm 0'9$  respectivamente). Figura 12.

**Levofloxacin.** Para concentraciones extracelulares de 2 y 5 mg/l de levofloxacin, obtuvimos valores muy similares de  $C_i/C_e$  ( $3'39 \pm 0'19$  y  $3'34 \pm 0'56$  respectivamente). Cuando empleábamos concentraciones extracelulares de 10 mg/l, el valor obtenido era  $4'41 \pm 1'51$ . Figura 13.

**Fleroxacin.** Con concentraciones extracelulares de 2mg/l el valor  $C_i/C_e$  de norfloxacin fue  $4'67 \pm 0'89$ , valor ligeramente inferior a los obtenidos cuando se usaban concentraciones extracelulares de 5 y 10 mg/l ( $5'43 \pm 2'34$  y  $5'35 \pm 1'37$  respectivamente). Figura 14.

**Lomefloxacin.** Con las distintas concentraciones extracelulares empleadas obtuvimos valores de  $C_i/C_e$  muy próximos entre sí, que oscilaban entre  $5'91 \pm 1'52$  y  $6'65 \pm 1'28$ . Figura 15.

Tabla VI. Longitudes de onda de excitación y emisión máxima para norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, fleroxacin y lomefloxacin, determinadas en glicina-HCl, 0'1 M (pH 3'0).

Antimicrobiano	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Norfloxacin	281	440
Ofloxacin	294	498
Levofloxacin	294	499
Fleroxacin	286	445
Lomefloxacin	287	452

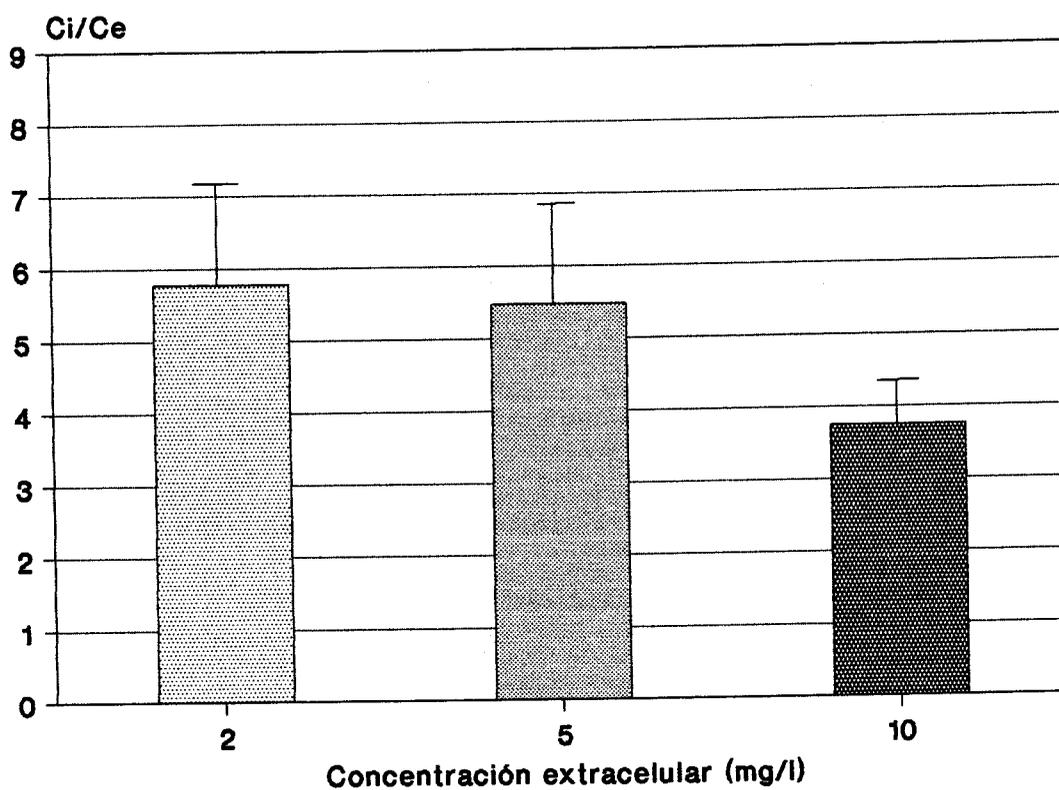


Figura 11. Penetración intracelular de norfloxacin en PMN humanos a diferentes concentraciones extracelulares. (n=4). El tiempo de incubación fue de 20 min., la temperatura de 37°C y las concentraciones extracelulares empleadas fueron 2, 5 y 10 mg/l.

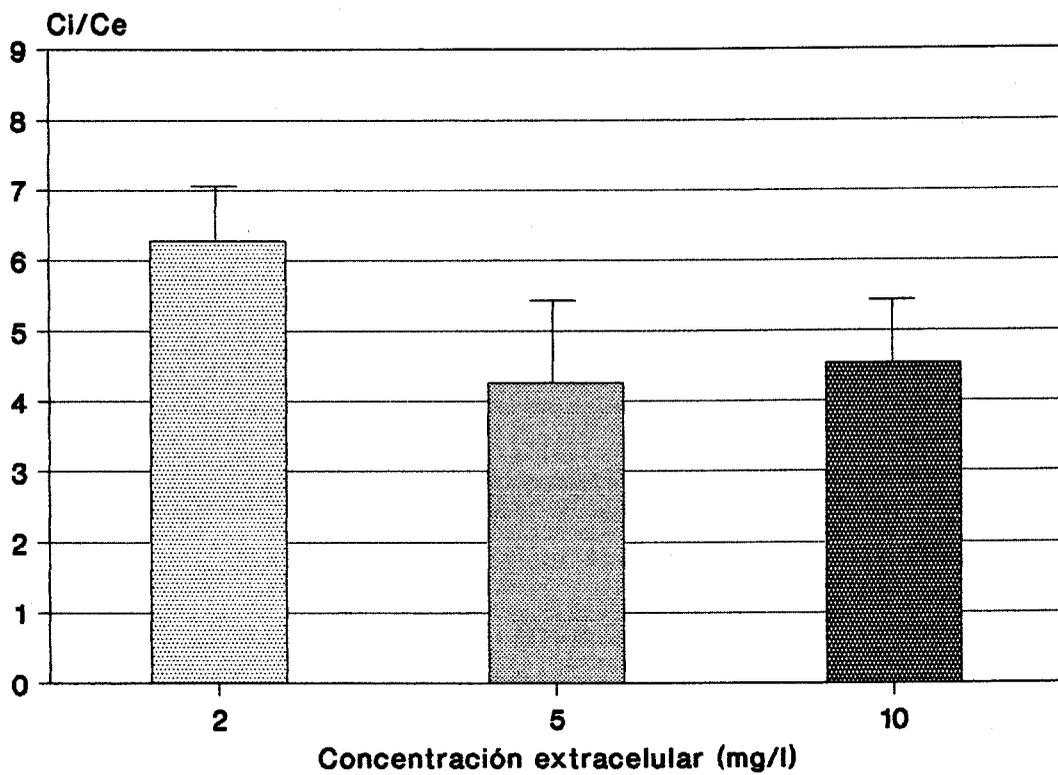


Figura 12. Penetración intracelular de ofloxacin en PMN humanos a diferentes concentraciones extracelulares. (n=4). El tiempo de incubación fue de 20 min., la temperatura de 37°C y las concentraciones extracelulares empleadas fueron 2, 5 y 10 mg/l.

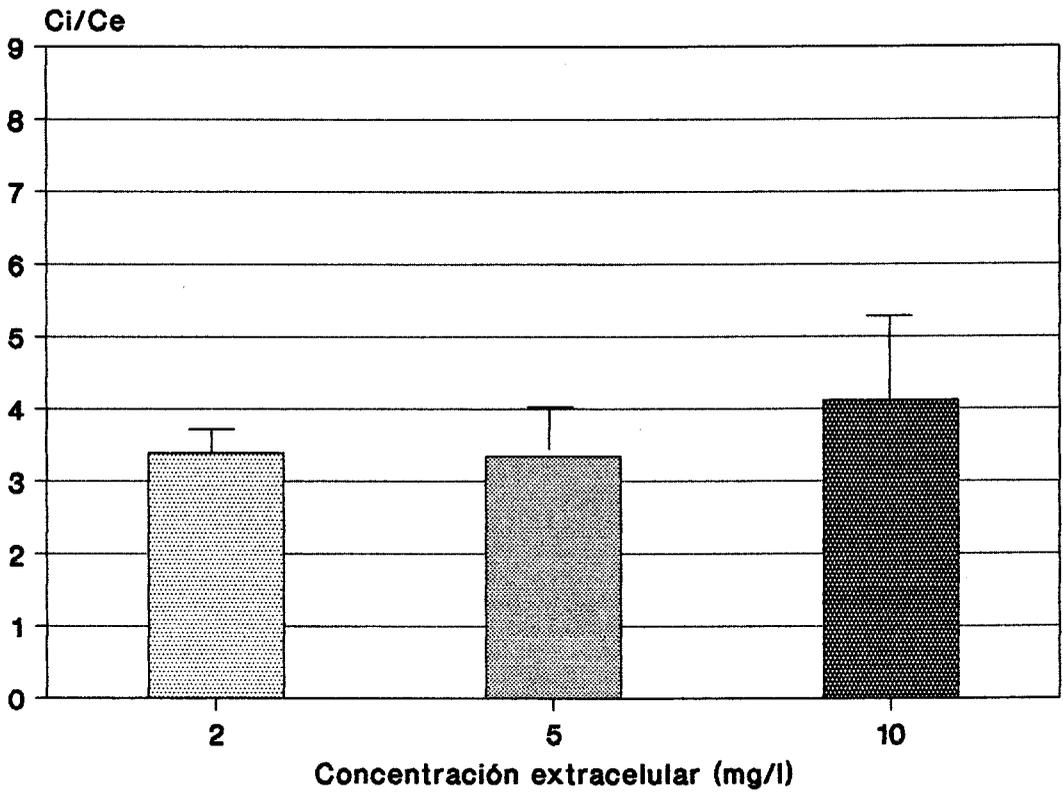


Figura 13. Penetración intracelular de levofloxacin en PMN humanos a diferentes concentraciones extracelulares. (n=4). El tiempo de incubación fue de 20 min., la temperatura de 37°C y las concentraciones extracelulares empleadas fueron 2, 5 y 10 mg/l.

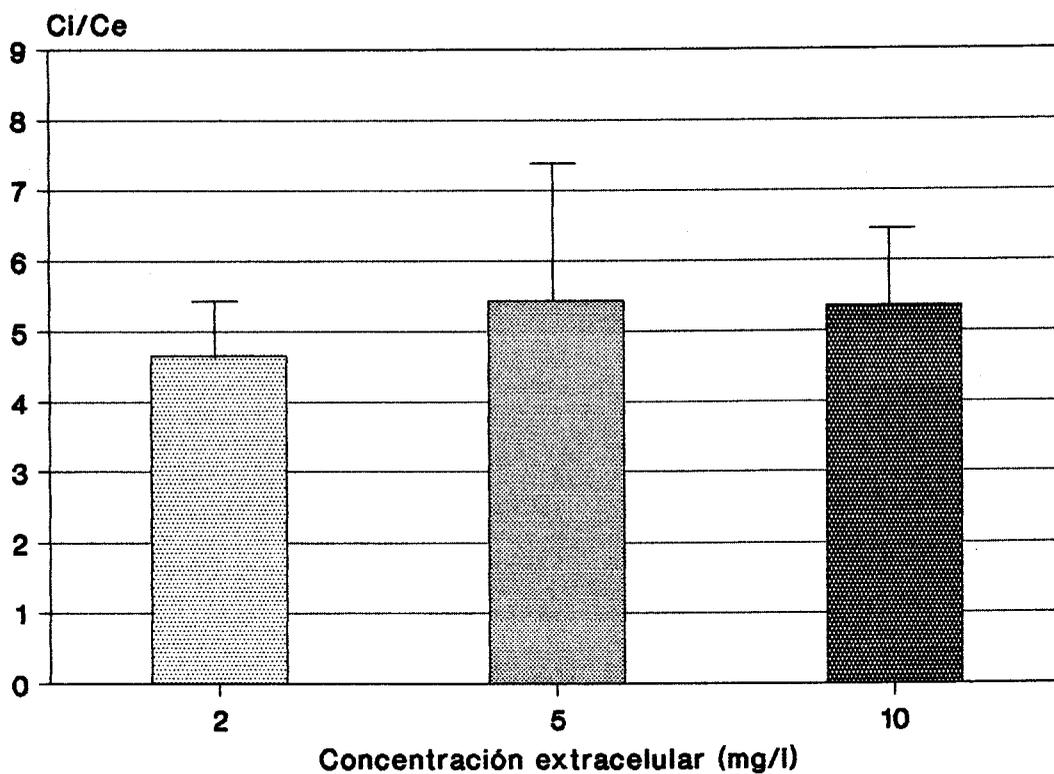


Figura 14. Penetración intracelular de fleroxacina en PMN humanos a diferentes concentraciones extracelulares. (n=4). El tiempo de incubación fue de 20 min., la temperatura de 37°C y las concentraciones extracelulares empleadas fueron 2, 5 y 10 mg/l.

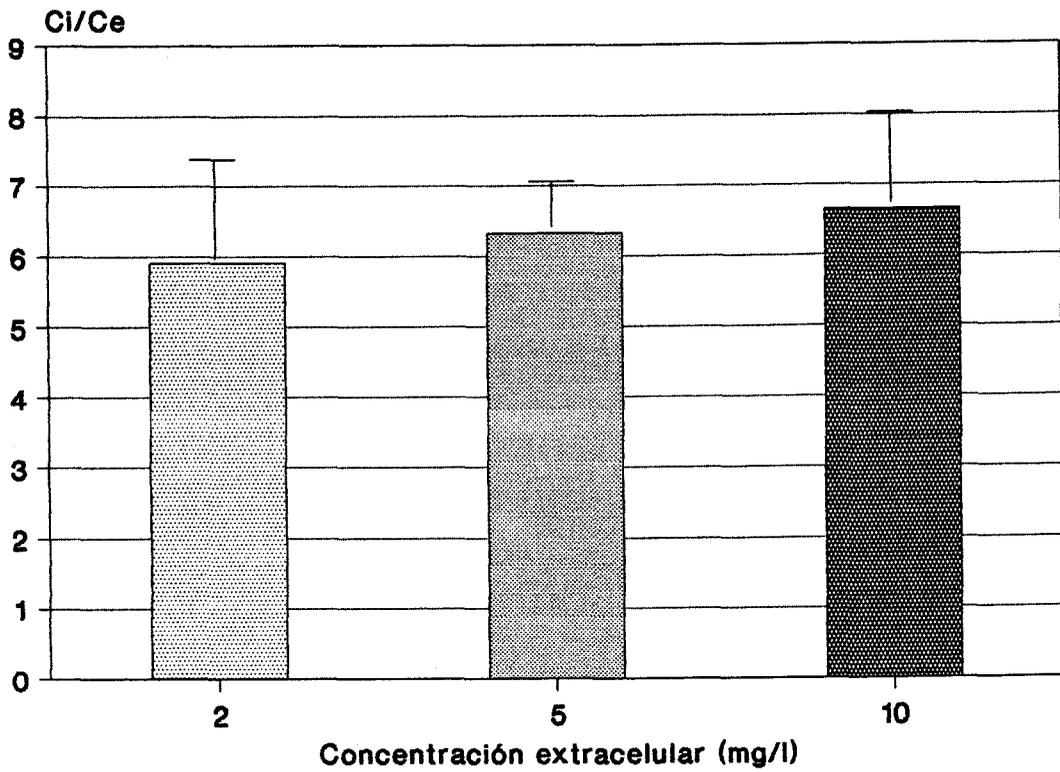


Figura 15. Penetración intracelular de lomefloxacin en PMN humanos a diferentes concentraciones extracelulares. (n=4). El tiempo de incubación fue de 20 min., la temperatura de 37°C y las concentraciones extracelulares empleadas fueron 2, 5 y 10 mg/l.

## 1.2 CARACTERIZACION DE LA PENETRACION DE FLUORQUINOLONAS EN PMN HUMANOS.

### 1.2.1 Cinéticas de penetracion intracelular.

Para evaluar las cinéticas de penetración intracelular de norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, fleroxacin y lomefloxacin, se midió la penetración de estas fluorquinolonas a diferentes tiempos de incubación (1, 5, 10, 20 y 60 minutos). La concentración extracelular utilizada en todos los casos fue 2 mg/l y la temperatura de incubación 37°C.

**Norfloxacin.** Es absorbida rápidamente tras un minuto de incubación. El valor de  $C_i/C_e$  obtenido fue  $3'65 \pm 2'01$  y continúa con valores muy próximos a éste cuando el tiempo de incubación es de 5 y 10 min. Tras 20 min. de incubación se alcanzan valores de  $6'48 \pm 1'24$  y continúa con una ligera tendencia alcista hasta alcanzar un valor de  $8'43 \pm 1'56$  correspondiente al último tiempo de incubación de referencia (60 min.) Figura 16.

**Ofloxacin.** Es absorbida rápidamente, alcanzando valores muy altos tras el primer minuto de incubación ( $5'12 \pm 1'38$ ). A partir de este momento ocurre una pequeña depresión que se corresponde con los valores de  $C_i/C_e$  de  $4'68 \pm 0'72$  y  $4'62 \pm 1'18$  para 5 y 10 minutos respectivamente. Estos valores son superados llegando hasta  $6'58 \pm 0'31$  en 20 min. y manteniéndose constante hasta el final (60 min.). Figura 17.

**Levofloxacin.** Su cinética de penetración aparece mucho más deprimida que para el resto de las fluorquinolonas. El valor de Ci/ce para levofloxacin tras 1 min. es de  $2'01 \pm 0'38$ , alcanza el valor de  $3'48 \pm 0'81$  tras 5 min. de incubación y de  $4'05 \pm 0'64$  a los 20 min., permaneciendo prácticamente en fase de meseta hasta los 60 min. Figura 18.

**Fleroxacin.** Rápida absorción en el primer minuto de incubación, alcanza valores de  $4'49 \pm 1'76$  a los cinco minutos y continúa en fase estacionaria o de meseta hasta el último tiempo ensayado (60min.,  $4'58 \pm 0'72$ ). Figura 19.

**Lomefloxacin.** Rápida absorción, alcanza un valor de  $2'79 \pm 0'04$  tras un minuto de incubación y continúa en orden creciente hasta llegar a  $6'58 \pm 1'82$  a los 10 min. Desciende ligeramente a un valor de  $5'8 \pm 1'02$  ( $t = 20$  min) para recuperar su tendencia alcista hasta alcanzar un valor de  $7'41 \pm 1'93$  a los 60 min. Figura 20.

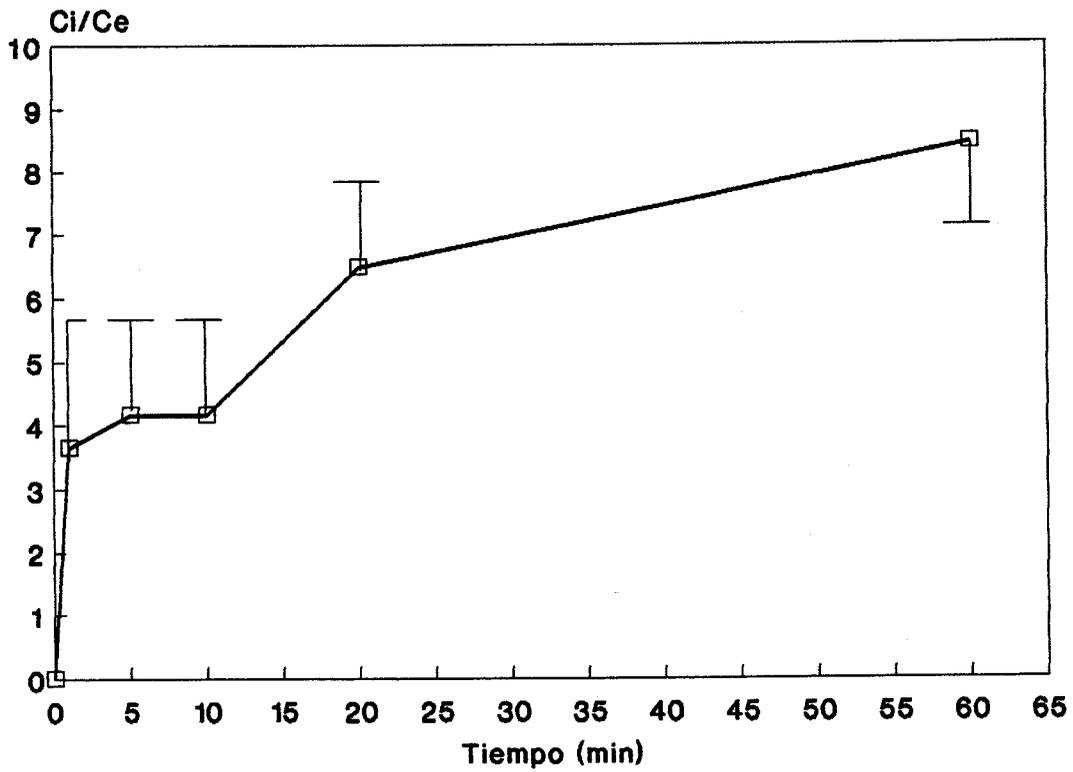


Figura 16. Penetración intracelular de norfloxacin en PMN humanos ensayada con distintos tiempos de incubación (1, 5, 10, 20 y 60 minutos). Concentraciones extracelulares de 2 mg/l y Tª de 37°C. (n=4).

