

## Original

# Influencia del desplazamiento de la unión a proteínas por ibuprofeno en la actividad de una cefalosporina de tercera generación frente a *Streptococcus pneumoniae*

F. Cafini, N. González, M. Torrico, O. Echeverría, D. Sevillano, L. Alou, M.J. Giménez, L. Aguilar y M.L. Gómez-Lus

*Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid*

### RESUMEN

*El significado clínico de la unión de los antibacterianos a las proteínas plasmáticas es un fenómeno aún no bien definido. El objetivo de este estudio fue valorar, mediante curvas de muerte bacteriana, el efecto en la actividad bactericida in vitro del cefditoren, a concentraciones próximas a la Cmax, de una administración de 400 mg, frente a tres cepas de Streptococcus pneumoniae (CMI de cefditoren de 0,12, 0,25 y 0,5 mg/l) en combinación con albúmina humana (4 g/dl) e ibuprofeno, a la concentración máxima detectada después de la administración de 400 mg (32,3 mg/l) y de 10 veces la Cmax (323 mg/l). El cefditoren fue rápidamente bactericida (reducción de 3 log<sub>10</sub> UFC/ml del inóculo inicial) frente a todas las cepas empleadas a concentraciones de 4,2 mg/l, en medios de cultivo convencionales. En presencia de albúmina humana este efecto sólo se mantuvo sobre la cepa más sensible (CMI = 0,12 mg/l), detectando recrecimientos más o menos acusados con valores de CMI superiores. La presencia de ibuprofeno (32,3 mg/l) retrasó ligeramente la aparición de recrecimientos, mientras que el aumento de la concentración a 10 veces la Cmax de ibuprofeno recuperó la actividad bactericida en todas las cepas. En conclusión, la actividad de un antibacteriano de elevada unión a las proteínas plasmáticas no debería relacionarse exclusivamente con la fracción libre teórica extrapolada desde las concentraciones plasmáticas. El papel de los antagonistas de la unión a las proteínas merece ser analizado dado su frecuente uso en procesos respiratorios, particularmente asociados con la administración de cefalosporinas.*

**Palabras clave:** Cefditoren - Unión a proteínas - Ibuprofeno - *Streptococcus pneumoniae*

## ***Influence of the displacement of protein binding by ibuprofen in the activity of a third-generation cephalosporin against Streptococcus pneumoniae***

### SUMMARY

*The clinical significance of protein binding remains to be fully elucidated. The aim of this study was to evaluate the effect in the in vitro bactericidal activity of cefditoren through killing curves at Cmax concentrations against three Streptococcus pneumoniae strains (cefditoren MICs of 0.12, 0.25 and 0.5 mg/l) with or without human albumin (4 g/dl) and ibuprofen at Cmax concentrations (32.3 mg/l) and 10 times the Cmax (323 mg/l). Cefditoren was rapidly bactericidal (3 log<sub>10</sub> CFU/ml reduction) against the three strains at 4.2 mg/l concentration in Mueller-Hinton broth plus 5% lysed horse blood. In presence of human albumin, this effect was maintained against the most susceptible strain (MIC = 0.12 mg/l). Regrowths were observed with higher MIC values. The presence of ibuprofen (32.3 mg/l) slightly delayed regrowth while the increase of ibuprofen concentration up to 10 x Cmax recovered the bactericidal activity against all strains. The activity of an antimicrobial with high protein binding should not be linked exclusively with the theoretical unbound fraction extrapolated from the plasma concentration. The role of protein binding antagonists merits analysis due to their frequent use associated with cephalosporins in respiratory tract infections.*

**Key words:** Cefditoren - Protein binding - Ibuprofen - *Streptococcus pneumoniae*

## INTRODUCCIÓN

Desde un punto de vista farmacológico, la unión de los antibacterianos a las proteínas plasmáticas es un fenómeno bien definido. Sin embargo, su significado clínico es más discutido. La albúmina, aunque no es la única, es la principal proteína transportadora, o de secuestro, de sustancias exógenas existente en el organismo. Aunque sólo la fracción libre del antibacteriano, fracción no unida a proteínas plasmáticas, es activa sobre la bacteria, la reversibilidad de este fenómeno implica que la limitación de la actividad asociada a este proceso deje de ser absoluta (1). Diversos estudios *in vitro* han demostrado retrasos (2, 3) o incrementos (4) de la actividad de antimicrobianos con elevada unión a las proteínas plasmáticas cuando se ensayan en medios de cultivo que reproducen las condiciones fisiológicas. En estas circunstancias, los pronósticos de eficacia sustentados en datos de antimicrobiano libre extrapolados directamente desde las concentraciones plasmáticas totales sólo serán representativos de la situación más adversa que podamos encontrarlos.

La reversibilidad es un proceso complejo en el que intervienen factores tales como la dosis administrada, la constante de asociación, la concentración de proteína y la disponibilidad de sitios libres de unión (5), pero también es un proceso fácilmente vulnerable mediante la modificación de cualquiera de ellos. La interacción medicamentosa, producto de la coadministración de fármacos que compiten por el mismo sitio de unión a la albúmina, es un fenómeno relativamente frecuente que en general finaliza con el aumento o la disminución de las concentraciones libres de ambos fármacos. En el caso de las cefalosporinas este fenómeno se ha detectado en presencia de antiinflamatorios no esteroideos (AINE), como el ibuprofeno y el ácido salicílico, y de probenecida (6, 7).

