

Original

Influencia de fármacos inhibidores de bombas de iones en la acumulación de ofloxacino y grepafloxacino en el interior de los leucocitos polimorfonucleares humanos

A. Orero¹, E. Cantón², J. Pemán¹, M.M. Velert² y M.V. Bermejo³

¹Servicio de Microbiología, ²Unidad de Bacteriología Experimental, Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia; ³Dpto. Farmacia y Tec. Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia

RESUMEN

En este estudio se ha comprobado la influencia de tres fármacos inhibidores de diferentes bombas de iones (digoxina, omeprazol y verapamilo) sobre la acumulación de ofloxacino y grepafloxacino en el interior de los leucocitos polimorfonucleares humanos. Se establecieron dos condiciones de ensayo: preincubando las células con el fármaco antes de añadir la quinolona, y añadiendo simultáneamente ambos fármacos al medio. El I/E máximo de ofloxacino es diferente según la condición de ensayo: $7,69 \pm 0,88$, $5,64 \pm 1,91$ y $3,56 \pm 1,04$ para el ensayo sin preincubación y preincubando las células durante 30 y 60 minutos a 37 °C, respectivamente. De igual forma, los máximos para grepafloxacino fueron $61,27 \pm 3,04$, $32,18 \pm 3,25$ y $22,52 \pm 3,86$. La digoxina no modifica significativamente la acumulación de las quinolonas en el interior de los PMN, aunque induce un aumento de los I/E respecto al control. El omeprazol reduce, en general, la acumulación de ambas quinolonas. Con ofloxacino se reducen significativamente los I/E cuando ambos fármacos se añaden simultáneamente al medio; sin embargo, con grepafloxacino es necesaria una incubación previa de 60 minutos para obtener diferencias. El verapamilo produce un aumento significativo del I/E de ambas quinolonas cuando las células se preincuban con dicho fármaco a 10 veces la concentración plasmática.

Palabras clave: Quinolona - Polimorfonuclear - Acumulación - Verapamilo - Omeprazol - Digoxina

Influence of ion pump-inhibiting drugs on the accumulation of ofloxacin and grepafloxacin in human polymorphonuclear leukocytes

SUMMARY

In this study we tested the influence of three ion pump-inhibiting drugs (digoxin, omeprazole and verapamil) on the accumulation of ofloxacin and grepafloxacin in human polymorphonuclear leukocytes. Two assay conditions were established: cell preincubation with the drug for 30 or 60 minutes before addition of quinolone, or addition of both drugs simultaneously. The maximum I/E for ofloxacin is different depending on the assay conditions: 7.69 ± 0.88 ; 5.64 ± 1.91 and 3.56 ± 1.04 for the assay without preincubation and with preincubation

for 30 or 60 minutes at 37 °C, respectively. Similarly, grepafloxacin reached the following maximums: 61.27 ± 3.04 ; 32.18 ± 3.25 and 22.52 ± 3.86 . Digoxin did not significantly modify the accumulation of the quinolones, but it increased the I/E compared with the control. In general, omeprazole reduced the accumulation of both quinolones. When omeprazole and ofloxacin were added together, ofloxacin's I/E was significantly lower; however, for grepafloxacin, 60 minutes of preincubation were necessary. Verapamil induced a significant increase in the I/E for both quinolones when the cells were preincubated at 10 times the plasma concentration.

Key words: Quinolone - Polymorphonuclear - Accumulation - Verapamil - Omeprazole - Digoxin

INTRODUCCIÓN

Las fluoroquinolonas son antimicrobianos capaces de penetrar, acumularse y ser activas en el interior de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) humanos (1-6). Esta propiedad es importante para el tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos intracelulares, capaces de sobrevivir en el interior del PMN, como es el caso de *Legionella*, *Brucella*, *Salmonella* y *Staphylococcus*, entre otros (7), y también para el tratamiento de las infecciones en enfermos con los sistemas de defensa leucocitarios deteriorados, como son los receptores de trasplantes, los pacientes oncológicos y hematológicos, aquellos con insuficiencia renal crónica, esclerosis múltiple, enfermedad granulomatosa crónica, enfermedad de Chediak-Higashi, síndrome de Job, etc. (8-12).

La capacidad de penetrar y acumularse en el interior de la célula no es igual para todo el grupo de quinolonas, sino que varía en función de diversos parámetros fisicoquímicos y fisiológicos. El pH extracelular, la lipofilia de la molécula, la estereoisomería, la presencia de otros sustratos o el estado metabólico de la célula son, entre otros, factores determinantes para la mayor o menor penetración del antibiótico (13, 14). Así pues, el fenómeno de penetración es un proceso delicado que depende de varios factores. La presencia de sustancias que alteren alguno de los parámetros antes citados podría modificar sustancialmente el paso al interior celular.

En este trabajo se ha determinado la influencia de tres fármacos inhibidores de bombas de iones (presentes en la membrana plasmática) sobre la penetración de ofloxacin y grepafloxacin en el interior del leucocito PMN.