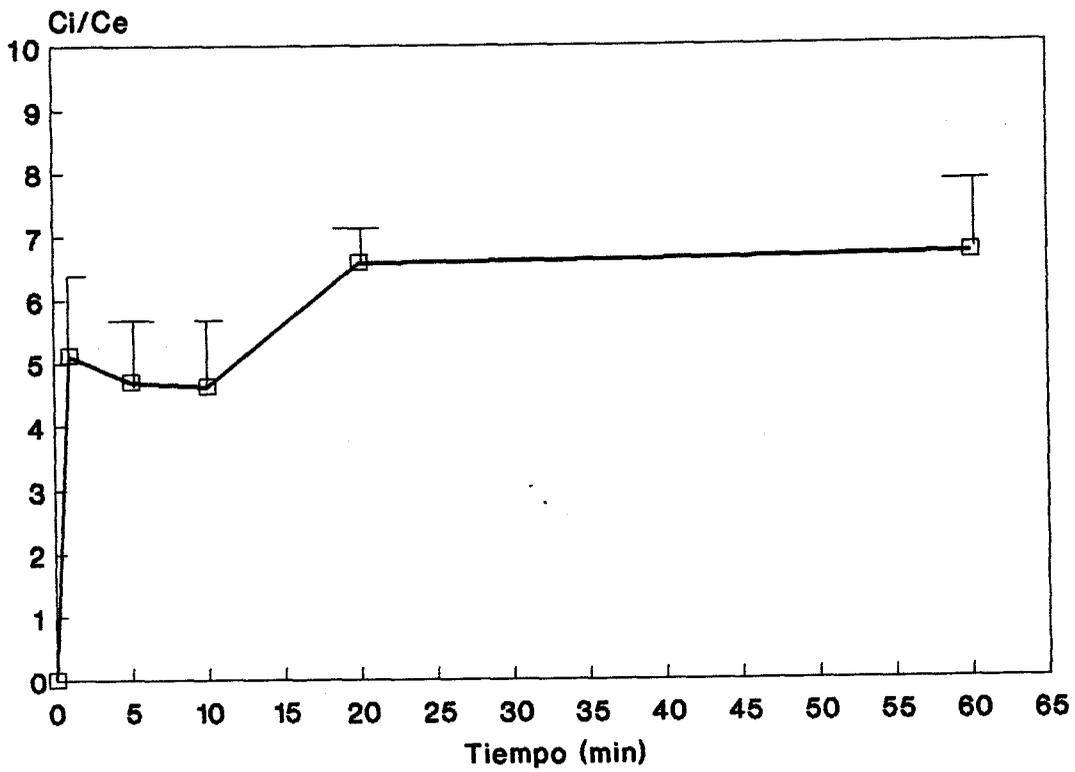


Figura 17. Penetración intracelular de ofloxacin en PMN humanos ensayada con distintos tiempos de incubación (1, 5, 10, 20 y 60 minutos). Concentraciones extracelulares de 2 mg/l y Tª de 37°C. (n = 4).

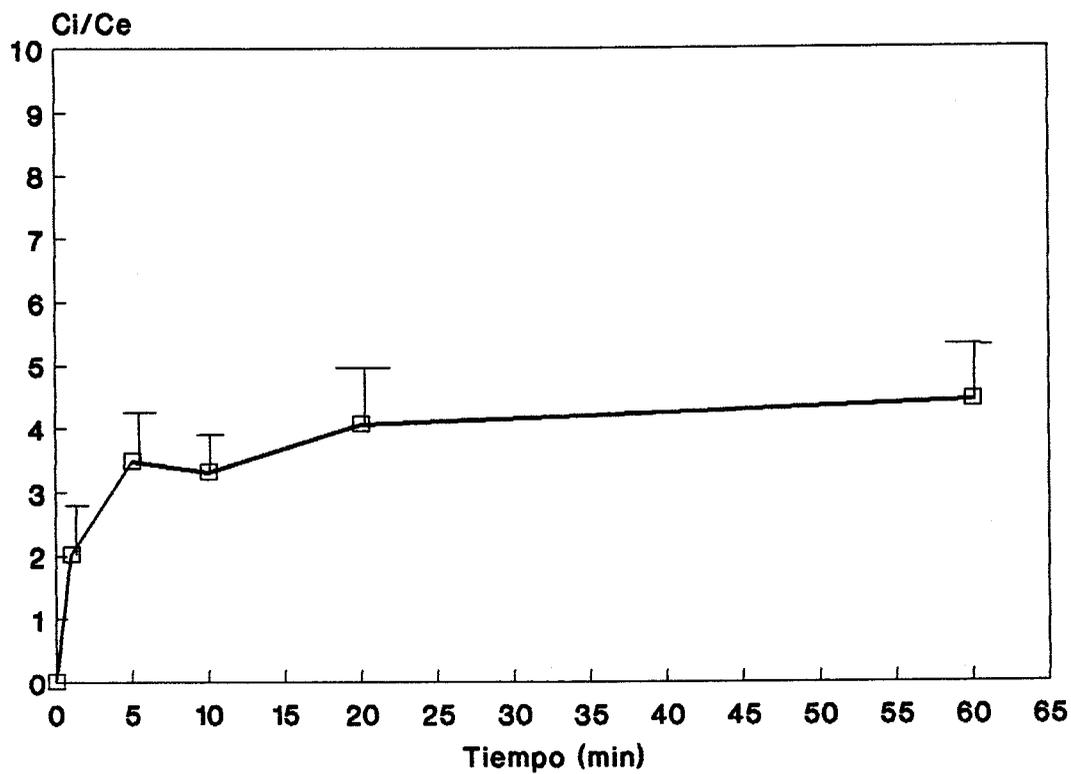


Figura 18. Penetración intracelular de levofloxacina en PMN humanos ensayada con distintos tiempos de incubación (1, 5, 10, 20 y 60 minutos). Concentraciones extracelulares de 2 mg/l y Tª de 37°C. (n=4).

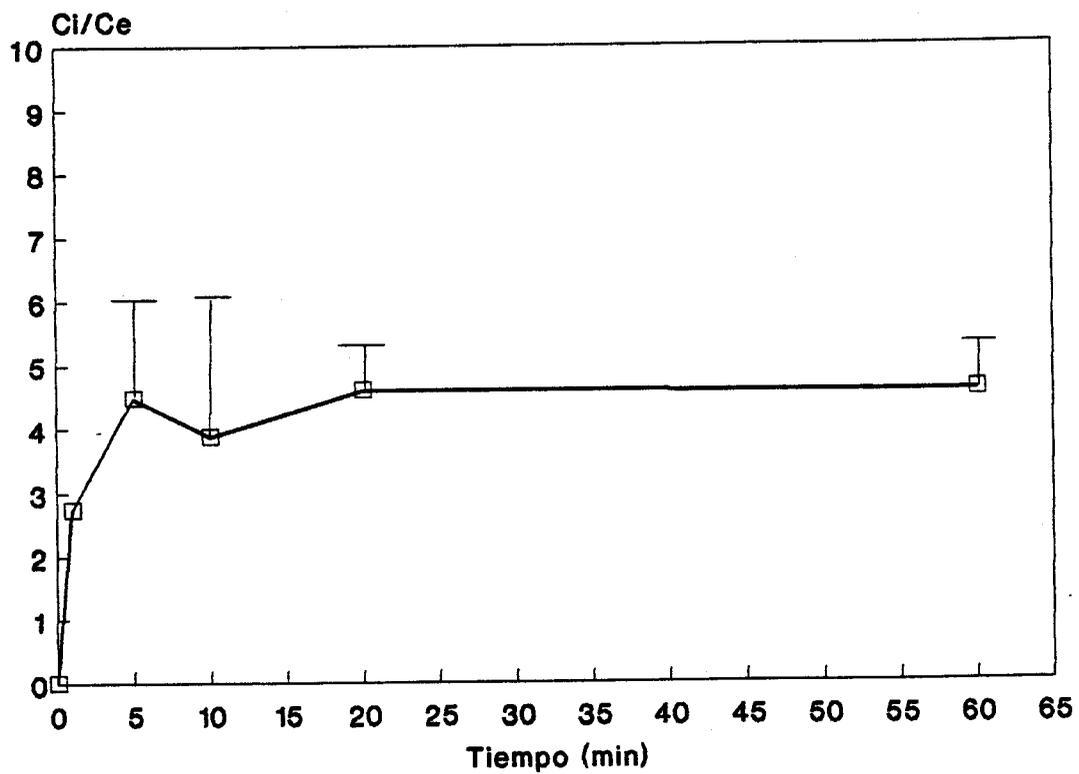


Figura 19. Penetración intracelular de fleroxacin en PMN humanos ensayada con distintos tiempos de incubación (1, 5, 10, 20 y 60 minutos). Concentraciones extracelulares de 2 mg/l y Tª de 37°C. (n=4).

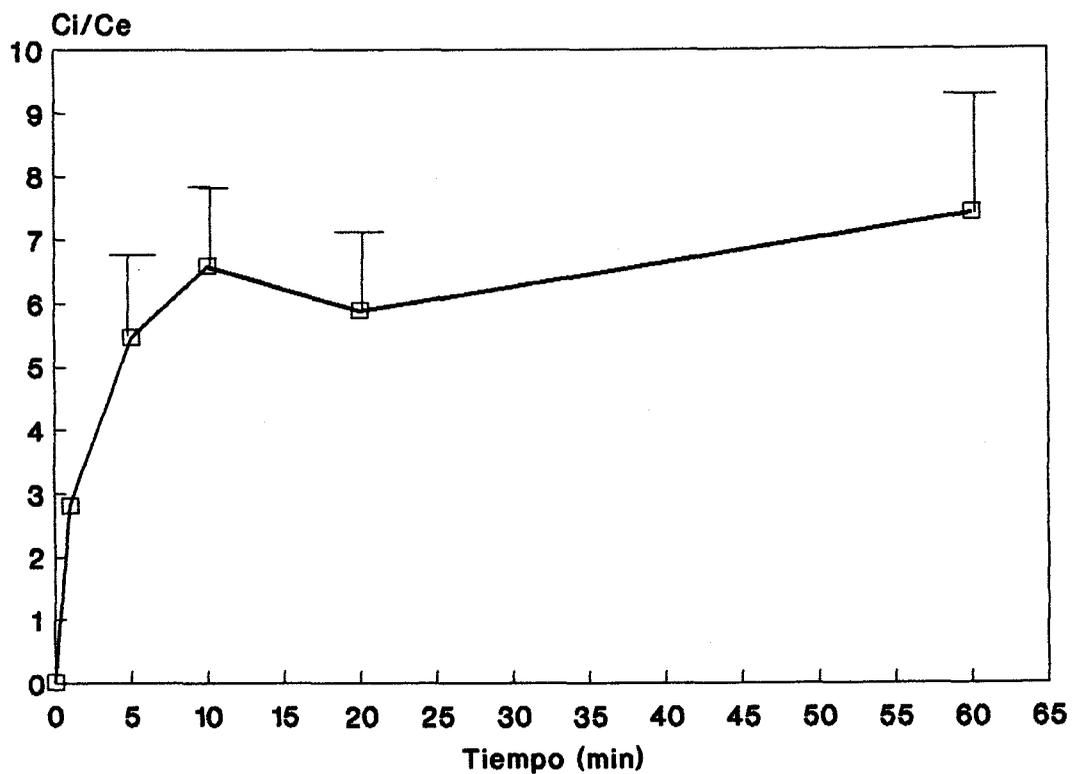


Figura 20. Penetración intracelular de lomefloxacin en PMN humanos ensayada con distintos tiempos de incubación (1, 5, 10, 20 y 60 minutos). Concentraciones extracelulares de 2 mg/l y T<sup>a</sup> de 37°C. (n = 4).

### 1.2.2 Efecto de la concentración extracelular.

Para evaluar un posible efecto de saturación en la penetración intracelular de norfloxacin, fleroxacin, ofloxacin, lomefloxacin y levofloxacin, determinamos los valores de las concentraciones intracelulares para cada fluorquinolona frente a distintas concentraciones extracelulares de las mismas. El tiempo de incubación fue de 20 minutos en todos los ensayos, la temperatura 37°C y las concentraciones extracelulares empleadas fueron 1, 2, 5, 10 y 25 mg/l.

**Norfloxacin.** Cuando el valor de concentración extracelular es de 1 mg/l, la concentración intracelular asciende a  $5'22 \pm 1'59$  y ésta aumenta al aumentar los valores de concentraciones extracelulares, hasta alcanzar el valor de  $114'5 \pm 20'5$  mg/ml cuando la concentración extracelular es de 25 mg/l. Figura 21.

**Ofloxacin.** La concentración intracelular aumentaba desde  $2'7 \pm 1$  mg/l a  $118'25 \pm 20'5$  cuando las concentraciones extracelulares variaban de 1 a 25 mg/l respectivamente. Figura 22.

**Levofloxacin.** Los valores de concentración intracelular varían desde  $3'93 \pm 2'15$  cuando la concentración extracelular es de 1 mg/l hasta  $86 \pm 13'75$  cuando la concentración extracelular es de 25 mg/l, siendo este último valor el más bajo de los observados entre las fluorquinolonas ensayadas para Ce de 25 mg/l. Figura 23.

**Fleroxacina.** Los valores de concentración intracelular aumentaban desde 4'8 mg/l cuando la concentración extracelular era 1mg/l, hasta  $114'5 \pm 28$  mg/l cuando la concentración extracelular era de 25 mg/l. Figura 24.

**Lomefloxacina.** Con lomefloxacina se alcanzan los valores más altos de concentración intracelular de todas las fluorquinolonas ensayadas, obteniéndose valores de  $8'12 \pm 3'45$  cuando  $C_e$  es de 1 mg/l y de  $154'13$  para concentraciones extracelulares de 25 mg/l. Figura 25.

En todos los ensayos, las concentraciones intracelulares de las fluorquinolonas aumentaban al aumentar los valores de concentraciones extracelulares de las mismas. En ningún caso se produjo efecto de saturación.

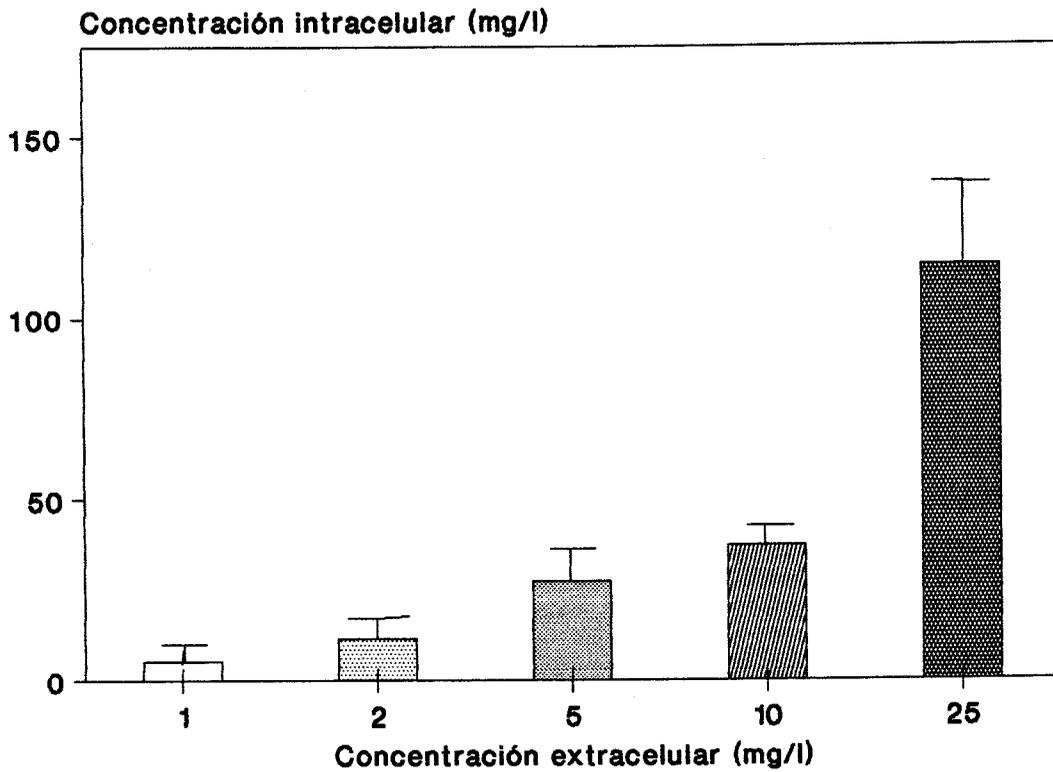


Figura 21. Valores de concentración intracelular de norfloxacin en PMN humanos incubados (37°C;20 min.) con distintas concentraciones extracelulares de este antimicrobiano (1, 2, 5, 10 y 25 mg/l). (n=3).

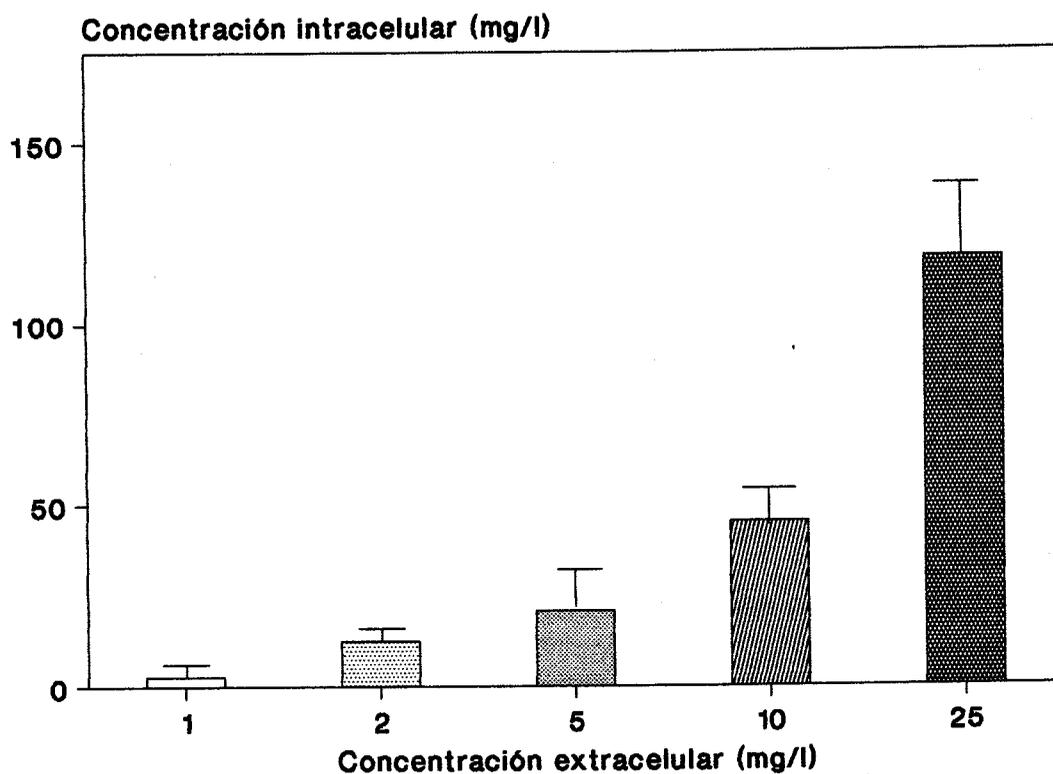


Figura 22. Valores de concentración intracelular de ofloxacina en PMN humanos incubados (37°C;20 min.) con distintas concentraciones extracelulares de este antimicrobiano (1, 2, 5, 10 y 25 mg/l). (n=3).

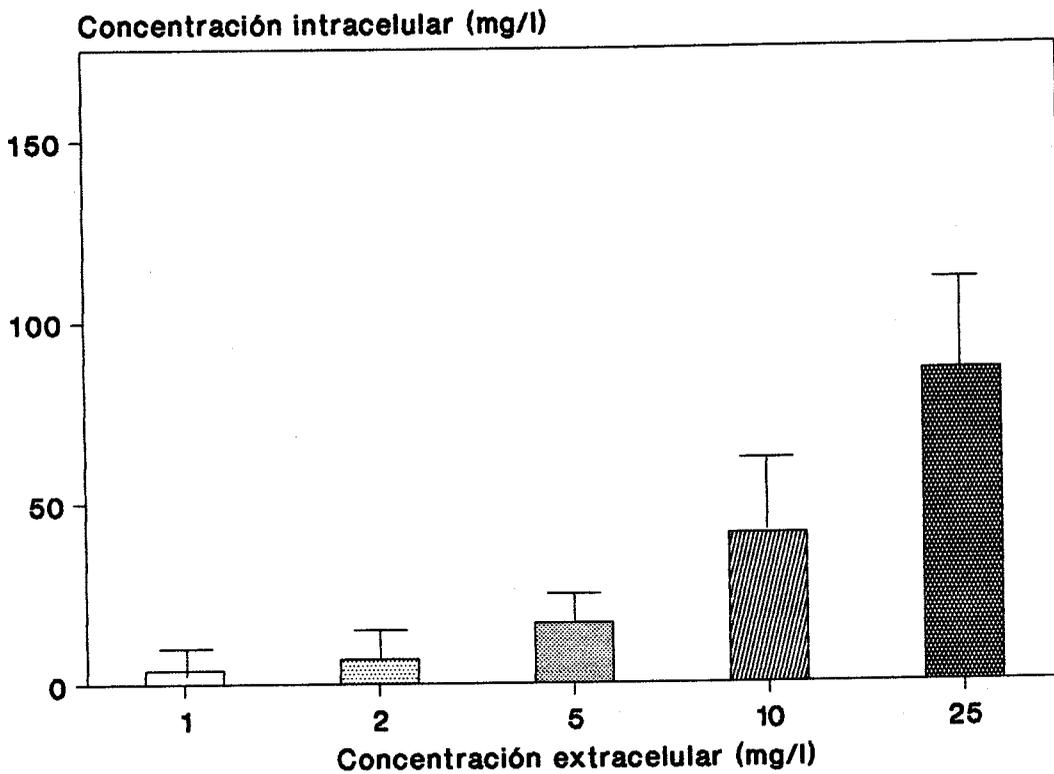


Figura 23. Valores de concentración intracelular de levofloxacin en PMN humanos incubados (37°C;20 min.) con distintas concentraciones extracelulares de este antimicrobiano (1, 2, 5, 10 y 25 mg/l). (n = 3).

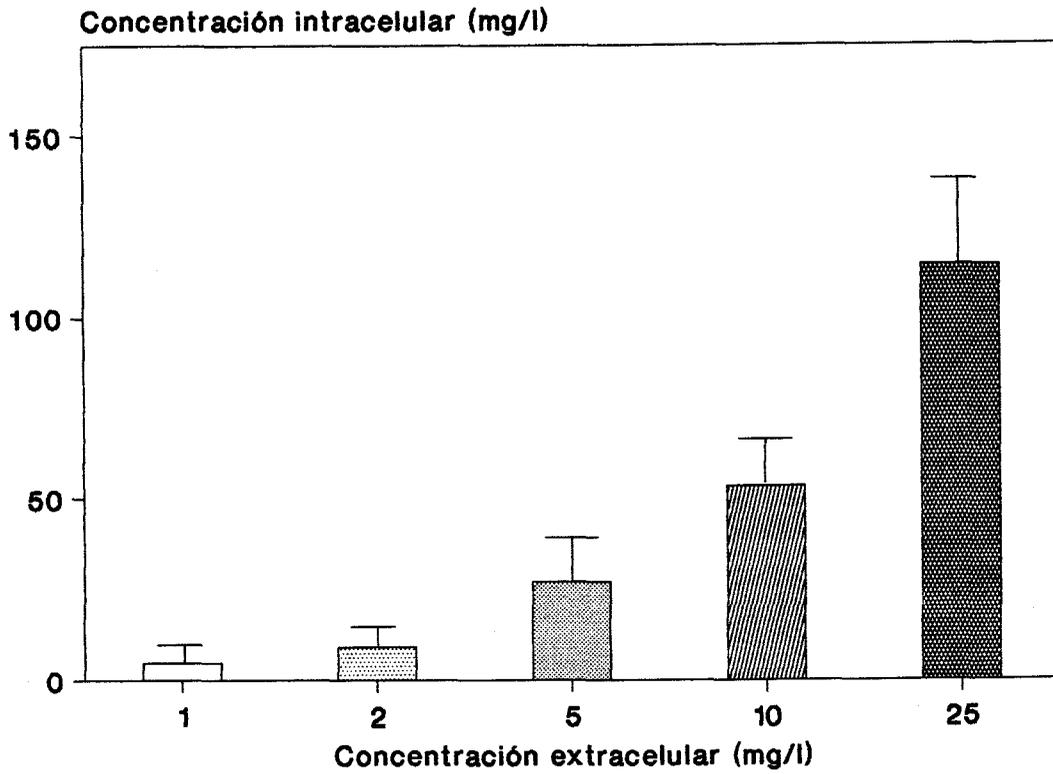


Figura 24. Valores de concentración intracelular de fleroxacina en PMN humanos incubados (37°C;20 min.) con distintas concentraciones extracelulares de éste antimicrobiano (1, 2, 5, 10 y 25 mg/l). (n=3).

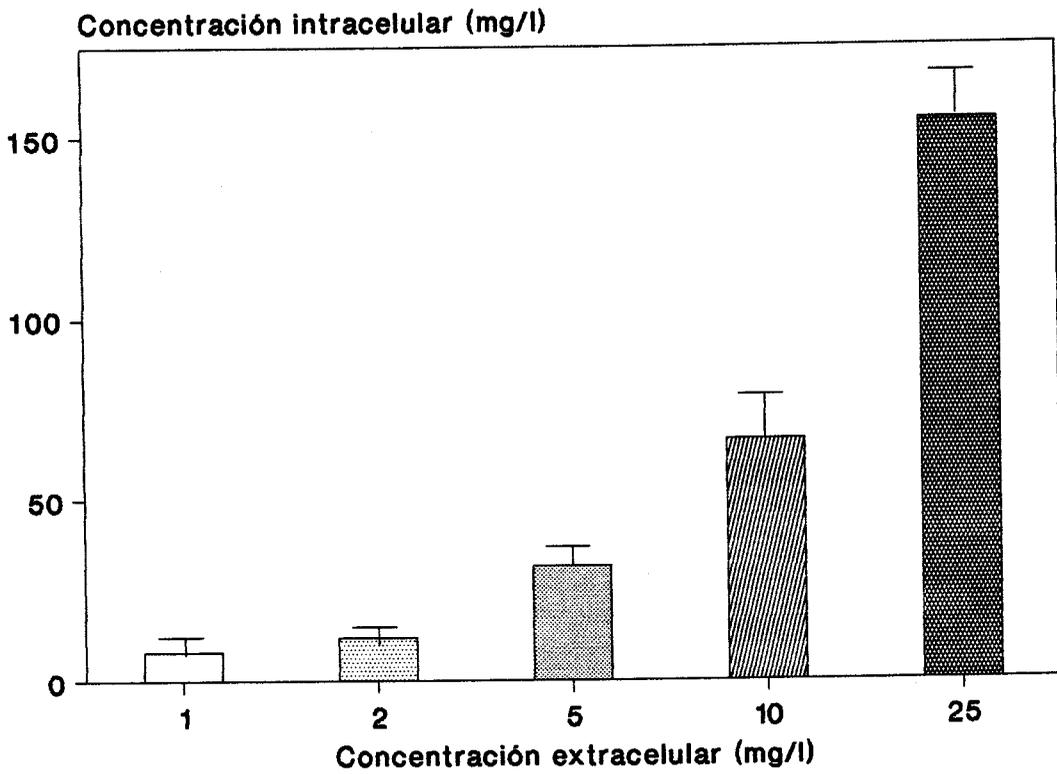


Figura 25. Valores de concentración intracelular de lomefloxacina en PMN humanos incubados (37°C;20 min.) con distintas concentraciones extracelulares de este antimicrobiano (1, 2, 5, 10 y 25 mg/l). (n = 3).

### 1.2.3 Efecto de la temperatura y viabilidad celular.

Para analizar la dependencia de viabilidad y temperatura en la acumulación de norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, fleroxacin y lomefloxacin en los PMN humanos, realizamos un estudio de penetración intracelular con PMN humanos vivos, a 4°C y 37°C, y con PMN muertos. En todos los ensayos usamos 2 mg/l como concentración extracelular de antimicrobiano y 20 minutos como tiempo de incubación.

**Norfloxacin.** Los valores de Ci/Ce disminuyeron significativamente desde  $4'5 \pm 0'78$  mg/l a 37 °C hasta  $0'73 \pm 0'45$  mg/l a 4°C. Estos valores se vieron aumentados significativamente hasta  $8'00 \pm 1'44$  mg/ml cuando usábamos PMN muertos. Figura 26.

**Ofloxacin.** Los valores de Ci/Ce descendieron notablemente tanto para las células muertas como para las células incubadas a 4°C con respecto a las células vivas incubadas a 37°C, pero sólo el descenso experimentado con células a 4°C fue significativo ( $1'30 \pm 0'41$ ). Figura 27.

**Levofloxacin.** Los valores de Ci/Ce se vieron significativamente disminuidos cuando se usaron PMN incubados a 4°C ( $1'21 \pm 1'06$ ) y células muertas ( $2'31 \pm 0'6$ ) con respecto a los valores obtenidos para células incubadas a 37°C ( $4'65 \pm 0'75$ ). Figura 28.

**Fleroxacina.** Los valores de Ci/Ce descendieron significativamente cuando se usaban células a 4°C ( $1'03 \pm 0'95$ ) pero no se vieron afectados cuando se usaban células muertas. Figura 29.

**Lomefloxacina.** Los valores de Ci/Ce cuando usábamos células muertas no se veían afectados respecto a las células vivas a 37 °C, pero sí disminuían significativamente cuando usábamos PMN incubados a 4°C ( $1'34 \pm 0'96$ ). Figura 30.

La penetración intracelular de fluorquinolonas disminuyó siempre cuando trabajábamos con células incubadas a 4°C. Respecto al empleo de células muertas, solo disminuyó significativamente la penetración intracelular de antimicrobiano cuando estudiábamos levofloxacina.

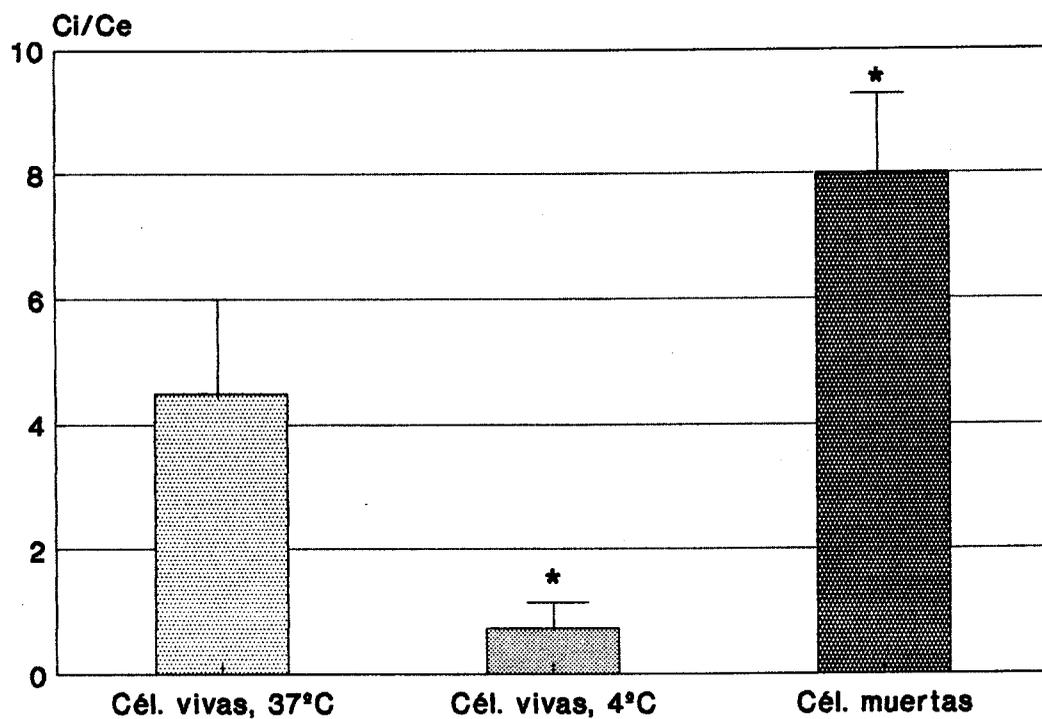


Figura 26. Efecto de la viabilidad y la temperatura en la penetración intracelular de norfloxacin en los PMN humanos. Concentración extracelular 2mg/l y tiempo de incubación 20 minutos.(n=3). \*,  $p \leq 0,05$ .

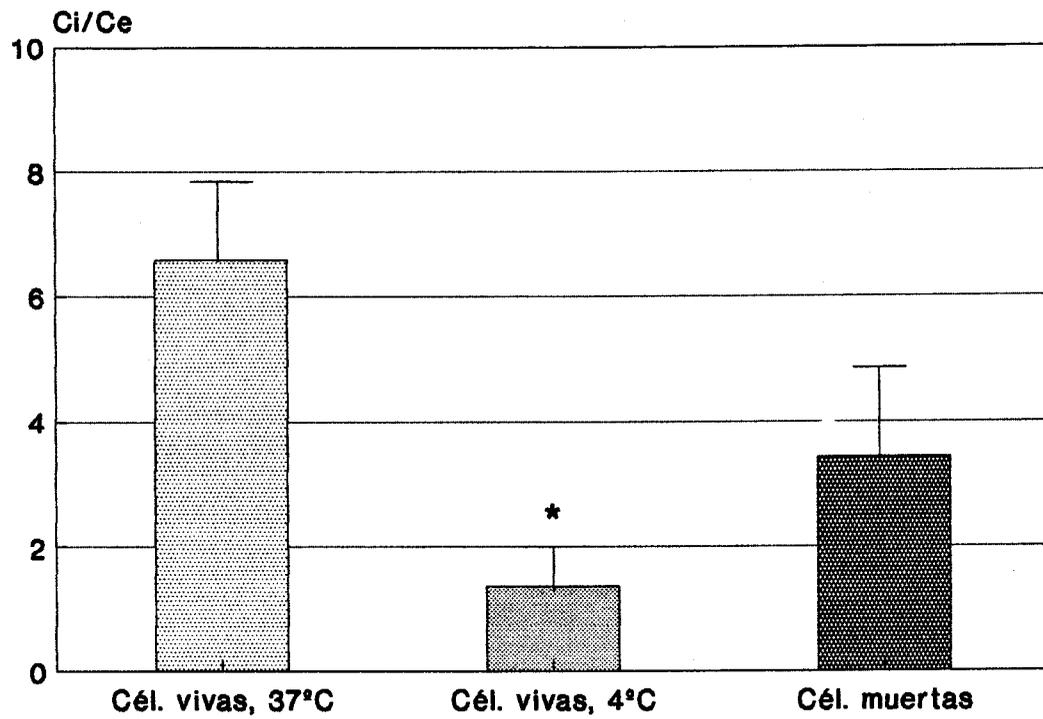


Figura 27. Efecto de la viabilidad y la temperatura en la penetración intracelular de ofloxacina en los PMN humanos. Concentración extracelular 2mg/l y tiempo de incubación 20 minutos . (n=3). \*,  $p \leq 0,05$ .

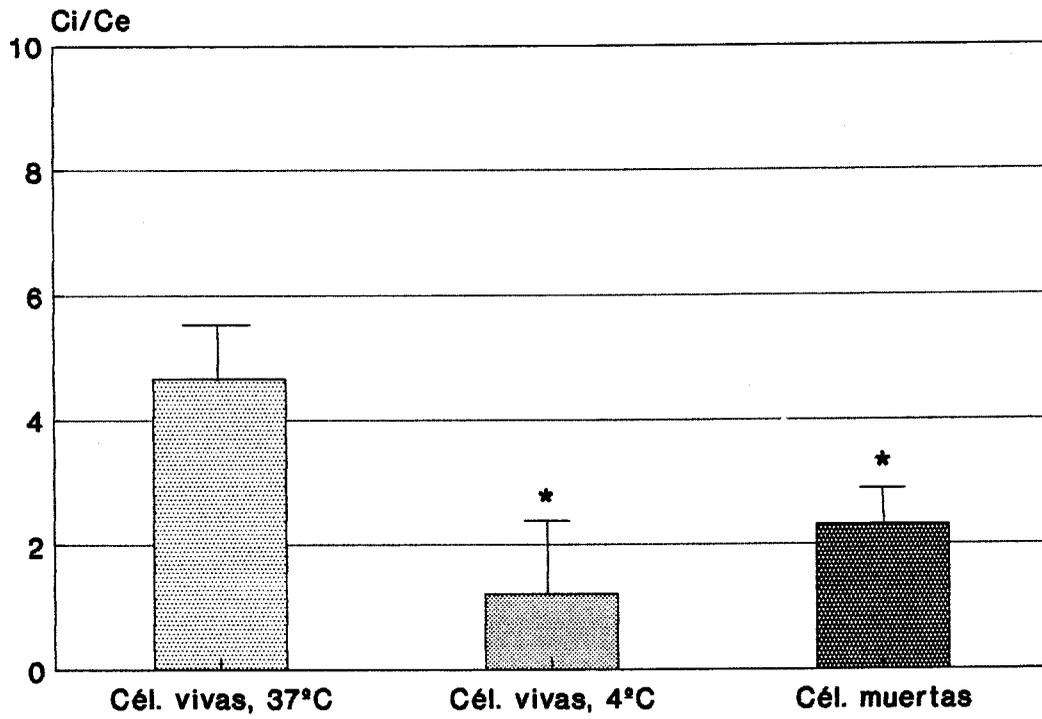


Figura 28. Efecto de la viabilidad y la temperatura en la penetración intracelular de levofloxacina en los PMN humanos. Concentración extracelular 2mg/l y tiempo de incubación 20 minutos . (n=3). \*,  $p \leq 0,05$ .