MATERIAL Y MÉTODOS

Quinolonas

El ofloxacin se obtuvo en su presentación comercial *Tarivid*[®] (Hoechst Pharma) (solución para inyección intravenosa que contiene 2 mg/ml de ofloxacin). La concen-

tración de trabajo fue de 10 mg/l. El grepafloxacin se obtuvo de los laboratorios Glaxo, y se preparó una solución madre de 1000 mg/l a partir del polvo valorado (1,18 de potencia, equivalente a un 84,8% de riqueza), utilizando como disolvente agua destilada, que fue almacenada a -70 °C en alícuotas durante un máximo de tres meses. La concentración de trabajo fue 5 mg/l.

Fármacos inhibidores de bombas de iones

Los fármacos inhibidores de bombas se obtuvieron de sus respectivos preparados farmacéuticos en solución acuosa para administración intravenosa. La digoxina fue *Lanacordin*[®] (Glaxo Wellcome) y las concentraciones de trabajo fueron 0,002 mg/l (concentración plasmática) y 2 mg/l (cien veces la concentración plasmática). El omeprazol fue *Losec*[®] (Schering-Plough) y las concentraciones de trabajo fueron 0,6 mg/l (concentración plasmática) y 6 mg/l (diez veces la concentración plasmática). El verapamil fue *Manidon*[®] (Knoll-Basf) y las concentraciones de trabajo fueron 0,3 mg/l (concentración plasmática) y 3 mg/l (diez veces la concentración plasmática).

Aislamiento de los leucocitos PMN

Los leucocitos PMN se obtuvieron de sangre venosa anticoagulada de donantes adultos sanos y se purificaron con métodos descritos anteriormente (15-17). Los hematíes se separaron por sedimentación con dextrano al 6% (Braun Medical) y las células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad con *Ficoll-Paque*[®] (Pharmacia Biotech) durante 35 minutos a 400 g. Los hematíes contaminantes se lisaron con cloruro amónico (CIN₄) al 0,87%. Posteriormente los PMN se lavaron tres veces con solución salina de Hank (ICN) con gelatina al 0,1% (GHBSS).

La riqueza en PMN de la suspensión final fue superior al 95%, y la viabilidad, evaluada por el método de exclu-

sión del colorante vital azul tripano, fue del 98% (18). La suspensión final se ajustó a 5×10^6 PMN/ml y se mantuvo a 4 °C hasta el comienzo del ensayo (nunca más de dos horas).

Penetración de las quinolonas en los PMN en presencia de digoxina, omeprazol y verapamilo

La penetración de las quinolonas en los PMN en presencia de los diferentes inhibidores de bombas de iones se midió por fluorimetría (3, 19, 20). Los PMN se dividieron en tres series. En la serie 1 se pretrataron con el fármaco inhibidor de bombas durante 30 minutos a 37 °C en agitación; en la serie 2 se pretrataron durante 60 minutos. Transcurrido el tiempo de preincubación, a ambas series se les añadió la quinolona. En la serie 3 la quinolona y el fármaco se añadieron simultáneamente a las células.

La concentración de antibiótico en el interior de los PMN se determinó en las tres series a los 10, 30 y 60 minutos de incubación.

En las tres series se incluyeron los controles, que siguieron el mismo proceso descrito pero en lugar de fármaco inhibidor de bomba se añadió GHBSS.

Determinación de la concentración de quinolona en el interior de los PMN

La concentración de ofloxacino y grepafloxacino en los PMN se determinó midiendo la fluorescencia emitida con un espectrofotómetro F 2000 (Hitachi, Tokyo, Japón). Los máximos de excitación y emisión fueron 292 nm y 496 nm, respectivamente. Se utilizó siempre un control sin quinolona para medir la fluorescencia inicial del PMN y el fármaco.

En cada experiencia se determinó el volumen intracelular por radioensayo utilizando agua tritiada (1,0 mCi/g, Amersham) como marcador del volumen total y [¹⁴C]polietilenglicol (1,4 mCi/g, Amersham) para calcular el volumen del agua intersticial (21).

Análisis de los resultados

Se calculó el cociente I/E, o relación entre la concentración de quinolona intracelular y extracelular, correspondiente a la media y su desviación estándar de cinco experiencias diferentes. Para cada fármaco se realizaron las tres condiciones de ensayo en el mismo día, con el mismo lote de PMN, para restar variabilidad a la técnica.

Posteriormente se realizó una prueba *t* de Student para muestras pequeñas entre los diferentes grupos de datos obtenidos a un mismo tiempo de incubación, pero con presencia o ausencia de fármaco, y se consideró que la diferencia era significativa con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

En las Tablas 1 y 2 se resumen los valores de I/E de ofloxacino y grepafloxacino, respectivamente.

Cinética de penetración

En el ensayo sin preincubación, el paso de ambas quinolonas al interior del PMN fue rápido: el máximo valor de I/E se alcanzó entre los 10 y 30 minutos para ofloxacino (I/E $7,69 \pm 0,88$) y a los 10 minutos para grepafloxacino (I/E $61,27 \pm 3,04$). A los 60 minutos de incubación los valores de I/E se redujeron respecto al máximo, aunque las diferencias no fueron significativas: $6,28 \pm 1,82$ y $35,04 \pm 9,65$ para ofloxacino y grepafloxacino, respectivamente.

Cuando las células se preincubaron durante 30 o 60 minutos, el I/E fue aumentando paulatinamente, alcanzándose el máximo a los 60 minutos de incubación (Tablas 1 y 2). Los valores alcanzados fueron significativamente menores que los obtenidos sin preincubación ($p < 0.05$).

Efecto de la digoxina

Cuando las células se preincubaron durante 60 minutos con digoxina, se observó un aumento del I/E de ofloxacino respecto al control en los tres tiempos de medida (Tabla 1). Cuando la preincubación fue durante 30 minutos también se observó un aumento del I/E respecto al control a los 10 y 30 minutos de incubación ($4,59 \pm 0,92$ vs. $4,12 \pm 1,56$ y $5,45 \pm 1,19$ vs. $4,26 \pm 1,87$). Sin embargo, cuando ambos fármacos se añadieron simultáneamente la tendencia fue a obtener I/E menores en presencia de digoxina. En ningún caso las diferencias fueron significativas.

Cuando la digoxina y el grepafloxacino se añadieron simultáneamente al medio, el I/E de la quinolona aumentó con respecto al control ($49,10 \pm 9,39$ y $57,85 \pm 8,42$ vs. $40,04 \pm 9,65$, a los 60 minutos de incubación); no obstante, se retrasó el tiempo en alcanzar el máximo, ya que éste se logró a los 30 minutos en presencia de digoxina ($63,26 \pm 11,11$) y a los 10 minutos sin digoxina ($61,27 \pm 3,04$). Cuando las células se preincubaron durante 30 minutos con el digitálico a diez veces la concentración plasmática, también se observó un aumento del I/E respecto al control, aunque las diferencias no fueron significativas.

Tabla 1. Cociente entre concentración intracelular y concentración extracelular (I/E) de ofloxacino en ausencia y presencia de fármacos inhibidores de bombas de iones, en dos condiciones de ensayo: sin preincubar los PMN y preincubándolos con los fármacos durante 30 y 60 minutos. Se indican los cocientes a los 10, 30 y 60 minutos de incubación tras añadir la quinolona. (*) Diferencias significativas respecto al control (p < 0.05). DS: desviación estándar.

Fármaco	mg/l	Cociente I/E ± DS																	
		Sin preincubar						Preincubación 30 min						Preincubación 60 min					
		10 min	30 min	60 min	10 min	30 min	60 min	10 min	30 min	60 min	10 min	30 min	60 min						
Ofloxacino (control)	10	7,35±1,82	7,89±0,88	6,28±1,82	4,12±1,56	4,26±1,87	5,64±1,91	2,09±0,85	2,80±1,22	3,56±1,04									
Digoxina + ofloxacino	0,002	7,71±1,08	6,47±2,01	5,69±1,18	4,59±0,92	5,45±1,19	4,27±1,24												
	2	6,77±1,40	6,18±1,08	5,78±1,00	4,74±0,78	5,36±0,44	5,40±0,90	3,35±0,51	4,39±0,92	4,41±0,38									
Omrepazol + ofloxacino	0,6	7,06±0,84	4,15±1,53	4,13±0,76*	3,51±0,45	2,85±0,55	3,88±1,04												
	6	6,20±0,54	5,53±0,31*	3,40±0,79	3,87±0,98	2,58±0,37	3,59±0,42	1,81±0,83	2,03±0,59	2,25±1,21									
Verapamilo + ofloxacino	0,3	7,16±0,76	6,01±1,32	5,83±2,34	4,53±1,35	4,96±2,10	5,11±0,72												
	3	7,45±2,02	5,69±1,86	5,89±2,74	4,70±1,71	3,87±1,47	5,10±1,20	4,39±1,78*	5,63±1,00*	4,79±0,96									

Tabla 2. Cociente entre concentración intracelular y concentración extracelular (I/E) de grepafloxacino en ausencia y presencia de fármacos inhibidores de bombas de iones, en dos condiciones de ensayo: sin preincubar los PMN con fármaco y preincubándolos con cada uno de ellos durante 30 y 60 minutos. Se indican los cocientes a los 10, 30 y 60 minutos de incubación tras añadir la quinolona. (*) Diferencias significativas respecto al control (p < 0.05). DS: desviación estándar.