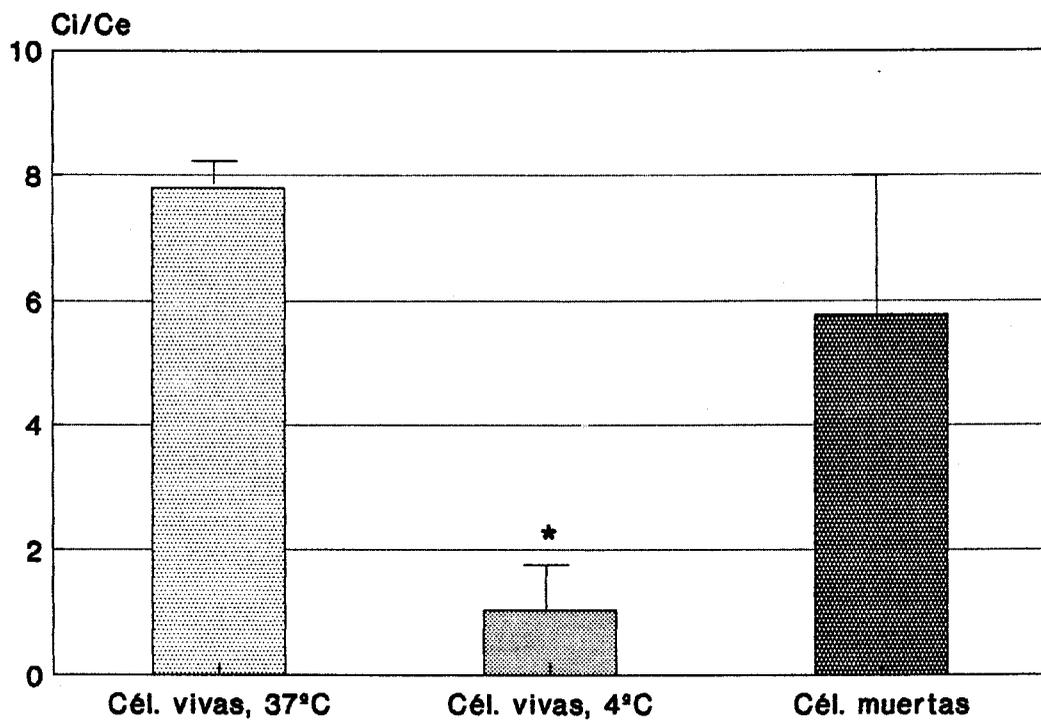


Figura 29. Efecto de la viabilidad y la temperatura en la penetración intracelular de fleroxacin en los PMN humanos. Concentración extracelular 2mg/l y tiempo de incubación 20 minutos . (n=3). \*,  $p \leq 0,05$ .

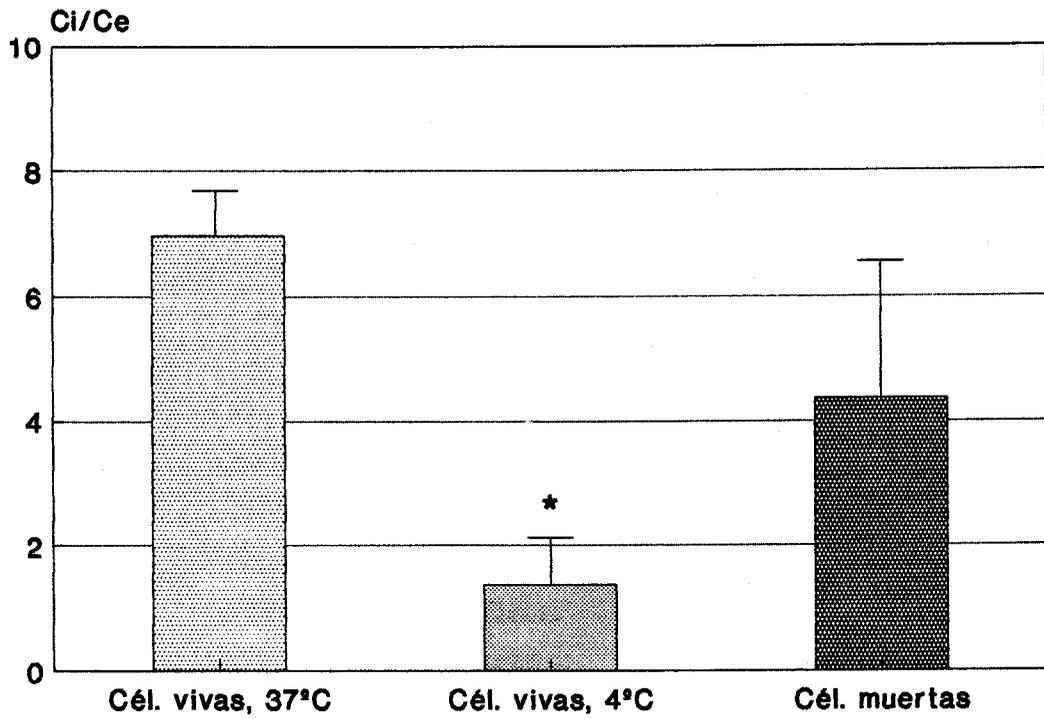


Figura 30. Efecto de la viabilidad y la temperatura en la penetración intracelular de lomefloxacin en los PMN humanos. Concentración extracelular 2mg/l y tiempo de incubación 20 minutos . (n=3). \*,  $p \leq 0,05$ .

#### **1.2.4 Efecto del pH del medio extracelular.**

Para evaluar el efecto del pH en la penetración intracelular de norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, fleroxacin y lomefloxacin por los PMN humanos, empleamos fluorquinolonas diluidas en un medio preajustado a valores externos de pH 5, 7 y 9. La concentraci3n extracelular fue siempre 2 mg/l, el tiempo de incubaci3n 20 minutos y la temperatura 37°C. (Tabla VII).

**Norfloxacin.** Los valores de Ci/Ce se veían ligeramente aumentados cuando se acidificaba el medio y ligeramente disminuidos cuando aumentábamos el pH.

**Ofloxacin.** Los valores de Ci/Ce disminuyeron significativamente cuando el pH era b3sico y se vieron notablemente aumentados cuando se acidificaba el medio.

**Levofloxacin.** Los valores de Ci/Ce disminuyeron significativamente cuando el pH era 9 y aumentaron cuando descendíamos el pH hasta 5.

**Fleroxacin.** Para un pH de 7 a 9, los valores de Ci/Ce no variaban, pero aumentaban notablemente cuando trabajábamos a pH 5.

**Lomefloxacin.** Valores muy pr3ximos se obtuvieron cuando el pH variaba de 7 a 9 y aumentaba ligeramente cuando bajábamos hasta 5 el nivel de pH.

En todos los casos el valor de  $C_i/C_e$  se ve incrementado cuando se acidifica el medio y disminuido cuando aumentamos los valores de pH.

Tabla VII. Efecto del pH en la penetración de norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, fleroxacin y lomefloxacin en PMN humanos. Los PMN fueron incubados durante 20 min. a 37°C y con concentraciones extracelulares de 2mg/l. \*,  $p < 0.05$ .

Ci/Ce					
Condiciones	NRX	OFX	LVX	FLX	LMX
pH 5	8.3±3.2	7.0±1.0	7.0±1.4	6.1±1.0	6.8±1.0
pH 7	6.4±1.6	4.7±0.3	4.5±1.1	4.2±1.0	4.9±0.8
pH 9	4.2±0.2	2.2±1.1*	2.2±0.7*	4.3±0.7	4.2±1.8

### **1.2.5 Efecto de los inhibidores metabólicos.**

Dado que el transporte activo debe estar acoplado a una fuente de energía, su funcionamiento implica la hidrólisis de ATP o el cotransporte de  $\text{Na}^+$  o  $\text{H}^+$  a favor de sus gradientes electroquímicos.

Para impedir el aporte energético (ATP) implicado en este mecanismo de transporte, usamos como inhibidores metabólicos:

**Fluoruro sódico (NaF):** es un inhibidor metabólico que impide la glicolisis y, por tanto, disminuye la energía disponible para un hipotético transporte activo.

**Cianuro sódico (NaCN) y 2, 4 Dinitrofenol (DNP):** son inhibidores energéticos y ambos actúan inhibiendo la respiración oxidativa en el sistema mitocondrial.

Como el transporte activo depende en parte del gradiente de protones a través de la membrana, se usan inhibidores que colapsen este gradiente. El efecto del bloqueo del gradiente de protones en la captación de fluorquinolonas se estudió usando **Carbonil cianuro clorofenil hidrazona (CCCP)**.

El comportamiento de los PMN, con respecto a la penetración de fluorquinolonas, fue similar en todos los ensayos.(Tabla VIII). La penetración del antimicrobiano en la célula sólo disminuía significativamente, respecto del control sin inhibidor, cuando usábamos NaCN que bloqueaba el mecanismo oxidativo de las mitocondrias, pero no se afectaba cuando empleábamos 2,4, DNP, inhibidor metabólico que actúa al mismo nivel. La penetración de las fluorquinolonas tampoco se vio influenciada en ningún caso cuando los PMN se preincubaban con NaF o CCCP.

Tabla VIII. Efecto de los inhibidores metabólicos en la penetración de norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, fleroxacin y lomefloxacin en los PMN humanos. Tiempo de incubación 20 min., Tª 37°C, concentración extracelular 2 mg/l en todos los casos. \*, p<0'05.

Ci/Ce					
Inhibidores metabólicos	NRX	OFX	LVX	FLX	LMX
Control	3.2±0.5	4.9±0.7	4.3±1.0	2.0±0.8	4.8±1.1
NaF	3.1±0.9	4.4±0.9	3.4±1.1	2.4±0.4	3.2±1.1
NaCN	0.5±0.5*	1.1±0.2*	0.9±0.3*	0.3±0.3	0.9±1.1*
2,4 DNP	2.6±0.1	4.3±0.8	3.9±0.8	2.8±0.5	3.7±0.1
CCCP	4.4±1.3	3.5±0.6	3.8±1.0	2.4±1.4	3.7±0.3

### **1.2.6 Reversibilidad de la unión de fluorquinolonas a los componentes celulares.**

Para determinar si las fluorquinolonas que habían penetrado en las células fagocíticas estaban firmemente unidas a los componentes celulares, estudiamos las cinéticas de elusión del antimicrobiano. La concentración extracelular ensayada fue de 2mg/l, temperatura de incubación 37°C y tiempo 20 minutos.

En todos los casos (figuras 31 a 35) la liberación de las fluorquinolonas fue rápida.

Para norfloxacin y fleroxacin, el 60% del antimicrobiano asociado a la célula era liberado tras el primer minuto de permanencia en un medio libre de antimicrobiano (comparar valores a 20 y 21 min. en la gráfica). Ofloxacin y levofloxacin perdían el 40 % en el primer minuto, mientras que lomefloxacin era liberada de manera más lenta, si bien las células perdían el 90 % de éstas tras cinco minutos de permanencia en un medio libre de antimicrobiano , al igual que el resto de las fluorquinolonas analizadas (comparar valores a 20 y 25 min. en las gráficas).

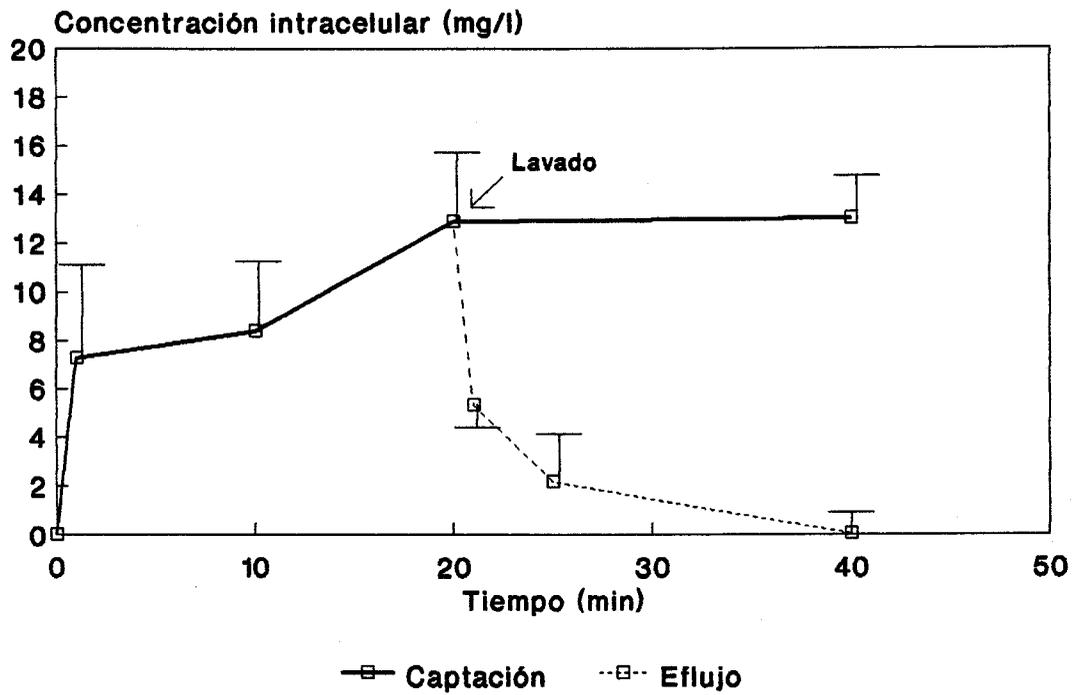


Figura 31. Eflujo de norfloxacin intracelular en PMN humanos en ausencia de antimicrobiano extracelular. (n=3). Los PMN fueron centrifugados y resuspendidos en un medio libre de antimicrobiano después de 20 minutos de acumulación de las fluorquinolonas.

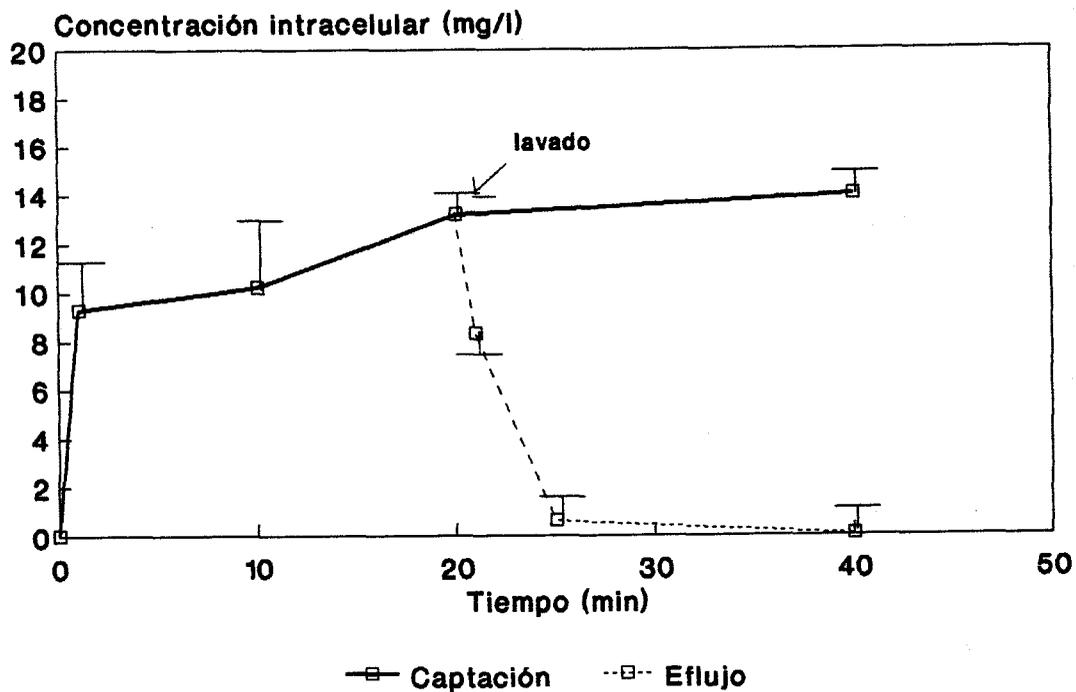


Figura 32. Eflujo de ofloxacin intracelular en PMN humanos en ausencia de antimicrobiano extracelular. (n=3). Los PMN fueron centrifugados y resuspendidos en un medio libre de antimicrobiano después de 20 minutos de acumulación de las fluorquinolonas.

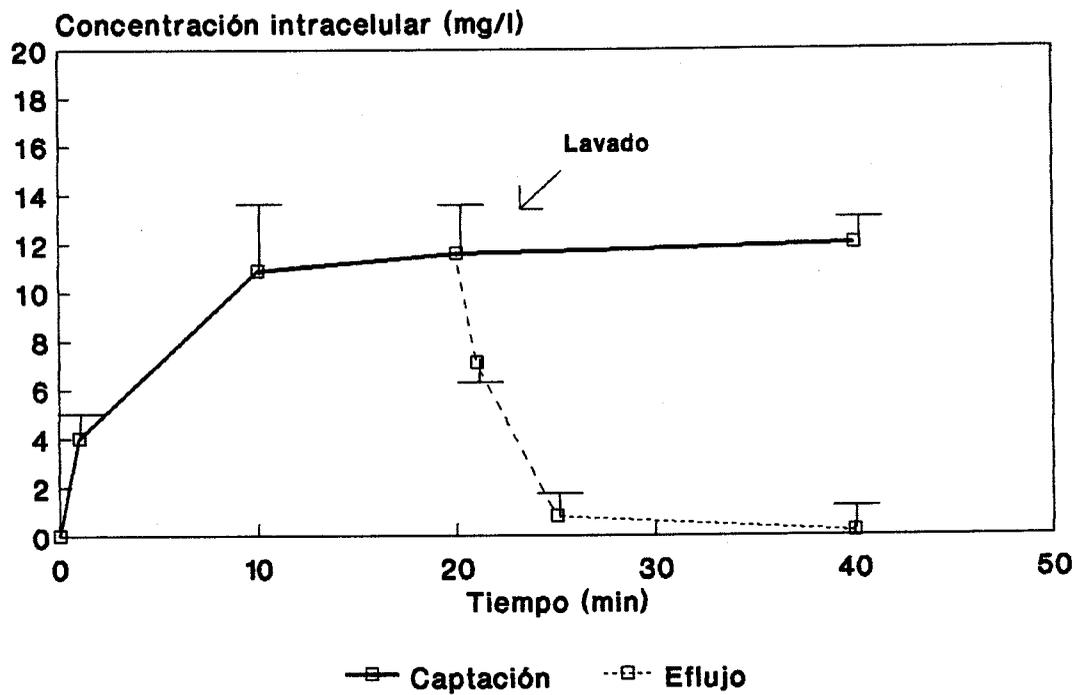


Figura 33. Eflujo de levofloxacina intracelular en PMN humanos en ausencia de antimicrobiano extracelular. (n=3). Los PMN fueron centrifugados y resuspendidos en un medio libre de antimicrobiano después de 20 minutos de acumulación de las fluorquinolonas.

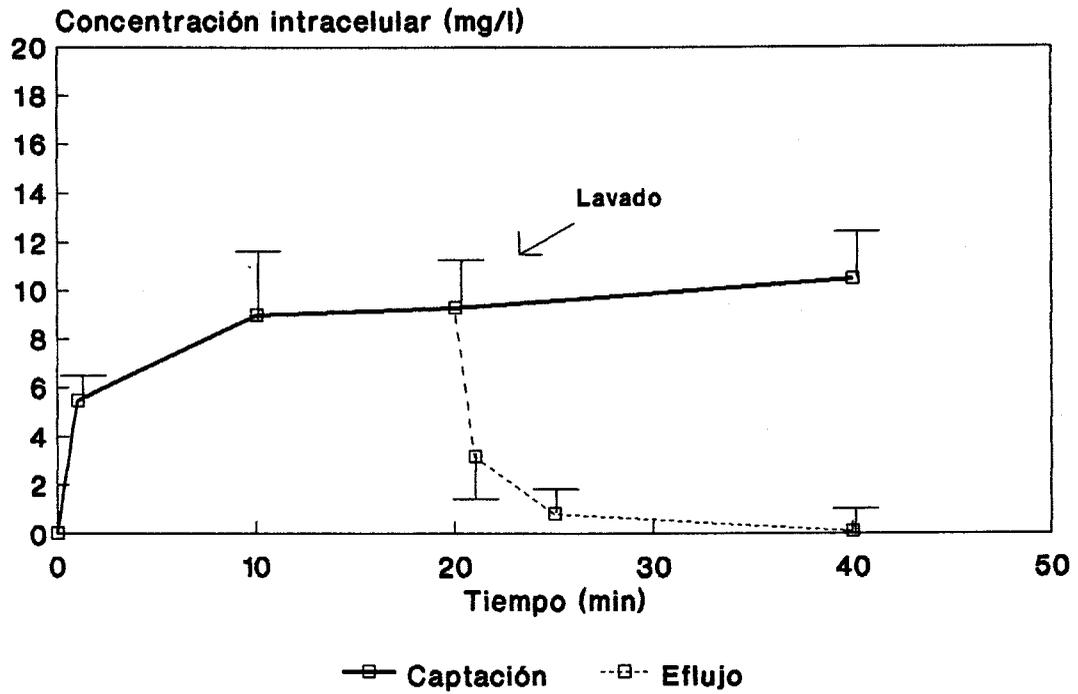


Figura 34. Eflujo de fleroxacina intracelular en PMN humanos en ausencia de antimicrobiano extracelular. (n=3). Los PMN fueron centrifugados y resuspendidos en un medio libre de antimicrobiano después de 20 minutos de acumulación de las fluorquinolonas.

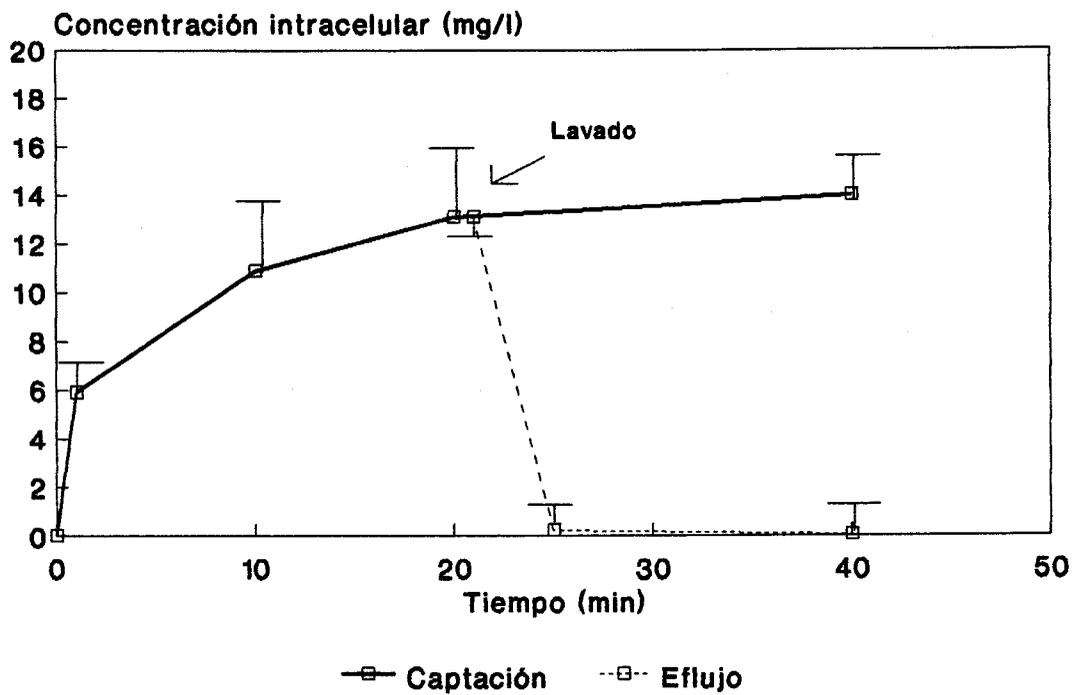


Figura 35. Eflujo de lomefloxacin intracelular en PMN humanos en ausencia de antimicrobiano extracelular. (n=3). Los PMN fueron centrifugados y resuspendidos en un medio libre de antimicrobiano después de 20 minutos de acumulación de las fluorquinolonas.

## **2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LAS FLUORQUINOLONAS**

### **2.1 EFECTO DE CONCENTRACIONES TERAPEUTICAS DE FLUORQUINOLONAS SOBRE LOS MECANISMOS BACTERICIDAS DEPENDIENTES DE OXIGENO DE LOS PMN HUMANOS.**

#### **2.1.1 Producción de peróxido de hidrógeno.**

Para este ensayo, los PMN fueron preincubados a 37°C en estufa durante 30 minutos con concentraciones extracelulares de 2, 5 y 10 mg/l de norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, fleroxacin y lomefloxacin. La cantidad de peróxido producida se midió a los 60 min. de añadir el estímulo (PMA 200 nM).

La producción de peróxido de hidrógeno fue similar con las distintas fluorquinolonas ensayadas (Tabla IX). Tampoco parece existir una relación lineal entre la concentración extracelular de fluorquinolona y la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dado que los valores obtenidos con las distintas concentraciones extracelulares (2, 5 y 10 mg/l) son prácticamente iguales y similares a su vez al de los PMN, igualmente estimulados con PMA pero incubados sin antimicrobiano. Los valores

oscilaron entre  $504 \pm 59$  Nmoles/mg proteína para los PMN expuestos a 2 mg/l de lomefloxacin hasta  $453 \pm 25$  Nmoles/mg proteína para PMN preincubados con 5mg/l de ofloxacin.

La cantidad de  $H_2O_2$  producido por el control (PMN no expuestos a antimicrobianos pero sí a PMA) fue de  $482 \pm 21'2$  Nmoles/mg de proteína, no existiendo diferencias significativas en la producción de peróxido de hidrógeno por los PMN cuando eran incubados con antimicrobianos respecto del control.

Tabla IX. Efecto de norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, fleroxacin y lomefloxacin en la producci3n de per3xido de hidr3geno por los PMN humanos (n=5). Los PMN fueron incubados con los antimicrobianos durante 30 minutos a 37°C.

Antimicrobiano	Concentraci3n (mg/l)	Producci3n de per3xido de hidr3geno <sup>a</sup> (Nmol/mg prote3na)
Sin antimicrobiano		482.1 ± 21.2
NORFLOXACINA	2	479.5 ± 53.3
	5	478.1 ± 44.6
	10	469.4 ± 17.3
OFLOXACINA	2	465.1 ± 20.2
	5	453.6 ± 25.9
	10	463.7 ± 27.4
LEVOFLOXACINA	2	468.2 ± 38.9
	5	482.4 ± 40.3
	10	479.5 ± 44.6
FLEROXACINA	2	493.9 ± 64.8
	5	492.5 ± 47.5
	10	479.5 ± 37.4
LOMEFLOXACINA	2	504.1 ± 59.1
	5	478.1 ± 36.1
	10	446.4 ± 30.2

<sup>a</sup> Est3mulo PMA (200nM).

### 2.1.2 Producción de radicales superóxido.

Tras incubar los PMN durante 30 minutos a 37°C en estufa con 2, 5, y 10 mg/l de norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, fleroxacin y lomefloxacin, se midi3 la producci3n de radicales super3xido por los mismos mediante la t3cnica basada en la reducci3n del ferricitocromo C. Los resultados se expresan en la tabla X.

La producci3n de radicales super3xidos fue similar con las distintas fluorquinolonas ensayadas, as3 como los valores obtenidos con las distintas concentraciones extracelulares (2, 5 y 10 mg/l). La cantidad de  $O_2^-$  producido por los PMN a los 60 minutos de a3adir el est3mulo (PMA 200 nM) oscil3 entre  $108 \pm 11$  Nmoles/mg prote3na para los PMN expuestos a 5 mg/l de norfloxacin y  $145 \pm 15$  Nmoles/mg de prote3na para los PMN preincubados con 2 mg/l de lomefloxacin.

La cantidad de super3xido producida por el control (PMN no expuestos a antimicrobiano pero si a PMA) fue de  $140 \pm 28$  Nmoles/mg prote3na, no encontrando diferencias significativas con respecto a la producci3n de radicales super3xido por los PMN preincubados con antimicrobianos.

Tabla X. Efecto de norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, fleroxacin y lomefloxacin en la producci3n de radicales super3xido por los PMN humanos (n = 5). Los PMN fueron incubados con los antimicrobianos durante 30 minutos a 37°C.

Antimicrobiano	Concentraci3n (mg/l)	Producci3n de radicales super3xido <sup>a</sup> (Nmol/mg prote3na)
Sin antimicrobiano		140.2 ± 28.1
NORFLOXACINA	2	115.0 ± 8.2
	5	108.0 ± 11.0
	10	114.0 ± 9.0
OFLOXACINA	2	123.0 ± 7.5
	5	140.0 ± 23.0
	10	137.5 ± 28.5
LEVOFLOXACINA	2	111.0 ± 28.0
	5	140.0 ± 10.0
	10	119.0 ± 36.0
FLEROXACINA	2	115.0 ± 11.0
	5	110.0 ± 7.1
	10	117.0 ± 8.0
LOMEFLOXACINA	2	145.0 ± 15.0
	5	131.5 ± 3.5
	10	122.0 ± 32.0

<sup>a</sup> Est3mulo PMA (200nM).

## 2.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LAS FLUORQUINOLONAS.

La concentración mínima inhibitoria frente a *S. aureus* de los antimicrobianos incluídos en este estudio se muestran en la tabla XI. La actividad bactericida de las fluorquinolonas ensayadas frente a esta especie se producía a las mismas concentraciones que la concentración mínima inhibitoria (CMI = CMB).

Evaluamos la actividad intracelular de norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, fleroxacin y lomefloxacin frente a *S. aureus* ATCC 25923 incubando PMN humanos que previamente habían fagocitados dichas bacterias convenientemente opsonizadas, durante tres horas a temperatura ambiente con concentraciones extracelulares de 2, 5 y 10 mg/l de estos antimicrobianos.

**Norfloxacin.** La supervivencia de *S. aureus* disminuía, aunque no significativamente, cuando empleábamos concentraciones extracelulares de 2 mg/l. Cuando poníamos concentraciones extracelulares de 5 y 10 mg/l el porcentaje de supervivientes descendía al  $52'1 \pm 1'9$  y  $43'7 \pm 11'2$  respectivamente respecto del control sin antimicrobiano (100% de supervivencia). Figura 36.

**Ofloxacin.** El porcentaje de supervivencia de *S. aureus*, con respecto del control sin antimicrobiano (100% de supervivencia) disminuye a la mitad cuando usamos concentraciones extracelulares de ofloxacin de 2 mg/l y desciende hasta un 21% cuando usamos concentraciones extracelulares

de 5 y 10 mg/l de este antimicrobiano. Figura 37.

**Levofloxacin.** En todos los casos la supervivencia intracelular se redujo a la mitad, con valores muy significativos, aunque muy similares entre sí (55'4, 51'1 y 49'6) pese a que habían sido incubados con concentraciones extracelulares distintas (2, 5 y 10 mg/l respectivamente). Figura 38.

**Fleroxacin.** Con todas las concentraciones extracelulares ensayadas se produjo un descenso significativo en el porcentaje de supervivientes respecto del control, con valores comprendidos entre el  $52'9 \pm 7'9$  y  $36'8 \pm 6'2$  para concentraciones extracelulares de 2 y 10 mg/l respectivamente. Figura 39.

**Lomefloxacin.** El descenso en la supervivencia de *S.aureus* llegaba hasta el  $50'8 \pm 12$  respecto del control cuando la concentración extracelular era 2mg/l y descendía aún más cuando la concentración era 5 mg/l ( $36'7 \pm 6'4$ ), si bien no se aprecia un descenso mucho mayor al duplicar la concentración extracelular ( $32'1 \pm 9'4$  para 10mg/l). Figura 40.

Todas las concentraciones evaluadas de los distintos antimicrobianos, excepto norfloxacin a concentración extracelular de 2mg/ml, provocaron una disminución significativa de la supervivencia intracelular de *S. aureus*, mostrando ofloxacin (5 y 10 mg/l) un efecto sobresaliente al producir una reducción en los porcentajes de supervivientes casi dos veces superior a los observados cuando se usaba norfloxacin, fleroxacin, lomefloxacin o levofloxacin a las mismas concentraciones.

Tabla XI. Sensibilidad de *S. aureus* frente a los antimicrobianos evaluados.

ANTIMICROBIANO	C.M.I. (mg/l)
NORFLOXACINA	1
OFLOXACINA	0.125
LEVOFLOXACINA	0.250
FLEROXACINA	0.250
LOMEFLOXACINA	0.5

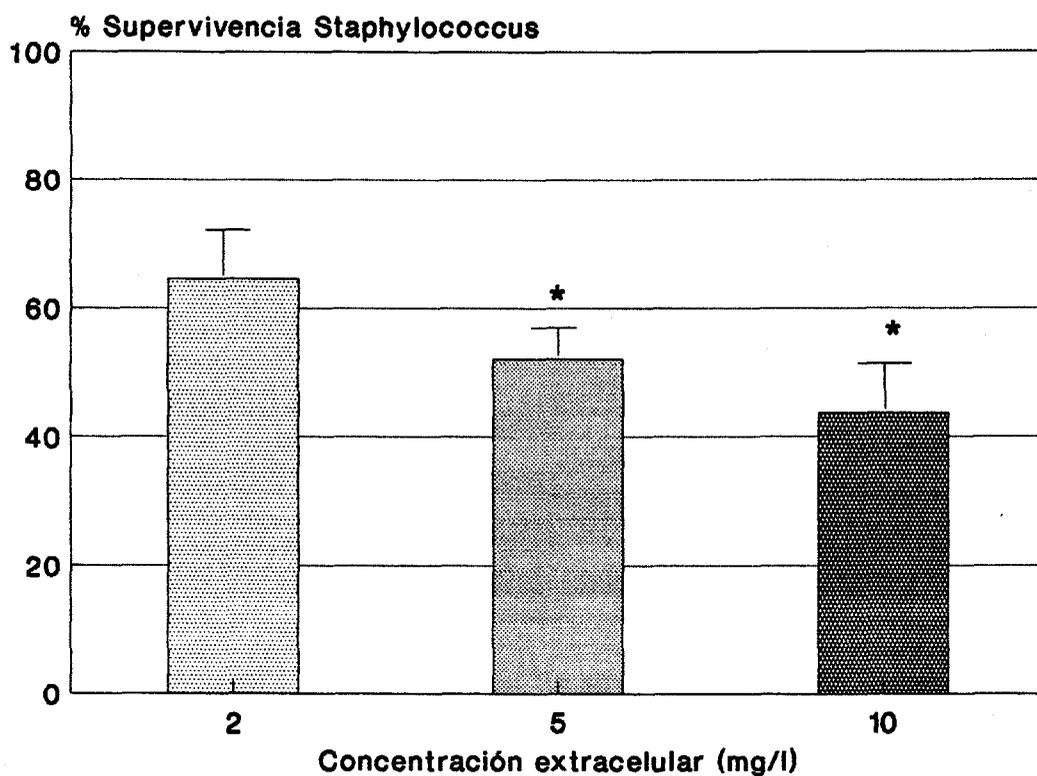


Figura 36. Efecto de norfloxacin en la supervivencia intracelular de *S. aureus* ATCC 25923 en PMN humanos. (n=3). Datos expresados como porcentajes de supervivencia con respecto al control (100% de supervivencia). Las concentraciones extracelulares empleadas fueron 2, 5 y 10 mg/l. \*,  $p \leq 0,05$ .

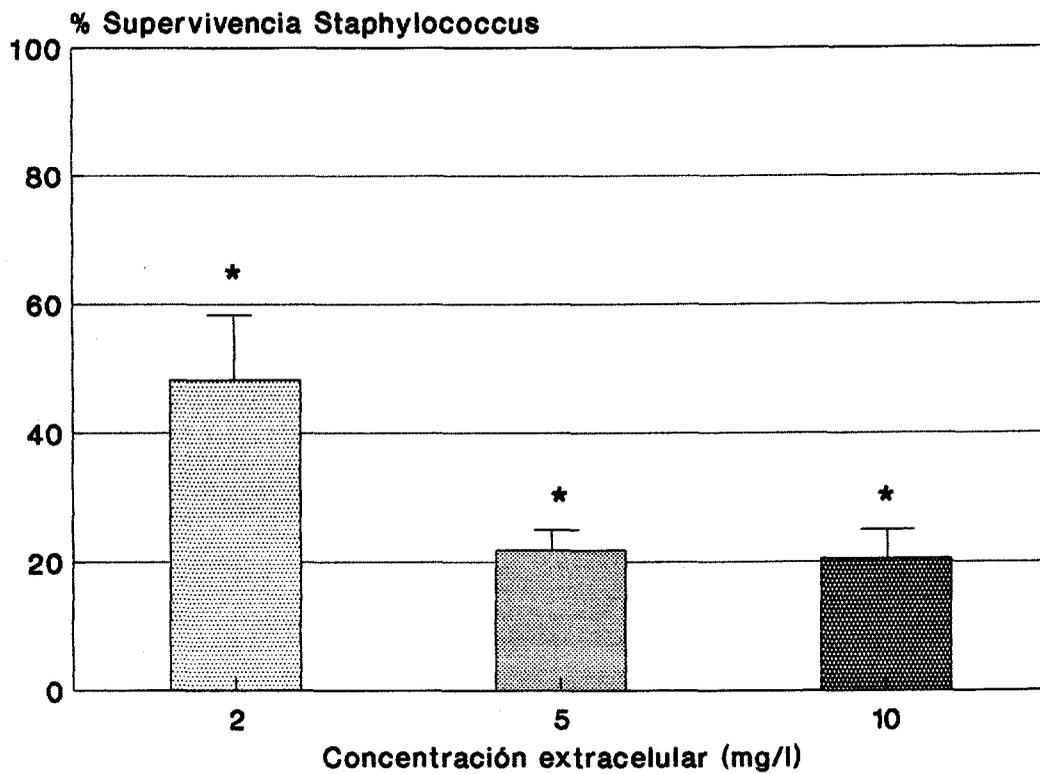


Figura 37. Efecto de ofloxacina en la supervivencia intracelular de *S. aureus* ATCC 25923 en PMN humanos. (n=3). Datos expresados como porcentajes de supervivencia con respecto al control (100% de supervivencia). Las concentraciones extracelulares empleadas fueron 2, 5 y 10 mg/l. \*,  $p \leq 0,05$ .

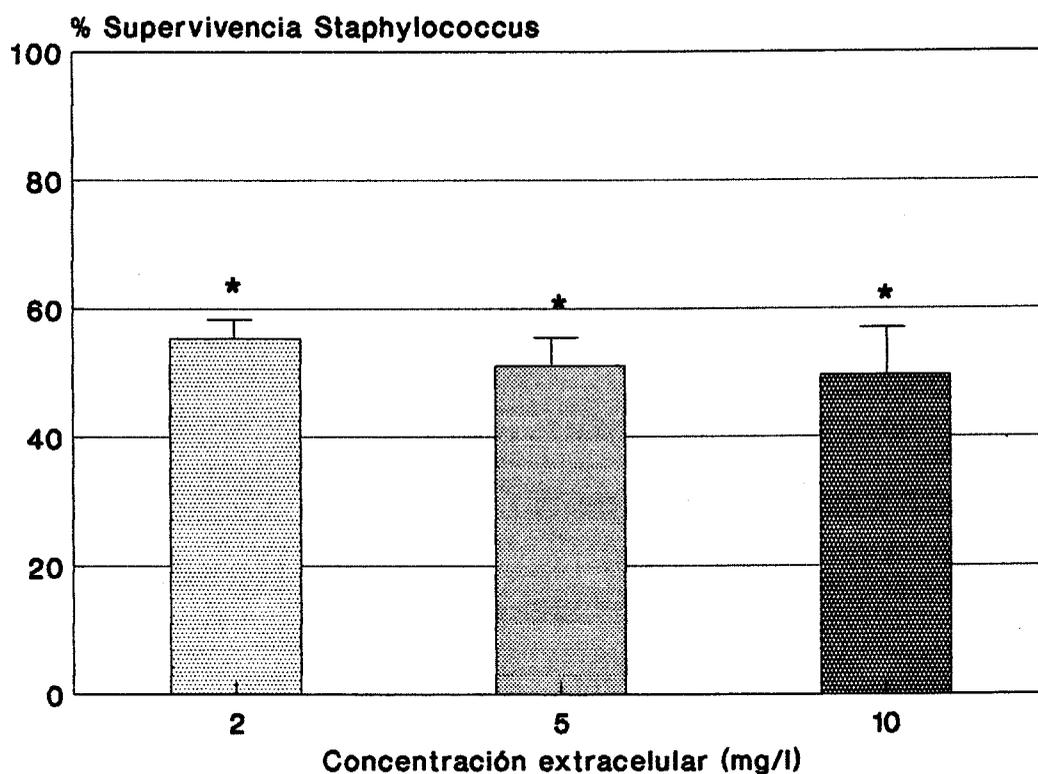


Figura 38. Efecto de levofloxacina en la supervivencia intracelular de *S. aureus* ATCC 25923 en PMN humanos. (n = 3). Datos expresados como porcentajes de supervivencia con respecto al control (100% de supervivencia). Las concentraciones extracelulares empleadas fueron 2, 5 y 10 mg/l. \*,  $p \leq 0,05$ .