Fármaco	mg/l	Cociente I/E ± DS																	
		Sin preincubar						Preincubación 30 min						Preincubación 60 min					
		10 min	30 min	60 min	10 min	30 min	60 min	10 min	30 min	60 min	10 min	30 min	60 min						
Grepafloxacino (control)	5	61,27±3,04	55,63±13,12	40,04±9,65	32,18±3,25	31,32±7,57	31,29±3,97	15,77±1,98	20,49±1,59	22,52±3,86									
Digoxina + grepafloxacino	0,002	58,35±8,46	63,26±11,11	49,10±9,39	31,72±9,14	33,18±9,82	29,73±6,99												
	2	57,08±6,18	74,34±10,33	57,85±8,42	34,73±10,13	35,86±15,16	39,52±9,53	20,28±5,47	20,97±7,16	22,28±8,14									
Omrepazol + grepafloxacino	0,6	58,21±7,38	52,71±9,44	32,77±13,84	24,74±7,96	25,58±1,79	22,20±4,24												
	6	60,63±5,12	60,77±21,41	39,54±15,83	27,77±3,84	24,33±11,67	17,57±7,91	7,78±1,30*	9,94±5,44	20,32±6,27									
Verapamilo + grepafloxacino	0,3	56,71±11,50	55,49±19,97	53,82±16,91	22,27±6,99	31,68±8,23	21,30±15,04												
	3	51,51±1,18	44,41±11,02	38,19±24,31	31,46±7,05	28,45±8,75	46,09±10,48*	15,01±3,38	27,07±9,99	26,89±10,58									

Efecto del omeprazol

La presencia y preincubación de los PMN con omeprazol disminuyó la penetración o la acumulación de ofloxacino en el interior celular. Cuando ambas sustancias se añadieron al medio simultáneamente, el I/E a los 10 minutos apenas se modificó respecto al control, pero se observó una disminución significativa a los 60 y 30 minutos de incubación en función de la concentración de omeprazol (0,6 y 6 mg/l, respectivamente): $4,13 \pm 0,76$ vs. $6,28 \pm 1,82$ y $5,53 \pm 0,31$ vs. $7,69 \pm 0,88$.

También la preincubación de los PMN con omeprazol logró disminuir el cociente I/E de ofloxacino, especialmente durante los primeros 30 minutos de incubación: $2,85 \pm 0,55$ y $2,58 \pm 0,37$ en el ensayo de preincubación durante 30 minutos, y $1,81 \pm 0,83$ en el de preincubación durante 60 minutos.

Con grepafloxacino, el omeprazol redujo el paso o acumulación de la quinolona al interior del PMN sólo cuando las células se preincubaron con el fármaco; de hecho, cuando la preincubación fue de 60 minutos se obtuvo un descenso significativo respecto al control a los 10 minutos de incubación ($7,78 \pm 1,30$ vs. $15,77 \pm 1,98$). Este descenso se mantuvo hasta los 30 minutos de incubación ($9,94 \pm 5,44$ vs. $20,49 \pm 1,59$), para luego ascender hasta valores similares a los del control. Cuando la preincubación era de 30 minutos los valores de I/E fueron más bajos que los del control en todos los tiempos, pero sin diferencias significativas. Sin embargo, cuando ambas sustancias se añadieron al medio simultáneamente, y a diferencia de ofloxacino, los valores apenas difirieron de los del control.

Efecto del verapamilo

El verapamilo no modificó el paso de ofloxacino al interior del PMN cuando las sustancias se añadieron simultáneamente al medio, aunque se observó una reducción en el tiempo en que se alcanzó el máximo I/E (10 minutos con verapamilo). Cuando las células se preincubaron durante 30 minutos no se observaron cambios; sin embargo, con una preincubación de 60 minutos con verapamilo a 3 mg/l, se incrementó significativamente el paso o la acumulación de ofloxacino a los 10 y 30 minutos de incubación ($4,39 \pm 1,78$ vs. $2,09 \pm 0,85$ y $5,63 \pm 1,00$ vs. $2,80 \pm 1,22$). Este incremento también se mantuvo a los 60 minutos, aunque a ese tiempo las diferencias respecto al control no fueron significativas.

La adición de verapamilo y grepafloxacino simultáneamente al medio no modificó significativamente la acumulación de la quinolona, aunque con verapamilo a la concentración plasmática y a los 60 minutos de incubación se

obtuvieron cocientes superiores a los del control ($53,82 \pm 16,91$). Sin embargo, cuando las células se preincubaron durante 30 minutos con verapamilo a diez veces la concentración plasmática, se obtuvo un incremento significativo ($p \leq 0,05$) de la penetración o acumulación de la quinolona a los 60 minutos de incubación ($46,09 \pm 10,48$ vs. $31,29 \pm 3,97$).

DISCUSIÓN

Es conocida la capacidad de determinadas bacterias de sobrevivir en el interior de los PMN humanos, lo cual les permite evitar la defensa humoral y celular, produciendo así infecciones recurrentes o persistentes de difícil erradicación (7). Además, en los pacientes inmunodeprimidos las infecciones bacterianas son frecuentes, ya que la disfunción granulocítica, presente en estos enfermos, se reconoce como un factor que predispone para la infección (8-12). En ambas situaciones es importante que el antibiótico sea capaz de penetrar, acumularse y ser activo en el interior de la célula, de manera que elimine los microorganismos acantonados en ella y supla las deterioradas funciones bactericidas de los PMN.

Las fluoroquinolonas son antibióticos capaces de penetrar, acumularse y ser activas en el interior del PMN (1, 5), siendo ésta una de las razones por las que son consideradas tratamiento de elección en situaciones de inmunodepresión (22-25). El grado de penetración de las quinolonas depende de factores fisicoquímicos como la lipofilia, el pH o la energía de activación de la molécula, o de la presencia en el medio de sustancias que pudieran competir por transportadores de membrana.

En el presente estudio se analizó la influencia de tres fármacos inhibidores de bombas de iones en la acumulación de dos quinolonas, ofloxacino y grepafloxacino, así como el efecto del tratamiento previo de los PMN con dichos fármacos en la acumulación de las quinolonas.

La penetración de ambas quinolonas es rápida, y en los primeros 10 minutos se alcanza el máximo I/E; luego los valores van disminuyendo con el tiempo de forma paulatina. Esta cinética también se ha descrito para otras quinolonas, aunque puede variar algo el tiempo en que se alcanza el máximo (3, 5, 6). Cuando las células no se preincubaban, el ofloxacino tiene un cociente I/E máximo de $7,69 \pm 0,88$, mientras que el del grepafloxacino alcanza un valor de $61,27 \pm 3,04$. Así pues, ambas quinolonas presentan la misma cinética de penetración, pero las concentraciones intracelulares de grepafloxacino son diez veces superiores a las de ofloxacino. Cuando las células se preincubaban los máximos disminuyen, aunque las diferencias de acumulación en-

Tabla 3. Características fisicoquímicas (6) de las quinolonas estudiadas. P=Coeficiente de partición (n-octanol-tampón fosfato 0,02 M, pH 7,4). Concentración de quinolona 1,0 mg/l.

Quinolona	P	Peso molecular	Solub. agua (mg/ml)	Constantes disociación		Unión a proteínas (%)
				pKa ₁	pKa ₂	
Ofloxacino	0,3	361	2,40	5,7	7,9	32,6
Grepafloxacino	4,6	360	3,60	7,1	8,8	51,2

tre ambas quinolonas se mantienen. Esta diferencia en la magnitud de penetración entre las dos quinolonas puede deberse, en parte, a una serie de parámetros fisicoquímicos que se resumen en la Tabla 3. La lipofilia de grepafloxacino es mayor que la de ofloxacino, lo cual le permite difundir más fácilmente a través de la membrana plasmática. Así mismo, también hay diferencias en las constantes de disociación, ya que las de grepafloxacino tienen un valor muy cercano, mientras que las de ofloxacino están más distanciadas. A pH 7,4 ambas quinolonas se encuentran mayoritariamente en forma de iones híbridos (*zwitterion*), que es como en mayor proporción atraviesan la membrana plasmática, ya que su carga neta es nula (26). En el interior celular el pH es de alrededor de 6,9, por lo que grepafloxacino se ionizaría y quedaría atrapado en forma catiónica en la célula. El ofloxacino, a ese pH intracelular, continuaría estando en forma dipolar, con carga neta nula, y podría expulsarse más fácilmente que el grepafloxacino desde el interior. Un factor adicional sería el grado de unión a las proteínas, ya que el grepafloxacino es capaz de unirse en un 51%, frente a un 32% el ofloxacino. Aunque no se ha estudiado la localización intracelular de estas quinolonas, para otras se ha descrito en el citosol, por lo que ofloxacino y grepafloxacino pueden estar unidos a proteínas citosólicas. Por último, comentar que si la retención de grepafloxacino y ofloxacino se debe, en parte, al valor de sus constantes de disociación, y que grepafloxacino queda retenido en el interior en forma catiónica, debe haber un transportador de cationes involucrado en la expulsión de las quinolonas, ya que el ambiente intracelular tiene un estrecho margen de pH y un exceso de cationes modificaría el equilibrio iónico, creando un caos metabólico. Por ello, y considerando además que las especies catiónicas no pueden atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva, la célula emplearía un transportador de cationes para eliminar el exceso electrolítico. Esta hipótesis concuerda con los datos hallados por otros autores en células de tejido hepático y renal, donde la cimetidina, un inhibidor de las bombas de expulsión de cationes, inhibe la salida de ciertas quinolonas al exterior celular (27-29).

Vista la importancia de determinados parámetros fisicoquímicos en la penetración de estas quinolonas, es interesante comprobar si algunos fármacos empleados con frecuencia en la práctica clínica, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de determinadas bombas de iones y la consiguiente modificación del entorno electrolítico de la célula, pudieran modificar la capacidad de las quinolonas de penetrar y acumularse en el interior del PMN humano.