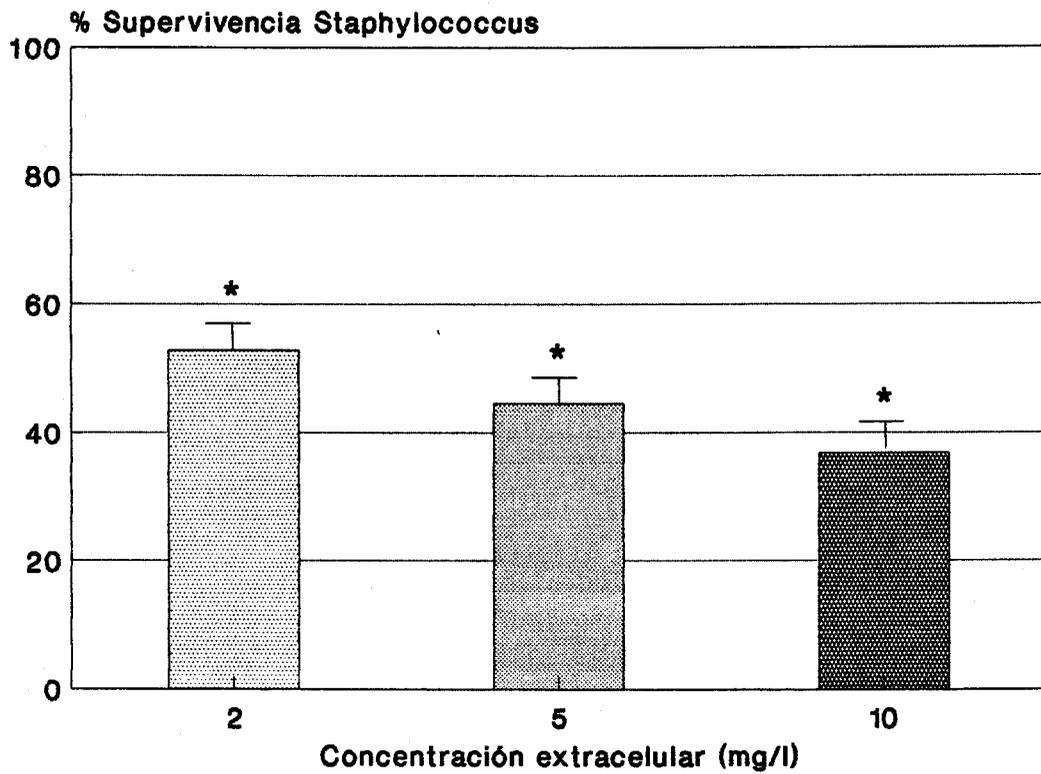


Figura 39. Efecto de fleroxacina en la supervivencia intracelular de *S. aureus* ATCC 25923 en PMN humanos. (n=3). Datos expresados como porcentajes de supervivencia con respecto al control (100% de supervivencia). Las concentraciones extracelulares empleadas fueron 2, 5 y 10 mg/l. \*,  $p \leq 0,05$ .

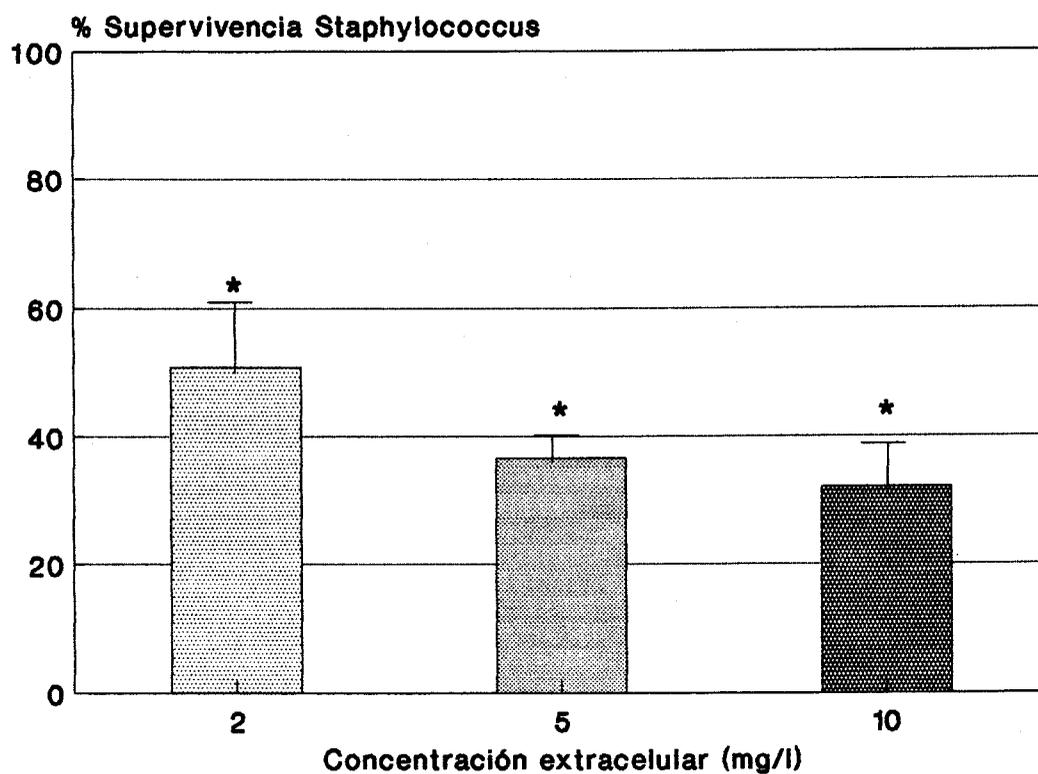


Figura 40. Efecto de lomefloxacin en la supervivencia intracelular de *S. aureus* ATCC 25923 en PMN humanos. (n = 3). Datos expresados como porcentajes de supervivencia con respecto al control (100% de supervivencia). Las concentraciones extracelulares empleadas fueron 2, 5 y 10 mg/l. \*,  $p \leq 0,05$ .

## **VI. DISCUSSION**

Un considerable número de bacterias patógenas son capaces de sobrevivir después de ser ingeridas por las células fagocíticas. Estos microorganismos intracelulares facultativos u obligados, pueden provocar infecciones crónicas por su capacidad de sobrevivir e incluso multiplicarse intracelularmente. El tratamiento de estas infecciones requiere frecuentemente el uso de antimicrobianos que sean capaces de penetrar en el interior de las células fagocíticas, concentrarse y permanecer activos intracelularmente.

El sistema utilizado para evaluar la penetración intracelular de los antimicrobianos, el ensayo fluorométrico, es un método sencillo, y reproducible. Su sensibilidad es similar a la de la radiometría, y presenta una ventaja sobre ésta, evita el uso de antimicrobianos marcados radioactivamente, que son caros y difíciles de obtener, y que pueden también sufrir importantes alteraciones en su actividad y eficacia de marcaje como consecuencia de almacenamientos prolongados<sup>(86)</sup>. Aunque nuestro estudio incluía el uso de radioisótopos para medir el volumen de PMN, esto podría evitarse si, como H. Koga ha propuesto, asumimos un valor fijo de  $2,15 \pm 0,05 \cdot 10^{-6}$  l como volumen intracelular de un número de células fagocíticas previamente establecidas ( $10^7$  PMN humanos)<sup>(43)</sup>. Así mismo, hemos de advertir que el sistema fluorométrico presenta una limitación, sólo puede ser usado para medir moléculas con fluorescencia natural como las fluorquinolonas.

Todas las fluorquinolonas probadas en este estudio se acumulaban en el interior de los PMN, alcanzando altas concentraciones intracelulares, tal y como se ha descrito para otras fluorquinolonas con otras metodologías<sup>(43,44,87-90)</sup>. Con estas técnicas

no es posible determinar si el antimicrobiano se encuentra localizado intracelularmente o bien ligado a membranas. En consecuencia, los valores de concentraciones intracelulares calculados lo que realmente reflejan es la cantidad de antimicrobiano asociado a la célula.<sup>(91)</sup>, si bien es frecuente la utilización indistinta de concentración intracelular o antimicrobiano asociado a la célula.

Los valores de concentraciones intracelulares obtenidos eran entre 4 y 6 veces superiores a los de las concentraciones extracelulares empleadas; valores muy próximos a los obtenidos para otros grupos de antimicrobianos, rifampicina, tetraciclinas y cloranfenicol, pero mucho menores que los obtenidos con los nuevos macrólidos y lincosamidas (20-50 y 3-20 respectivamente).

Los valores de  $C_i/C_e$  eran similares para todas las fluorquinolonas ensayadas, tanto para las monofluoradas, ofloxacina, levofloxacina y norfloxacina, como para las difluoradas, lomefloxacina y fleroxacina. Coincidiendo con los resultados obtenidos por Pascual y Cols<sup>(90)</sup>, podemos concluir que el grado de fluoración de la molécula no influye en la capacidad de penetración de ésta en las células fagocíticas.

La concentración intracelular de estas fluorquinolonas aumentaba conforme lo hacía la concentración extracelular. Esta cinética de penetración revela que el transporte de estas fluorquinolonas no se satura dentro del intervalo de concentraciones extracelulares ensayadas (1 - 25 mg/l).

La penetración intracelular de nuestras fluorquinolonas fue rápida, como rápida fue la liberación de éstas cuando las células

fagocíticas eran transferidas a un medio libre de antimicrobiano. Este dato coincide con el de todas las fluorquinolonas probadas hasta ahora por otros autores<sup>(39,44,93)</sup>.

Al igual que otras quinolonas y en contraste con los macrólidos, la acumulación intracelular de norfloxacin, fleroxacin, lomefloxacin, ofloxacin y levofloxacin aumentaba ligeramente mediante la incubación en un medio ácido.

La penetración de estas fluorquinolonas en los PMN no requiere viabilidad, coincidiendo con estudios realizados con ciprofloxacina, ofloxacin, levofloxacin, DR-3354 y OPC-1716<sup>(44,93)</sup>, aunque sí podemos señalar que es dependiente de la temperatura.

De los datos obtenidos en los ensayos con inhibidores metabólicos tales como cianuro sódico y 2,4, dinitrofenol, ambos inhibidores de la respiración oxidativa mitocondrial, fluoruro sódico, inhibidor de la glucólisis, y carbonil cianuro clorofenol hidrazona, inhibidor del gradiente de protones a través de la membrana, podemos afirmar que la penetración intracelular de estas fluorquinolonas no se afecta por los inhibidores metabólicos.

Pascual y cols.<sup>(44)</sup> encontraron que la penetración intracelular de ofloxacin y su isómero óptico, levofloxacin, era dependiente de la viabilidad celular. Además, esta entrada de las fluorquinolonas en las células era dependiente de energía, pues se afectaba cuando empleaban inhibidores del metabolismo oxidativo del sistema mitocondrial. Es interesante señalar que estas células tienen muy pocas mitocondrias y no dependen del metabolismo oxidativo para la obtención de energía<sup>(68)</sup>.

El hecho de que siga existiendo penetración intracelular de fluorquinolonas en las células muertas conduce a pensar que el mecanismo de transporte implicado no es un transporte activo. De hecho, a diferencia del transporte pasivo que se produce de manera espontánea, el transporte activo debe estar estrechamente acoplado a una fuente de energía metabólica y el uso de sus inhibidores impediría que estos antimicrobianos penetrasen al interior de los PMN. Pero ni el 2,4 DNP ni el NaF son capaces de inhibir el transporte de estos antimicrobianos, si bien, parece ser aparentemente inhibido por NaCN.

Estas discrepancias, ya que tanto el 2,4 DNP como el NaCN actúan inhibiendo la respiración oxidativa de las mitocondrias, nos condujeron a estudiar en profundidad el efecto del NaCN en la penetración de estas fluorquinolonas en los PMNs humanos.

Este aparente efecto inhibitor, pudo ser debido a una interacción entre el NaCN y los PMNs humanos, o bien a una modificación química de las fluorquinolonas por el NaCN.

Para eliminar la probabilidad de un posible efecto citotóxico del NaCN, tras la incubación de las células con este inhibidor, se observaron los PMNs al microscopio con azul tripán, encontrándose un porcentaje de viabilidad celular superior al 95%. No se elimina, sin embargo, la posibilidad de que exista interacción a otro nivel.

Para examinar la posible interacción entre el NaCN y las fluorquinolonas, se analizó el espectro de absorción del NaCN y el espectro de excitación y emisión de las fluorquinolonas, tal y como se

procedió para demostrar que el CN modificaba químicamente el DHA bloqueando la captación de la vitamina C por los PMNs humanos<sup>(94)</sup>. Medimos la fluorescencia (longitud de onda de excitación y emisión) del buffer con fluorquinolonas antes y después de la adición del NaCN.

No parece probable que el NaCN interaccione modificando químicamente a los antimicrobianos usados, puesto que el máximo de absorción, característico de cada molécula, permanece invariable a lo largo del tiempo de incubación. Sin embargo, sí tuvo lugar una modificación de la longitud de onda de emisión que se desplazaba unas 150 unidades en el espectro de luz, lo cual podría interpretarse como un solapamiento de las longitudes de onda de ambas moléculas.

De este modo, si bien puede afirmarse que la inhibición de la penetración de las fluorquinolonas por el CNNa no puede interpretarse como una modificación química de los antibióticos por el NaCN, no puede afirmarse que el descenso en la penetración de estos antimicrobianos se deba a una inhibición del transporte activo.

Dado que el transporte activo puede ser impulsado también por la energía almacenada en los gradientes iónicos y no directamente por la hidrólisis de ATP, un inhibidor del gradiente de  $H^+$  estaría bloqueando el gradiente e impediría el transporte de las fluorquinolonas. Empleamos para ello CCCP, un ionóforo que aumenta la permeabilidad de la bicapa lipídica a los protones en membranas biológicas y artificiales.<sup>(95)</sup> Como consecuencia, el gradiente de protones de la membrana es desacoplado, y la fuerza protón motriz es disipada. Pero la adición al medio de este inhibidor no afecta a la penetración intracelular de estos antimicrobianos.

Apoyándonos en el hecho de que no parece existir requerimiento energético en el transporte de las quinolonas, debemos plantearnos si simplemente penetran al interior de las células difundiendo a través de la bicapa lipídica, o lo hacen a través de proteínas de membranas mediante un proceso denominado transporte pasivo.

Desestimamos la idea de la difusión pasiva a través de la bicapa dado que el elevado tamaño de las fluorquinolonas ( 300 Da aproximadamente) impide su paso a través de la bicapa lipídica.

En cuanto al transporte pasivo, si la molécula transportada carece de carga, tan solo su diferencia de concentración a los lados de la membrana (gradiente de concentración) determina la dirección del transporte. Sin embargo, si el soluto lleva carga neta, su transporte se ve influido tanto por su gradiente de concentración como por su gradiente eléctrico total a través de la membrana. Ambos gradientes constituyen el gradiente electroquímico. De hecho, todas las membranas plasmáticas tienen potenciales eléctricos (gradientes de voltaje) a través de ellos, siendo el interior negativo con respecto al exterior. Este potencial eléctrico actúa facilitando la entrada a las células de iones cargados positivamente, y oponiéndose a la entrada de iones cargados negativamente.

Las fluorquinolonas objeto de nuestro estudio tienen un carácter anfótero. Sus dos pKa obedecen a su grupo carboxilo ( $pK_{a1}$  próximo a 6) y a su grupo amino ( $pK_{a2}$  próximo a 8)<sup>(95,96)</sup>. Los cambios de pH afectarán, por tanto, al estado de estos grupos ionizables, de tal manera que un descenso en el pH conllevaría la aparición de éstos en

sus formas protonadas,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{COOH}$ , confiriéndole a la molécula una carga residual positiva. En este momento, pH ácido, las fluorquinolonas penetran hacia el interior de las células fagocíticas a favor de un gradiente electroquímico, en el que la dirección del transporte se ve favorecido tanto por la diferencia de concentración como por la diferencia de gradiente eléctrico (interior de la célula negativo).

Por este motivo, cuando incubábamos los PMN en un medio preajustado a pH 5, el valor de  $C_i/C_e$  aumentaba en más de dos unidades.

Por el contrario, cuando el medio era preajustado a valores de pH 9, los grupos ionizables quedaban en forma  $\text{NH}_3$  y  $\text{COO}^-$ , confiriéndoles a las fluorquinolonas una carga residual negativa. Esto significa que deben vencer un gradiente eléctrico para penetrar en el interior de los PMN. Obteníamos así valores de  $C_i/C_e$  más bajos que cuando empleábamos un medio preajustado a pH 7.

Admitiendo el hecho de que exista un transporte pasivo involucrado en la penetración intracelular de las fluorquinolonas, pero sin descartar la posibilidad de que intervenga también un mecanismo activo, nos queda la alternativa de que estos antimicrobianos atraviesen la membrana por simple difusión a través de canales formados por las proteínas (transporte mediado por canal) o bien que se unan a proteínas transportadoras que transfieren al soluto a través de la membrana en un proceso de difusión facilitada por proteínas.

El análisis cinético<sup>(67,68,71)</sup> de la penetración de estas fluorquinolonas parece indicar que se trata de una difusión mediada

por proteínas de canal, pues, para todas las concentraciones extracelulares ensayadas, la velocidad del transporte (solute transportado por unidad de tiempo) es siempre proporcional a la concentración de las quinolonas transportadas. Por el contrario, en el caso de difusión mediada por proteínas, la velocidad del transporte no aumenta conforme lo hace la concentración extracelular, sino que alcanza un máximo, saturándose cuando la proteína transportadora tiene todos sus centros de unión para el transporte ocupados.

Puede ocurrir, sin embargo, que se trate de una difusión facilitada por proteínas; y que el estudio de su cinética no muestre una saturación en el transporte porque las concentraciones extracelulares ensayadas no hayan sido lo suficientemente elevadas como para saturar a las proteínas transportadoras. De hecho, si se tratase de un transportador fijo, proteínas de canal, cuando bajamos la temperatura hasta 4°C, debería seguir existiendo penetración de fluorquinolonas; y esto no ocurre. Los datos muestran que cuando descendemos la temperatura hasta 4°C, las fluorquinolonas dejan de penetrar; parece tratarse de un transporte mediado por proteínas, transportador móvil, que queda atrapado en la bicapa lipídica cuando trabajamos a 4°C y el transporte se detiene.

De los datos obtenidos en este estudio se concluye que en la penetración intracelular de las fluorquinolonas está involucrado un mecanismo pasivo, si bien no se excluye la posibilidad de que intervengan otros mecanismos adicionales. Si se realiza o no a través de proteínas móviles o formadoras de canal, es un tema que requiere estudios posteriores.

La entrada en los fagocitos es un proceso esencial, aunque ciertamente no el único que determina la actividad del antimicrobiano contra los microorganismos intracelulares. El efecto intrafagocítico del antibiótico está intracelularmente influenciado por múltiples factores. Estos factores podrían incluir:

1. La entrada y localización intracelular adecuada del antimicrobiano.
2. Las propiedades antibacterianas del antibiótico (mecanismos de acción y tipo de actividad).
3. Efecto del ambiente intracelular sobre la actividad biológica del antibiótico y sensibilidad del microorganismo.
4. Efecto del antimicrobiano sobre la función celular (sistemas microbicidas, fagocitosis...).

Como se ha expuesto anteriormente, los antimicrobianos pueden interaccionar con las células fagocíticas fundamentalmente de dos formas: indirectamente, determinando modificaciones en los microorganismos que hagan que el comportamiento de los PMN frente a los mismos sea distinto o, directamente actuando sobre las funciones de estas células.

Un factor potencialmente importante podría ser la capacidad intrínseca de estos antibióticos para aumentar significativamente la actividad bactericida, dependiente de oxígeno, de los PMNs.