Se eligieron tres fármacos muy utilizados. El verapamilo se emplea en investigación básica tanto en la inhibición de los canales lentos de Ca²⁺, como inhibidor de una bomba de expulsión dependiente del ATP denominada glucoproteína P (30, 31). En el PMN parece que su mecanismo de acción no está directamente relacionado con la inhibición de los canales de calcio, ya que produce respuestas que también son inducidas por estímulos independientes del calcio. Se ha sugerido que el verapamilo, en el PMN, actúa sobre diferentes aspectos del metabolismo celular, lo que redundaría en tres acciones básicas: 1) aumento del AMPc citosólico (por inhibición, en parte, de una fosfodiesterasa), 2) aumento de la concentración del ion Ca²⁺ en el citosol por movilización de los depósitos intracelulares, y 3) inhibición de la proteincinasa C. La consecuencia de estas modificaciones metabólicas es que el verapamilo inhibe la respiración oxidativa, la secreción de los gránulos azurófilos, la quimiotaxis y la despolarización en el PMN (32-36).

El efecto del verapamilo en la acumulación es diferente según el tipo de quinolona y también según se haya tratado previamente el PMN. La presencia de verapamilo simultáneamente con la quinolona no modifica la acumulación del ofloxacino, aunque se observa una tendencia a obtener valores de I/E por debajo del control; sin embargo, incrementa la acumulación del grepafloxacino, aunque las diferencias no son significativas. Esto viene a coincidir con lo expuesto antes, ya que el ofloxacino apenas queda retenido en forma catiónica, mientras que con grepafloxacino es la especie química que mayormente se encuentra en el citosol. Si el verapamilo modifica el metabolismo del PMN, en un primer momento podría inhibir esas bombas de expulsión de cationes, lo que explicaría la mayor acumula-

ción de grepafloxacin a los 60 minutos de incubación. Por el contrario, cuando las células se preincubaban durante 60 minutos con verapamilo, la acumulación de ofloxacin aumenta significativamente entre los 10 y 30 minutos de incubación. En cambio, para grepafloxacin, el aumento de la acumulación se obtiene a los 60 minutos de incubación cuando las células se preincubaban durante 30 minutos. Estos datos indican que el verapamilo necesita tiempo para producir cambios en la célula que puedan afectar intensamente al metabolismo celular. El aumento en la acumulación de ofloxacin se debe a una modificación del entorno iónico intracelular (posiblemente por el cambio de ionización de estructuras proteicas adyacentes), que le hace unirse al citosol en mayor grado. Esto concuerda también con lo observado en grepafloxacin, que sólo incrementa su acumulación a los 60 minutos, lo que nos indica que con el tiempo ya no son los transportadores de cationes sino el entorno electroquímico el que se modifica.

Los datos obtenidos del ensayo con digoxina nos muestran que esta sustancia no modifica significativamente el paso de las quinolonas, aunque se observa una tendencia a aumentar la acumulación cuando las células se preincubaban con el digitálico a 2 mg/l. Aun no siendo este incremento significativo, es interesante la coincidencia, en ambas quinolonas, del aumento en la acumulación, lo que indica que el factor que lo produce podría ser común. La digoxina tiene la capacidad de mejorar la contractilidad del miocardio. Su mecanismo de acción está relacionado con la unión reversible a la ATPasa- Na^+/K^+ , enzima asociada a la membrana celular. La hidrólisis de ATP por esta enzima proporciona la energía necesaria para expulsar el Na^+ del interior celular e introducir K^+ (37). También actúa sobre las fibras de actina y miosina del aparato locomotor de amebas y PMN. De hecho, se ha observado que la presencia de digoxina disminuye la quimiotaxis de los granulocitos en situaciones de neumonía y bacteriemia inducidas experimentalmente en ratones (38). Esto indica que la diana de la digoxina existe en las células objeto de nuestro estudio, por lo que la presencia de digoxina produce un cambio en el potencial de membrana y una disminución del número de cationes en el interior celular (la bomba de Na^+/K^+ introduce dos átomos de K^+ y expulsa tres de Na^+). Esta menor concentración catiónica permitiría una mayor permisividad del citosol a las especies catiónicas de las quinolonas, aunque esto sólo redundaría en un 35% en la acumulación respecto al control. El que este incremento se observe únicamente cuando las células se han preincubado durante 30 o 60 minutos se debería a que es necesario cierto tiempo para que la digoxina ejerza su acción y la diferencia de potencial se haga evidente.

El ensayo con omeprazol muestra en general un descenso en el paso y la acumulación de la quinolona al interior celular, ya que los datos obtenidos en los estudios con este fármaco indican que no se alcanzan los valores del control. Además, cuando la adición es simultánea se obtienen cocientes significativamente menores que el control a los 30 y 60 minutos de incubación. Con grepafloxacin también se observa una reducción, aunque se necesita preincubar las células durante 60 minutos para obtener diferencias significativas respecto al control. El omeprazol es una base débil que inhibe de forma específica e irreversiblemente la ATPasa- H^+/K^+ ; esta inhibición es dependiente del pH, siendo máxima a $\text{pH} < 6$ (37). La ATPasa parece encontrarse, fundamentalmente, en la mucosa gástrica, y no hay pruebas de su existencia en otras células, aunque a la luz de los datos obtenidos el omeprazol debe ejercer alguna acción sobre el PMN, ya que las quinolonas ven disminuida su acumulación, posiblemente por modificación del equilibrio iónico intra-extracelular. Además, los datos obtenidos se corresponden con el mecanismo de acción del omeprazol, ya que la unión de éste a la enzima es irreversible, de modo que el máximo efecto se observa si el inhibidor se añade simultáneamente a la quinolona; cuando la preincubación es de 60 minutos, posiblemente ya se han generado mecanismos de reparación para restablecer otras ATPasas que sustituyan a las bloqueadas por el omeprazol. La acumulación de ofloxacin se ve más afectada que la de grepafloxacin, probablemente porque la primera basa su acumulación fundamentalmente en un equilibrio iónico, mientras que la segunda posee también una alta afinidad por las proteínas citosólicas.

En general, la presencia de fármacos que inducen cambios en el equilibrio electroquímico del PMN modifica la acumulación de ofloxacin y grepafloxacin en el interior celular. La presencia de omeprazol reduce la acumulación de las quinolonas cuando ambos fármacos se añaden al medio simultáneamente; la digoxina modifica temporalmente la salida de las quinolonas, permitiendo una mayor acumulación dentro del PMN; y la preincubación durante 60 minutos con verapamilo aumenta el paso y la acumulación de ambas quinolonas en el interior del PMN. No se sabe la repercusión clínica que puede tener el tratamiento conjunto con quinolonas y estos fármacos, aunque este estudio vale para esclarecer un poco la cuestión. También sería necesario realizar estudios del efecto de estos fármacos sobre la actividad intrafagocítica de las quinolonas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cantón, E., Pemán, J., Jiménez, M.T. y cols. *In vitro activity of sparfloxacin compared with those of five other quinolones*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 558-565.