Los mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno, resultan de gran importancia en la destrucción de *S. aureus* por parte de los leucocitos PMN, como ha quedado demostrado en los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica. Los PMN de estos enfermos presentan deficiencia en la cadena oxidativa, siendo incapaces de destruir a estos microorganismos una vez que los han ingerido y la traducción clínica de este defecto es el padecimiento de infecciones recidivantes, en las que *Staphylococcus aureus* juega un papel protagonista<sup>(4,5,11)</sup>.

Los mecanismos oxidativos se pueden medir de varias maneras. Así, la actuación de los neutrófilos se asocia a la generación de energía luminosa. Este fenómeno de emisión de luz, conocido con el nombre de quimioluminiscencia, es consecuencia de la generación de radicales tóxicos de oxígeno que se produce en la explosión respiratoria. Esta respuesta puede ser amplificada y medida mediante la adición de un compuesto, el luminol que emite una luz muy intensa tras ser oxidado por la acción de los metabolitos tóxicos del oxígeno. Los ensayos de quimioluminiscencia son muy difíciles de estandarizar y pueden conducir a la obtención de resultados erróneos<sup>(53,97)</sup>.

Otra forma de evaluar la explosión respiratoria de las células fagocíticas consiste en medir la producción de aniones superóxido y de peróxido de hidrógeno por dichas células tras ser estimuladas. Entre los distintos métodos descritos en la literatura, elegimos los microensayos descritos por Pick y Mizel<sup>(84)</sup>, con pequeñas modificaciones, por ser técnicas muy sensibles y reproducibles, necesitar muy pequeñas cantidades de reactivos y células, y permitir la realización de un gran número de muestras en paralelo. Con estas

técnicas hemos evaluado la influencia directa de los antimicrobianos objeto de nuestro estudio sobre los mecanismos bactericidas oxidativos de los leucocitos PMN, tras exponer las células durante 30 minutos a diferentes concentraciones de los mismos.

Ya se han realizado estudios similares, empleando la misma metodología, para documentar la posible sinergia entre agentes antimicrobianos y actividad bactericida de las células fagocíticas. Un elevado número de los antimicrobianos probados (cefalosporinas: cefotaxima y cefodizima) tenían pocos efectos sobre la explosión respiratoria oxidativa en los PMNs<sup>(19)</sup>.

Un estudio en profundidad de un grupo de fármacos antibacterianos, con un mecanismo de acción bien establecido, macrólidos<sup>(98,99)</sup>, no ha sido suficiente para esclarecer el mecanismo de esta sinergia. Eritromicina y josamicina no alteraron significativamente el mecanismo oxidativo a concentraciones en las cuales se obtuvo un incremento en la destrucción bacteriana por los PMNs. De esta forma, la actividad bactericida incrementada de estos PMN, in vitro, podría estar relacionada con concentraciones intracelulares de este antimicrobiano dentro del fagolisosoma, donde por un efecto aún desconocido, potencia la destrucción bacteriana.

Por el contrario, roxitromicina, otro antimicrobiano del grupo de los macrólidos, fue el único en afectar significativamente la respuesta oxidativa de los PMN.

Con otro antimicrobiano, clindamicina, observaron que a pesar de que se concentra bien en todas las células fagocíticas, tiene un

efecto reducido sobre la supervivencia de *S. aureus*. Encontraron como factor responsable la incapacidad intrínseca de este antibiótico bacteriostático para destruir al microorganismo. Sin embargo, las concentraciones intracelulares de clindamicina excedían siempre la CMB para la cepa de *S. aureus* que empleaban. De hecho, demostraron que clindamicina, en concentraciones terapéuticas, inhibe la generación de superóxido y peróxido de hidrógeno por las células fagocíticas.

Así, los dos antimicrobianos que logran mayor concentración intracelular, clindamicina y roxitromicina, demuestran ser moduladores del metabolismo oxidativo en estas células. El mecanismo preciso de este efecto está aún por dilucidar.

Estudios realizados sobre la activación del metabolismo leucocitario midiendo la quimioluminiscencia<sup>(100)</sup> concluyeron que la adición de ofloxacina a PMN estimulados con PMA provocaba un aumento de la producción de radicales tóxicos en la explosión oxidativa por parte de las células fagocíticas.

Nosotros encontramos, sin embargo, que las concentraciones evaluadas de norfloxacin, fleroxacin, ofloxacina, lomefloxacin y levofloxacin (2, 5 y 10 mg/l), no influyeron en la producción de superóxido y peróxido de hidrógeno por los PMNs humanos estimulados. Los valores correspondientes a la generación de peróxido de hidrógeno y superóxido, obtenidos con las distintas concentraciones de antimicrobianos, eran similares a los obtenidos en los ensayos controles (con PMNs estimulados pero sin fluorquinolonas).

En este sentido, podemos afirmar que no existe efecto modulador del metabolismo oxidativo, ejercido por las fluorquinolonas, en los PMNs. Al igual que para otros antibióticos estudiados, no existe alteración del mecanismo oxidativo a las concentraciones en las cuales se obtuvo un aumento en la destrucción de bacterias por los PMNs<sup>(101)</sup>.

El efecto modulador de los antimicrobianos sobre la explosión oxidativa en los fagocitos es de gran interés y, sin embargo, no es aún evaluado de una manera sistemática. Es obvio que estas interacciones célula fagocítica-antimicrobiano pueden tener claras implicaciones clínicas.

El hecho de que algunos antimicrobianos ejerzan un efecto inhibitorio en la producción de radicales tóxicos del oxígeno por las células fagocíticas se podría interpretar en primera instancia como un efecto adverso. Sin embargo, algunos autores consideran que, en determinadas circunstancias, esta característica podría suponer una propiedad ventajosa, pues no se debe olvidar que los productos del metabolismo oxidativo, aunque tiene propiedades antimicrobianas importantes, son liberados al medio extracelular, y al actuar de forma indiscriminada, pueden resultar tóxicos, causando lesiones celulares y tisulares<sup>(57,102,103)</sup>. Se ha demostrado que la activación de la respuesta oxidativa puede comprometer al huésped, pues presenta un riesgo potencial de inhibición por un mecanismo autooxidativo de las funciones de los neutrófilos.<sup>(104)</sup>

Así pues, el efecto inhibitorio ejercido por algunos antimicrobianos sobre el metabolismo oxidativo de los fagocitos podría ser considerado como beneficioso, siempre y cuando no interfieran en

la capacidad de los neutrófilos para destruir a los microorganismos que han ingerido.

La actividad intrafagocítica de los antimicrobianos es un importante factor que contribuye a la muerte intracelular de los patógenos que sobreviven en el interior de las células fagocíticas. *S. aureus*, bajo ciertas circunstancias es capaz de sobrevivir en el interior de los fagocitos, siendo este hecho una importante causa de infecciones estafilocócicas persistentes <sup>(105)</sup>.

Los estudios de penetración de los antimicrobianos en las células fagocíticas podrían considerarse como una forma de evaluar la efectividad de los mismos frente a patógenos intracelulares. Como ya hemos visto anteriormente, ciertos antimicrobianos como los betalactámicos y los aminoglicósidos, presentan muy escasa penetración en los PMN ( $C/E < 1$ ). Los antibióticos liposolubles como rifampicina y cloramfenicol son capaces de difundir al interior de los fagocitos, presentando cocientes de concentración  $C/E = 2-5$ . Compuestos menos liposolubles como macrólidos, lincosamidas y quinolonas, objeto de nuestro estudio, alcanzan concentraciones intracelulares de  $C/E = 4-50$  <sup>(39,106)</sup>.

Aunque pueda parecer obvio que para que un antimicrobiano resulte activo frente a un patógenos intracelular debe ser capaz de penetrar en el interior de las células, no siempre existe correlación entre penetración y actividad intracelular <sup>(107)</sup>. Así, por ejemplo, se ha observado que antibióticos como clindamicina y eritromicina, capaces de alcanzar muy elevadas concentraciones en el interior de los fagocitos, se muestran sin embargo inefectivos en la destrucción de

*S. aureus* intrafagocítico<sup>(33,108)</sup>, en tanto que rifampicina, que alcanza concentraciones intracelulares menores, resulta muy eficaz en la destrucción de este patógeno<sup>(33)</sup>.

Por otra parte, los experimentos de Hand y King-Thompson con gentamicina<sup>(33)</sup>, y de Van den Broek y cols. con benzilpenicilina<sup>(109)</sup>, ponen de manifiesto cómo dos antimicrobianos con escasa capacidad de penetrar en el interior de los PMN, son sin embargo efectivos en la erradicación de *S. aureus* intracelular. Así pues, para conocer la capacidad de los antimicrobianos de actuar sobre microorganismos intracelulares, los estudios de penetración intracelular no resultan adecuados si no se completan con estudios de muerte intracelular.

La actividad intracelular de los antimicrobianos se ha estudiado utilizando diferentes técnicas: todas ellas miden el número de bacterias viables en el interior de las células fagocíticas después de su exposición a la acción del antimicrobiano. Una dificultad común a todas las técnicas de medida de actividad intracelular es la eliminación de las bacterias no fagocitadas que se encuentran en el medio extracelular y adheridas a la superficie externa de la célula fagocítica.

Por lo tanto, una cuestión muy importante a tener en cuenta en la realización del método es asegurar que cuando se añade el antimicrobiano, la localización de las bacterias sea intracelular, y que el número de bacterias extracelulares sea despreciable, pues en el caso contrario, la reducción en el número de u.f.c. podría interpretarse erróneamente como índice de actividad intracelular, debiéndose sin embargo a la acción del antimicrobiano sobre las bacterias de localización extracelular. Algunos autores eliminan *S. aureus* en su

localización extracelular mediante la incubación de las células con lisostafina, antes de añadir el agente antimicrobiano, pero se sabe que la lisostafina es capaz de unirse irreversiblemente a los granulocitos y monocitos, y esta lisostafina unida a las células, no sólo retiene su potencia microbicida, sino que también penetra a través de la pared celular de ambos tipos celulares a 37°C<sup>(109)</sup>.

La eliminación de las bacterias extracelulares se puede conseguir también mediante ciclos de lavado con centrifugación diferencial. Este procedimiento se ha mostrado eficaz para eliminar las bacterias que se encuentran adheridas a las superficie externa de las células fagocíticas, haciendo innecesario el uso de lisostafina<sup>(109)</sup>.

El sistema microbiológico utilizado para evaluar la actividad intracelular de los antimicrobianos incluidos en este estudio frente a *S. aureus* presenta una serie de limitaciones que deberían ser señaladas. Por una parte, es un método que sería capaz de poner de manifiesto la actividad bactericida de los agentes antimicrobianos, y no su posible efecto bacteriostático, puesto que lo que determina es la reducción en el número de unidades formadoras de colonias (u.f.c.) como indicador de actividad<sup>(57)</sup>. La reducción en el número de unidades formadoras de colonias puede deberse, además de a la actividad intracelular de los antimicrobianos, a la formación de agregados de varios microorganismos viables como resultado de su exposición a los PMN, siendo ésta una eventualidad difícil de excluir, a pesar de todas las precauciones que se tomen a la hora de realizar el ensayo<sup>(110)</sup>. Por eso es necesario realizar los experimentos al menos por duplicado y repetidas veces para poder evaluar los resultados obtenidos<sup>(111)</sup>.

Como hemos anticipado anteriormente, la actividad de los antimicrobianos frente a bacterias intracelulares se ha examinado con una gran cantidad de modelos, tanto in vitro como in vivo, con resultados diferentes debido a la falta de uniformidad en dicha metodología. Van den Broek<sup>(112)</sup> ha publicado una revisión y comentado las dificultades en comparar los datos obtenidos por los distintos grupos de investigación. Las variables que deben ser tenidas en cuenta cuidadosamente son:

- Duración del tiempo de incubación
- Concentración extracelular del antimicrobiano
- Tipo de microorganismo patógeno (incluyendo su localización subcelular)., y
- Efecto del antimicrobiano sobre la capacidad bactericida del huésped.

De manera general se puede decir que los betalactámicos no ofrecen actividad intracelular al no concentrarse en las células fagocíticas<sup>(113)</sup>. Imipenem es el único betalactámico que se acumula y tiene actividad en el interior de macrófagos y PMN. Sin embargo, los aminoglicósidos que se concentran escasamente en el interior de las células muestran una discreta actividad intracelular. El hecho de que sistemáticamente se hayan obtenido resultados negativos con los aminoglicósidos puede estar justificado por el corto período de estos ensayos y en la lenta penetración de este antimicrobiano, si bien en experimentos de larga duración o en el caso de altas concentraciones extracelulares, los aminoglicósidos llegan a ser efectivos en bacterias sensibles<sup>(40)</sup>.

Los macrólidos han demostrado ser efectivos contra patógenos intracelulares obligados como *Legionella sp.*<sup>(114)</sup>. Su actividad se ha relacionado con su capacidad para entrar en las células fagocíticas y no sufrir alteraciones de sus propiedades antibacterianas por el ambiente intracelular. No obstante, frente a determinados microorganismos sensibles, sólo son activos a elevadas concentraciones, pudiendo ser debido a que se localicen en el fagolisosoma cuyo ambiente es muy ácido<sup>(113)</sup>. Algo similar ocurre con tetraciclinas y clindamicina, antibióticos que se concentran en las células fagocíticas y permanecen activos en el citoplasma pero no en el fagosoma, lugar donde se encuentran localizadas la mayoría de las bacterias intracelulares, debido al pH ácido del mismo. Esto explicaría el hecho de que estos antimicrobianos sean activos frente a bacterias intracelulares que impiden la fusión fagosoma-lisosoma o evitan la acidificación y no muestran actividad frente a otros como *S. aureus* por ejemplo, por no presentar estas características<sup>(32,113)</sup>.

Comparado con todos los antimicrobianos discutidos hasta ahora, rifampicina penetra y se acumula en el interior de las células fagocíticas, tanto en PMN como en macrófagos, mostrándose eficaz contra todas las bacterias intracelulares sensibles<sup>(112,60)</sup>, siendo el antimicrobiano que se utiliza como referencia o estándar en los estudios de actividad intracelular. La eficacia de la rifampicina no es resultado de una mayor acumulación de este antibiótico comparado con el resto. La hipótesis más aceptada es que la actividad de rifampicina es de alguna manera aumentada por las condiciones intracelulares fisico-químicas reinantes en el lugar de la infección<sup>(40)</sup>.

En nuestros estudios, todas las fluorquinolonas ensayadas mostraron una buena penetración y actividad intracelular en PMNs contra *S. aureus*, similar a la descrita para otras quinolonas frente a bacterias distintas e incluso frente a *S. aureus*<sup>(42,115,116)</sup>. Cada una de las fluorquinolonas ensayadas se mostraba más eficiente reduciendo la supervivencia de *S. aureus* conforme aumentaba la concentración extracelular del antimicrobiano. Esto indica que la actividad bactericida de las fluorquinolonas contra *S. aureus* está relacionada con la concentración extracelular, y por consiguiente intrafagocítica, del antimicrobiano. Conforme aumentamos la concentración extracelular de las fluorquinolonas, disminuye la supervivencia de la bacteria intrafagocítica.

El efecto de inhibición de la supervivencia de *S. aureus* mostrado por las distintas fluorquinolonas evaluadas tiene la siguiente magnitud en orden descendiente:

Oflox. > flerox. > levoflox. = norflox. = lomeflox.

coincidiendo, prácticamente, con el orden de magnitud de sus CMI o CMB. Esto nos estaría indicando que la eficacia mostrada por cada una de ellas en reducir la supervivencia de *S. aureus* está justificada por su potencia bactericida intrínseca frente a tal microorganismo. Así mismo, la actividad mostrada frente a *S. aureus* deberá estar relacionada con su capacidad para penetrar en las células fagocíticas y no sufrir alteraciones de sus propiedades antibacterianas en el ambiente intracelular existente.

En resumen, todas las quinolonas analizadas se concentran en el interior de los PMN humanos y son activas intracelularmente, lo cual supone una ventaja adicional para su uso clínico, particularmente en infecciones producidas por patógenos intracelulares o aquellas acontecidas en pacientes inmunodeprimidos.

## **VII. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. Las fluorquinolonas evaluadas alcanzan concentraciones intracelulares en los PMN humanos de 3 a 5 veces superiores a las extracelulares, sin que existan diferencias significativas entre ellas.
2. La penetración intracelular de las fluorquinolonas evaluadas no depende del grado de fluoración de la molécula.
3. La penetración intracelular de las fluorquinolonas es rápida y no saturable; su liberación al exterior de la célula es igualmente rápida en ausencia de antimicrobiano extracelular.
4. La concentración intracelular de las fluorquinolonas en PMN humanos depende de la temperatura, pero no de la viabilidad celular.
5. La penetración intracelular de las quinolonas evaluadas aumenta ligeramente a pH ácido y disminuye significativamente a pH básico.
6. De los inhibidores metabólicos evaluados, sólo el cianuro sódico disminuye significativamente la penetración intracelular de las quinolonas.

7. De los datos obtenidos en este estudio, se concluye que en la penetración intracelular de las fluorquinolonas está involucrado un mecanismo pasivo, si bien no se excluye la posibilidad de otros mecanismos adicionales.
8. El ensayo fluorométrico es un método sencillo, sensible y reproducible para estudiar las concentraciones intracelulares de las fluorquinolonas en las células fagocíticas.
9. Ninguna de las fluorquinolonas evaluadas afectó la producción de peróxido de hidrógeno y radicales superóxidos por los PMN humanos.
10. A concentraciones celulares terapéuticas, todas las quinolonas evaluadas excepto norfloxacin, 2mg/l, mostraron actividad intracelular significativa frente a *S. aureus* en PMN humanos.
11. En resumen, todas las fluorquinolonas evaluadas penetran en el interior de los PMN y permanecen activas frente a *S. aureus*.

## **VIII. BIBLIOGRAFIA**

## VIII. BIBLIOGRAFIA

01. **Klebanoff, S.J., Clark, R.A.** The neutrofil: function and clinical disorders. North Holland Publishing, Amsterdam. (1978).
02. **Wade, B.H., Mandell, G.L.** Polymophonuclear Leukocytes: dedicated professional phagocytes. *Am.J.Med.* 74: 686-693. (1983).
03. **Amich, S., Salve, M.L., Prieto, S.** Inmunología. Interamericana McGraw-Hill. Madrid, 1994.
04. **Lehrer, R.I., Ganz, T., Selsted, M.E., Babior, B.M., Curnette, J.T.** Neutrophils and Host Defense. *Annals of Internal Medicine.* 109: 127-142. (1988).
05. **Sawyer, D.W., Donowitz, G.R., Mandell, G.L.** Polymorphonuclear neutrophils: an effective antimicrobial force. *Rev.Infect.Dis.* 11 (supl. 7): 1532-1544. (1989).
06. **Babior, B.M.** Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N.Engl.J.Med.* 298: 659-668, 721-725. (1978).
07. **Root, R.K., Cohen, M.S.** The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev.Infect.Dis.* 3: 365-398. (1981).

08. **Thomas, E.L., Grisham, M.B., Jefferson, M.M.** Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils. *J.Clin.Invest.* 72: 441-454. (1983).
09. **Tauber, A.I., Babior, B.M.** Evidence for hidroxyl radical production by human neutrophils. *J.Clin.Invest.* 60: 374-379. (1977).
10. **Biemond, P., Van Eijk, H.G., Swaak, A.J., Koster, J.F.** Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes: possible mechanism in inflamation diseases. *J.Clin.Invest.* 73: 1576-1579. (1984).
11. **Clark, R.A.** The human neutrophil respiratory burst oxidase. *J.Infect.Dis.* 161: 1140-1147. (1990).
12. **Hauser, W.E., Remington, J.S.** Acción de los antibióticos sobre la respuesta inmunitaria. *Am.J.Med.* 72: 711-716. (1982).
13. **Daschner, F.D.** Antibiotics and host defence with special reference to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *J.Antimicrob.Chemother.* 16: 135-141. (1985).
14. **Peterson, P.K.** How antibiotics augment host defenses. *Eur.J.Clin.Microbiol.* 1: 335-337. (1982).
15. **Mandell, L.A.** Effects of antimicrobial and antineoplastic drugs on the phagacytic and microbicidal function of the polymorphonuclear leukocyte. *Rev.Infect.Dis.* 4: 683-697. (1982).