2. Pascual, A., García, I., Perea, E.J. *Entry of lomefloxacin and temafloxacin into human neutrophils peritoneal macrophages, and tissue culture cells.* Diagn Microbiol Infect Dis 1992; 15: 393-398.
3. Pascual, A., García, I., Perea, E.J. *Fluorimetric measurement of ofloxacin uptake by human polymorphonuclear leukocytes.* Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 653-656.
4. Easmon, C.S.F., Crane, J.P. *Uptake of ciprofloxacin by human neutrophils.* J Antimicrob Chemother 1985; 16: 67-73.
5. García, I., Pascual, A., Guzmán, M.C. y cols. *Uptake and intracellular activity of sparfloxacin in human polymorphonuclear leukocytes and tissue-cultured cells.* Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 1053-1056.
6. Taira, K., Koga, H., Kohno, S. *Accumulation of a newly developed fluoroquinolone, OPC-17116, by human polymorphonuclear leukocytes.* Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 1877-1881.
7. World Health Organization Scientific Group. *Cell-mediated immunity and resistance to infection.* Int Arch Allerg Appl Immun 1973; 44: 589-648.
8. Gallin, J.I., Fletcher, M.P., Seligmann, B.E. y cols. *Human neutrophil-specific granule deficiency: A model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response.* Blood 1982; 59: 1317-1329.
9. Porter C.J., Burden, R.P., Morgan, A.G. y cols. *Impaired polymorphonuclear neutrophil function in end-stage renal failure and its correction by continuous ambulatory peritoneal dialysis.* Nephron 1995; 71: 133-137.
10. Czirjak, L., Danko, K., Sipka, S. y cols. *Polymorphonuclear neutrophil function in systemic sclerosis.* Ann Rheum Dis 1987; 46: 302-306.
11. Elbim, C., Prevot, M.H., Bouscarat, F. y cols. *Impairment of polymorphonuclear neutrophil function in HIV-infected patients.* J Cardiovasc Pharmacol 1995; 25 (Suppl. 2): S66-70.
12. Rolston, K. *Neutropenia and infection.* Helix, Amgen's Magazine of Biotechnology 1994; vol III, issue 2: 4-12.
13. Takács-Novák, K., Béla N., Hermeicz, I. y cols. *Protonation equilibria of quinolone antibacterials.* J Pharma Sci 1990; 79: 1023-1028.
14. Vazifeh, D., Bryskier, A., Labro, M.T. *Mechanism underlying levofloxacin uptake by human polymorphonuclear neutrophils.* Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 246-252.
15. Orero, A., Cantón, E., Bermejo, M.V. y cols. *Efecto de los fármacos antiinflamatorios en la acumulación de ofloxacino en el interior de los leucocitos polimorfonucleares humanos.* Rev Esp Quimioterap 1999; 12: 144-148.
16. Peterson, P.K., Verhoef, J., Schmeling, D., Quie, P.G. *Kinetics of phagocytosis and bacterial killing by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes.* J Infect Dis 1977; 136: 502-509.
17. Boyum, A. *Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages.* Scand J Immunol 1976; Suppl. 5: 9-15.
18. Tennant, J.A. *Evaluation of the trypan blue technique for determination of all viability.* Transplantation 1964; 2: 685-690.
19. Johnson, J.D., Hand, W.L., Francis, J.B. y cols. *Antibiotic uptake by alveolar macrophages.* J Lab Clin Med 1980; 95: 429-439.
20. Chapman, J.S., Georgopapadakou, N.H. *Routes of quinolone permeation in Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 438-442.
21. Klempner, M.S., Styrt, B. *Clindamycin uptake by human neutrophils.* J Infect Dis 1981; 144: 472-475.
22. Potgieter, P.D., Hammond, J.M. *Prophylactic use of the new quinolones for prevention of nosocomial infection in the intensive care unit.* Drugs 1995; 49 (Suppl. 2): 86-91.
23. Kremery, V., Jr. *The use of quinolones as therapy in granulocytopenic cancer patients. Comparison with other antimicrobials.* Drugs 1995; 49 (Suppl. 2): 139-143.
24. Kunova, A., Trupl, J., Kremery, V., Jr. *Low incidence of quinolone resistance in gram-negative bacteria after five-years use of ofloxacin in prophylaxis during afebrile neutropenia.* J Hosp Infect 1995; 29: 19-33.
25. Ladeb, S., Durand-Gasselín, B., Leclercq, R. y cols. *Bacterial resistance and management of nosocomial infections: Relations to hematology.* Pathol Biol Paris 1996; 44: 107-112.
26. Furet Y.X., Deshusses J., Pechère, J.C. *Transport of pefloxacin across the bacterial cytoplasmic membrane in quinolone-susceptible Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 2506-2511.
27. Sasaya, M., Oda, M., Endo, T. y cols. *The transport of ciprofloxacin in cultured kidney epithelial cells LLC-PK1.* Biol Pharm Bull 1997; 20: 887-891.
28. Sasabe, H., Terasaki, T., Tsuji, A. y cols. *Carrier-mediated hepatic uptake of quinolone antibiotics in the rat.* J Pharmacol Exp Ther 1997; 282: 162-171.
29. Yano, I., Ito, T., Takano, M. y cols. *Evaluation of renal tubular secretion and reabsorption of levofloxacin in rats.* Pharm Res 1997; 14: 508-511.
30. Hunter, J., Hirst, B.H., Simmons, N.L. *Epithelial secretion of vinblastine by human intestinal adenocarcinoma cell (HCT-8 and T84) layers expressing P-glycoprotein.* Br J Cancer 1991; 64: 437-444.
31. Cormet-Boyaka, E., Huneau, J.F., Mordrelle, A. y cols. *Secretion of sparfloxacin from the human intestinal Caco-2 cell line is altered by P-glycoprotein inhibitors.* Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2607-2611.
32. Elferink, J.G., Deierkauf, M. *The effect of verapamil and other calcium antagonist on chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes.* Biochem Pharmacol 1984; 33: 35-39.
33. Della Bianca, V., Grzeskowiak, M., De Togni, P. y cols. *Inhibition by verapamil of neutrophil responses to formylmethionylleucylphenylalanine and phorbol myristate acetate. Mechanisms involving Ca²⁺ changes, cyclic AMP and protein kinase C.* Biochem Biophys Acta 1985; 845: 223-236.
34. Kazanjian, P.H., Pennington, J.E. *Influence of drugs that block calcium channels on the microbicidal function of human neutrophils.* J Infect Dis 1985; 151: 15-22.
35. Azuma, Y., Tokunaga, T., Takeda, Y. y cols. *The effect of calcium antagonists on the activation of guinea pig neutrophils.* Jpn J Pharmacol 1986; 42: 243-251.
36. Levy, R., Dana, R., Gold, B. y cols. *Influence of calcium channel blockers on polymorphonuclear and monocyte bactericidal and fungicidal activity.* Isr J Med Sci 1991; 27: 301-306.
37. Flórez, F., Armijo, J.A., Mediavilla, A. *Farmacología humana.* Ediciones Universidad de Navarra (EUNSA), Pamplona 1989.
38. Espósito, A.L., Poirier, W.J., Clark, C.A. *The cardiac glycoside digoxin disrupts host defense in experimental pneumococcal pneumonia by impairing neutrophil mobilization.* Am Rev Respir Dis 1989; 140: 1590-1594.