16. **Pruul, H. and Mc Donald, P.J.** Lomefloxacin-induced modification of the kinetics of growth of gram-negative bacteria and susceptibility to phagocytic killing by human neutrophils. *J.Antimicrob.Chemother.* 25: 91-101. (1990).
17. **Furet, Y.X. and Pechère, J.C.** Usual and un usual antibacterial effects of quinolones. *J.Antimicrob.Chemother.* 26(Supl.B): 7-15. (1990).
18. **Van den Broek, P.J.** Activity of Antibiotics against microorganisms ingested by mononuclear phagocytes. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 10: 114-118. (1991).
19. **Labro, M.T. and El Benna, J.** Effects of Anti-Infections agents on Polymorphonuclear Neutrophils. *Eur.J.Clin.Microb.Infect.Dis.* 10: 124-131. (1991).
20. **Labro, M.T. and El Benna, J.** Synergistic bactericidal interaction of josamycin with human neutrophils in vitro. *J.Antimicrob.Chemother.* 26: 515-524. (1990).
21. **Gemmell, C.G.** Potentiation of phagocytosis of pathogenic bacteria by exposure to low concentrations of antibiotics. *J.Antimicrob.Chemother.* 13: 407-409. (1984).
22. **Lorian, V.** Low concentrations of antibiotics. *J.Antimicrob.Chemother.* 15 (supp. A): 15-26. (1985).
23. **Lorian, V., Atkinson, B.** Abnormal forms of bacteria produced by antibiotics. *Am.J.Clin.Pathol.* 64: 678-688. (1975).

24. **Lorian, V.** Some effect of subinhibitory concentrations of penicillin on the structure and division of staphilococci. *Antimicrob.Agents Chemother.* 7: 864-870. (1975).
25. **Mc Donald, P.J., Wetheral, B.L. Pruul, H.** Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. *Rev.Infect.Dis.* 3: 38-44. (1981).
26. **Labro, M.T., Pochet, I., Babin-Chevaye, C., Hakin, J.** Effect of ceftriaxone-induced alterations of bacteria on neutrophil bactericidal function. *J.Antimicrob.Chemother.* 20: 857-869. (1987).
27. **Adinolfi, L.E., Bonventre, P.F.** Enhanced phagocytosis, killing, and serum sensitivity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* treated with sub-MICs of imipem. *Antimicrob.Agents Chemother.* 32: 1012-1018. (1988).
28. **Labro, M.T. and El Benna, J.** Comparison on cefodizime with various cephalosporins for their indirect effect on the human neutrophil oxidative burst in vitro. *J.Antimicrob. Chemother.* 26 (suppl. C): 49-57. (1990).
29. **Milatovic, D.** Influence of subinhibitory concentrations of antibiotics on opsonization and phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur.J.Clin.Microbiol.* 3: 288-293. (1984).

30. **Milatovic, D., Braveny, I., Verhoef, J.** Clindamycin enhances opsonization of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 413-417. (1983).
31. **Pruul, H., Wetherall, B., McDonald, P.** *In vitro* Killing of erythromycin-exposed group A Streptococci by polymorphonuclear leukocytes. *Eur.J.Clin.Microbiol.* 5: 405-410. (1986).
32. **Pechère, J.C.** Phagocytes, Antibiotics and Intracellular Parasites: are the Experimental data clinically relevant?. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 10: 97-99. (1991).
33. **Hand, W.L. and King-Thompson, N.L.** Contrast between phagocyte antibiotic uptake and subsequent intracellular bactericidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 135-140. (1986).
34. **Milatovic, D.** Antibiotics and phagocytosis. *Eur.J.Clin.Microbiol.* 2: 414-425. (1983).
35. **Duncker, D., Ullman, U.** Influence of various antimicrobial agents on the chemiluminescence of phagocytosing human granulocytes. *Chemotherapy* 32: 18-24. (1986).
36. **Labro, M.T., Babin-Chevaye, C. and Hakin, J.** Effects of cefotaxime and cefodizime on human granulocyte functions in vitro. *J.Antimicrob.Chemother.* 18: 233-237. (1986).

37. Labro, M.T., Amit, N., Babin-Chevaye, C. and Hakin, J. Cefodizime (HR-221) potentiation of human neutrophil oxygen-independent bactericidal activity. *J.Antimicrob.Chemother.* 19: 331-341. (1987).
38. Carlier, M.B., Zenebergh, A. and Tulkens, P.M. Cellular uptake and subcellular distribution of rosiromycin and erythromycin in phagocytes cells. *J.Antimicrob.Chemother.* 20 (Sup.B):47-56. (1987).
39. Lee Hand, W. Antibiotics and phagocytic cells. *The Antimicrobic newsletter.* 5: 53-60. (1988).
40. Tulkens, P.M. Intracellular distribution and activity of antibiotics. *Eur. J. Clin. Microb. Inf. Dis.* 100-106. (1991).
41. Klempner, M.S. and Styrt, B. Clindamycin uptake by human neutrophils. *J. Infect. Dis.* 144: 472-479. (1981).
42. Easmon, C.S.F., Crane, J.P. and Blower, S.A. Effect of ciprofloxacin intracellular organisms: in vitro and in vivo studies. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 (Sup.D):43-48, (1986).
43. Koga, H. High-performance liquid chromatography measurement of antimicrobial concentrations in polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob.Agents Chemother.* 31: 1904-1908. (1987).

44. Pascual, A., García, I. and Perea, E.J. Fluorometric measurement of ofloxacin uptake by human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 635-656. (1989).
45. Milatovic, D. Antibiotics and Phagocytosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2: 414-425. (1983).
46. Hand, W.L., Boozer, R.M., and King-Thompson, N.V. Antibiotic uptake by alveolar macrophages of smokers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 42-45. (1985).
47. Bonventre, P.F. and Imhoff, J.G. Uptake of H-dihydrostreptomycin by macrophages in culture. *Infections and Immunity.* 2: 86-93. (1970).
48. Tulkens, P.M. and Trouet, A. The uptake and intracellular accumulation of aminoglycoside antibiotics in lysosomes of cultured fibroblast. *Biochemical Pharmacology.* 27: 415-424. (1978).
49. Aubert-Tulkens, G., Van Hoof, F., and Tulkens, P.M. Gentamicin induced lysosomal phospholipidosis in cultured rat fibroblasts. *Laboratory Investigation.* 40: 481-493. (1979).
50. Renard, C., Vanderhaedghe, H.G., Claes, P.J., Zenebergh, A and Tulkens, P.M. Influence of conversion of penicillin G into a basic derivate on its accumulation and subcellular localization in cultured macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 410-416. (1987).

51. Hand, W.L., Corwin, R.W., Steinberg, T.M., Grossman, G.D.; Uptake of antibiotics by human alveolar macrophages. *Am.Rev.Resp.Dis.* 192: 933-937, (1984).
52. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, 1986.
53. Van der Auwera, P. In vitro test of the functions of phagocytic cells and their interaction with antimicrobial agents: a critical view. *J.Antimicrob.Chemother.* 26: 168-173. (1990).
54. Horwitz, M.A. The legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophyla*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J.Exp.Med.* 158: 2108-2126
55. Horwitz, M.A. and Maxfield, F.R. *Legionella pneumophyla* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *Journal of Cellular Biology.* 99: 1936-1943.
56. Peterson, P.K., Verhoef, J., Scheting, D., Quie, P.G. Kinetics of phagocytosis and bacterial killing by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Inect. Dis.* 136: 502-509. (1977).
57. Anderson, R., Jorone, G., Van Rensburg, C.E.J. An in vitro investigation of the intracellular bioactivity of amoxicillin, clindamycin and erythromycin for *Staphylococcus aureus*. *J.Infect.Dis.* 153: 593-600. (1986).

58. **Smith, D.L., Rommel, F.** A rapid micro method for the simultaneous determination of phagocytic-microbicidal activity of human peripheral blood leukocytes in vitro. *J. Immunol. Methods.* 17:241-247. (1977).
59. **Vosbeck, K., James., P.R., Zimmerman, W.** Antibiotic action on phagocytosed bacteria measured by a new method for determining viable bacteria. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 25:735-741. (1984).
60. **Sánchez, M.S., Ford, C.W., Yancey, R.J.** Evaluation of antibacterial agents in hig-volumen bovine polymorphonuclear neutrophil *Staphylococcus aureus* intracellular killing assay. *Antimicrobi. Agents Chemother.* 29:634-638. (1986).
61. **Tulkens, P.M. and Trouet, A.** The uptake and intracellular accumulation of aminoglycoside antibiotics in lysosomes of cultures fibroblasts. *Biochemical Pharmacology.* 27: 415-424. (1978).
62. **Simon, C. Stille, W., Perea, E.J.** Manual de terapéutica antimicrobiana. Salvat. Barcelona, 1987.
63. **Desplaces, N., Gutman, L., Carlet,J., Guibert, J. and Acar, F.** The new quinolones and their combinations with other agents for therapy of severe infections. *J.Antimicrob.Chemother.* 17, Suppl. A, 25-39. (1986).

64. Hooper, D.C., M.D., and Wolfson, J.S., M.D., PH.D. Fluorquinolone antimicrobial Agents. *N.Eng.J.Med.* 324: 384-394. (1991).
65. Hooper, D.C., Woffson, J.S. Mode of action of the new quinolones: new data. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 10:223-231. (1991).
66. Percival, A. Impact of chemical stucture on quinolone potency, spectrum and side effects. *J.Antimicrob.Chemother.* 28(Supl.C): 1-8. (1991).
67. Hand, W.L., King-Thompson, N.L., Holman, J.W.: Entry of roxithromycin (RV.965), imipenem, cefotaxime, thimethoprim and metronidazole into human PMN. *Antimicrob.Agents Chemother.* 31: 1553-1557. (1987).
68. Hand, W.L., King-Thompson, N.L.: Membrane transport of clindamycin in alveolar macrophages. *Antimicrob.Agents Chemother.* 21: 241-247. (1982).
69. Chopra, I. Penetration of antibiotics to their target sites. *J.Antimicrob.Chemother.* 26: 607-611. (1990).
70. Ishiguro, M., Koga, M., Kohno, S., Hayashi, T., Yamaguchi, K. and Hirota, M. Penetration of macrolides into human PMN leucocytes. *J.Antimicrob.Chemother.* 24: 719-729. (1989).
71. Prokesch, R.C., Hand, W.L.: Antibiotic entry into human PMN. *Antimicrob.Agents Chemother.* 21: 373-380. (1982).

72. **Rubinstein, E. and Carbon, C.:** The fluorquinolones reapraisal. Intern.J.Antimicrob.Agents. 1: 147-152. (1992).
73. **Daniel, T.W., Chu and Prabhavathi B. Fernandes.** Minireview. Structure-Activity relationship of the Florquinolones. Antimicrob.Agents Chemother. 11 (Supl.7): 131-135. (1989).
74. **Klopman, G., Macina, O.T., Levinson, M.E. and Rosenkranz, M.S.:** Computer-automated structure evaluation of fluorquinolone antimicrobial agents. Antimicrob.Agents Chemother. 31: 1831-1840.
75. **Khan, F.A.** Quinolonas y macrólidos en las infecciones respiratorias. Hospital Practice (ed.esp.) 8: 54-63. (1993).
76. **Holt, C.D., PharmD, and Barriere, S.J., PharmD, FCCP.** Antimicrobial therapy with the new fluorquinolones. Current opinion in infectious diseases, 4: 742-748. (1991).
77. **Lewin, C.S., Smith, J.T.** Interactions of 4-quinolone with other agents-the importance in assessing practical antibacterial potency. London: Springer-Verlag. 37-51. (1990).
78. **Wolfson, J.S., Hooper, D.C.** Fluorquinolone antimicrobial agents. Clin.Microbiol.Rev. 2: 378-424. (1989).
79. **Paulsen, O.** The antibacterial activity, pharmacology and therapeutic application of ciprofloxacin. Drugs of today. 24: 361-401. (1988).

80. **Böyum, A.:** Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand.J.Immunol. Suppl.* 5: 9-15. (1976).
81. **Jones, R.N., Barry, A.L., Gavan, T.L., Washington II, J.A.** susceptibility tests: microdilution and macrodilution both procedures, p.972-977. En **Lennette, E.M., Balows, A., Hausler, Jr.W.J., Shadomy, H.J.** Manual of clinical microbiology, 4<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1985).
82. **Barry, A.L. and Thornsberry, C.** Susceptibility test diffusion procedures, p. 978-987. En **Lennete, E.M., Balows, A., Hausler, Jr.W.J., Shadomy, H.J.** Manual of clinical microbiology, 4<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1985).
83. **Pascual, A., Tsukayama, D., Kovarik, J. et al.:** Uptake and activity of rifapentine in human peritoneal macrophages and PMN leukocytes. *Eur.J.Clin.Microbiol.* 6: 152-157. (1987).
84. **Pick, E. and Mizel, D.** Rapid microassays for the measurent of superoxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme inmunoassay reader. *Journal of Inmunological Methods.* 46: 211-226. (1981).
85. **Lowry, O.M., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.* 193: 265-275. (1951).

86. **Maderazo, E.G., Kripas, C.J., Breaux, S.P., Woronick, C.L., More, R.** Pitfalls in testing drug uptake by leukocytes using radiolabeled drugs and explanation of conflicting results with clindamicyn. *Chemotherapy*. 35:123-129. 1987.
87. **Pascual, A., García, I and Perea, E.J.** Uptake and intracellular activity of an optically active ofloxacin isomer in human neutrophils and tissue culture cells. *Antimicrob.Agents Chemother*. 34: 277-281. (1990).
88. **Easmon, C.S.F. and Crane, J.P.** Uptake of ciprofloxacin by macrophages. *J.Clin.Pathol*. 38: 442-444. (1985).
89. **Perea, E.J., García, I., Pascual, A.** Comparative penetration of lomefloxacin and other quinolones into human phagocytes. *Am.J.Med*. 92 (Supl 4-A): 486-515. (1992).
90. **García, I., Pascual, A., Guzmán, M.C., Perea, E.J.** Uptake and intracellular activity of Sparfloxacin in human polimorphonuclear leukocytes and tissue culture cells. *Antimicrob.Agents Chemother*. 36: 1053-1056. (1992).
91. **Van der Auwera, Matsumoto, T. and Husson M.** Intraphagocytic penetration of antibiotics. *J.Antimicrob.Chemother*. 22:185-192. 1988.
92. **Pascual, A., García, I. and Perea, E.J.** Entry of Lomefloxacin and Temafloxacin into human neutrophils, peritoneal macrophages, and tissue culture cells. *Diagnos.Microbiol.Infect.Dis*. 15: 393-398. (1992).

93. Taira, K., Koga, H. and Kohno, S. Accumulation of a newly developed fluorquinolone, OPC-17116, by human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1877-1881. (1993).
94. Stankova, L., Bigley, R., and Ingermann, Rolf, L. The effect of cyanide on vitamin C uptake by polymorphonuclear leukocytes. *Gen. Pharmac.* 22: 903-905. (1991).
95. Furet, Y.X., Deshusses, J. and Pechère, J.C. Transport of pefloxacin across the bacterial cytoplasmic membrane in quinolone-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2506-2511. 1992.
96. Hirai, K., Oayama, I., Irikura, T., Iyobe, S., and Mitsuhashi, S. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:535-538. 1986.
97. Briheim, G., Stendall, O., Dahlgren, C. Influence of antibiotics of formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-induced leucocyte chemiluminescence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 763-767. (1987).
98. Labro, M.T., Amit, N., Babin-Chevaye, C., Hakin, J. Synergy between RV 28965 (roxithromycin) and human neutrophils for bactericidal activity in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 137-142. (1986).

99. Labro, M.T., Babin-Chevaye, C. Synergie bactéricide de la josamycine des polynucléaires neutrophiles humains in vitro. *Pathologie et Biologie*. 37: 329-334. (1989).
100. Nagafuji, T., Matsumoto, T., Takahashi, K., Kubo, S., Haraoka, M., Tanaka, M., Ogata, N., Kunazawa, J. Enhancement of superoxide production of polymorphonuclear neutrophils by ofloxacin and the effects of the inhibitors of protein Kinase C. *Chemotherapy* 39: 70-76. (1993).
101. Zeis, B.M. Antimycobacterial drugs and the production of reactive oxidants by polymorphonuclear leucocytes in vitro. *Chemotherapy*. 34: 56-60. (1988).
102. Johnson, J.D., Hand, W.L., Francis J.B., et al: Antibiotic uptake by alveolar macrophages. *J.Lab.Clin.Med.* 95: 429-439, (1980).
103. Yancey, R.J., Sánchez, M.S., Ford, C.W. Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* within polymorphonuclear neutrophils. *Eur.J.Clin.Microbiol. Infect.Dis.* 10: 107-113. (1991).
104. Maderazo, E.G., Woronick, C.L., Albano, S.D., Breaux, S.P., Pock, R.M. Inappropriate activation, desactivation, and probable autooxidative damage as a mechanism of neutrophil locomotory defect in trauma. *J.Infect.Dis.* 154: 471-477. (1986).

105. **Buggy, B.P., Schaberg, D.R. Swartz, R.D.** Intraleukocyte sequestration as a cause of persistent *Staphylococcus aureus* peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am. J. Med.* 76:1035-1040. 1984.
106. **Babior, B.M.** Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood.* 64: 959-966. (1984).
107. **Hand, W.L., Hand, D.L. and King-Thompson, N.L.** Antibiotic inhibition of the respiratory burst response in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 863-870. (1990).
108. **Steinberg, T.H., Hand, W.L.** Effect of phagocyte membrane stimulation on antibiotic uptake and intracellular bactericidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 660-662. (1987).
109. **Van der Broek, P.J., Buys, L.F.M. and Aleman, B.M.P.** The antibacterial activity of benzylpenicillin against *Staphylococcus aureus* ingested by granulocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 25: 931-940. (1990).
110. **Dugger, K.O. and Galgiani, J.N.** Neutrophil killing of single microorganisms as measured by a new method. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12: 199-203. (1989).
111. **Verhoef, J., Waldvogel, F.A.** Testing phagocytic cell function. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 4: 379-391. (1985).

112. **Van den Brock, P.J.** Antimicrobial drugs, microorganisms and phagocytes. *Reviews of Infections Diseases*. 11: 23-245. (1989).
113. **Pemán, J., Cantón, E., Ramón, M.S., Jiménez, T. and Gobonado, M.** Penetration and activity of antimicrobial drugs in phagocytic cells. *Rev. Esp. Quimioterap.* 4:27-36. (1991).
114. **Vildé, V.L., Dournon, E. Rajalopalom, P.** Inhibition of *Legionella pneumophila* multiplication within human macrophages by antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 743-748. (1986).
115. **Milatovic, D.** Intraphagocytic activity of ciprofloxacin and CI 934. *Eur.J.Clin.Microbiol.* 5: 659-660. (1986).
116. **Pascual, A., Martínez-Martínez, L. and Perea, E.J.** Effect of ciprofloxacin and ofloxacin on human polymorphonuclear leucocyte activity against staphylococci. *Chemotherapy.* 35: 17-22. (1989).

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes  
en el día de 12 de Enero, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D.<sup>a</sup> SOFIA BALLESTA FUDARRA  
titulada PENETRACION Y ACTIVIDAD INTRACELULAR DE CINCO  
TIPOS DE VIRIONES EN LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES  
HUMANOS  
acordó otorgarle la calificación de APTO "CON LAUDE"

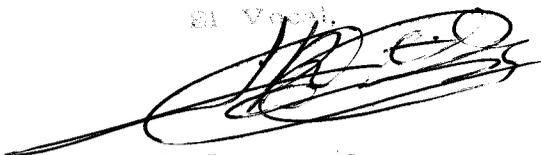
Sevilla, 12 de DICIEMBRE 1994

El Vocal,

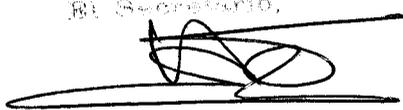


El Presidente

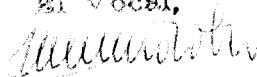
El Vocal,



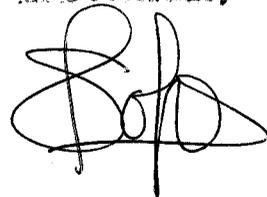
El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672923