El cefditoren es una cefalosporina oral de tercera generación con una excelente actividad frente a *Streptococcus pneumoniae* (8). Presenta una concentración máxima en suero (Cmax) de 4,2 mg/l después de la administración de dosis orales de 400 mg, y una unión a las proteínas plasmáticas próxima al 88% (9). El objetivo de este estudio fue valorar el efecto en la actividad bactericida *in vitro* del cefditoren frente a *S. pneumoniae* en combinación con ibuprofeno y albúmina humana.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cepas

Para la realización del estudio se utilizaron tres cepas de *S. pneumoniae* escogidas según el perfil de sensibilidad mostrado ante varios betalactámicos (Tabla 1).

## Curvas de muerte bacteriana

Se incorporó un inóculo bacteriano de aproximadamente  $10^7$  UFC/ml a tubos con dos medios de cultivo diferentes y una concentración final de cefditoren de 4,2 mg/l: a) caldo Mueller-Hinton (Difco, Detroit, Mi, USA) suplementado con un 5% de sangre de carnero (Biomedics, Madrid, España) (Cmax); b) caldo Mueller-Hinton suplementado con un 5% de sangre de carnero y 4 g/dl de albúmina humana (Cmax-AH) (A-1653-Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Adicionalmente, y sólo en presencia de albúmina humana, se dispusieron dos series paralelas donde se combinó cefditoren con ibuprofeno a concentraciones de 32,3 mg/l (Cmax-AHib), correspondientes a la Cmax de una administración de 400 mg de ibuprofeno (10), o 323 mg/l (Cmax-AHib10x), correspondiente a una concentración de 10 veces la Cmax.

Los controles de crecimiento se desarrollaron en ausencia de cefditoren, tanto en el medio suplementado con albúmina humana (Control-AH) como en el medio sin suplementar (control).

A los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 y 24 horas se extrajeron de cada tubo 100 µl de muestra que fueron debidamente diluidos y sembrados en placas de agar Mueller-Hinton (Difco) suplementado con un 5% de sangre de carnero. Después de una incubación de 24 horas en atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> se procedió al recuento de microorganismos viables.

## Análisis estadístico

El test estadístico utilizado para analizar la reducción logarítmica ( $\log_{10}$  del recuento de colonias al tiempo 0 h –  $\log_{10}$  del recuento de colonias al tiempo 24 h) fue ANOVA, utilizando como valor significativo  $p < 0.001$ .

## RESULTADOS

La CMI y el serotipo de las tres cepas de *S. pneumoniae* empleadas en el estudio se detallan en la Tabla 1. Las reducciones del inóculo inicial ( $\log_{10}$  UFC/ml) a las 12 y 24

**Tabla 1. Sensibilidad a los betalactámicos de las cepas de *S. pneumoniae* empleadas en el estudio.**

Cepa	Serotipo	CMI (mg/l)		
		Penicilina	Amoxicilina	Cefditoren
1	6A	0,25	0,25	0,12
2	9V	4	8	0,25
3	14	4	8	0,5

horas de las curvas de muerte bacteriana aparecen en la Tabla 2. A concentraciones de cefditoren de 4,2 mg/l se observó un comportamiento bactericida (reducción de 3 log<sub>10</sub> UFC/ml del inóculo inicial) sobre las tres cepas analizadas después de 24 horas de exposición. En presencia de albúmina humana (Cmax-AH) este efecto sólo se mantuvo sobre la cepa más sensible, con CMI de 0,12 mg/l, detectando recrecimientos más o menos acusados con valores de CMI superiores. La presencia de ibuprofeno a concentraciones próximas a la Cmax (Cmax-AH Ib) retrasó ligeramente la aparición de recrecimientos. El aumento de la concentración a 10 veces las Cmax de ibuprofeno (Cmax-AH Ib10x) no sólo evitó su aparición sino que recuperó la actividad bactericida en todas las cepas. Después de la exposición a esta concentración no existieron diferencias estadísticamente significativas en la actividad del cefditoren en presencia o ausencia de albúmina humana.

## DISCUSIÓN

Con el presente estudio tratamos de valorar el efecto sobre la actividad de un antibacteriano de elevada unión a las proteínas plasmáticas al asociarlo con un fármaco que, como el ibuprofeno, presenta una afinidad elevada por la albúmina humana (>99% de unión a las proteínas).

El cefditoren muestra un comportamiento rápidamente bactericida frente a cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina, con valores de CMI de 0,12-0,5 mg/l a concentraciones próximas a la Cmax alcanzada después de la administración de dosis orales de 400 mg (4,2 mg/l). En presencia de concentraciones fisiológicas de albúmina y de acuerdo con el 88% de unión a las proteínas plasmáticas del cefditoren, la fracción libre, activa frente a *S. pneumoniae*, se reduce a aproximadamente 0,5 mg/l. Considerando absoluto el fenómeno de la unión a proteínas, el cefditoren, en presencia de albúmina humana y a concentraciones de 4,2 mg/l, únicamente demuestra capacidad bactericida frente a cepas de *S. pneumoniae* con una CMI ≤0,12 mg/l, muy similar a los resultados obtenidos por Spangler y cols. (11) con cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina en medios sin albúmina humana (11). Sin embargo como se muestra en la Tabla 2 y la Fig. 1, la incorporación de ibuprofeno, sin actividad intrínseca frente al microorganismo (datos no mostrados), conduce de manera proporcional a la concentración suministrada a un aumento de la actividad antineumocócica del cefditoren. Así, a concentraciones de 10 veces la Cmax de ibuprofeno, la actividad del cefditoren en presencia de albúmina humana sería equiparable a la observada con la Cmax en medios de cultivo convencionales frente a cepas con una CMI ≤0,5 mg/l. Presumible-

Tabla 2. Reducción del inóculo inicial (log UFC/ml) de las cepas de *S. pneumoniae* a las 12 y 24 horas.

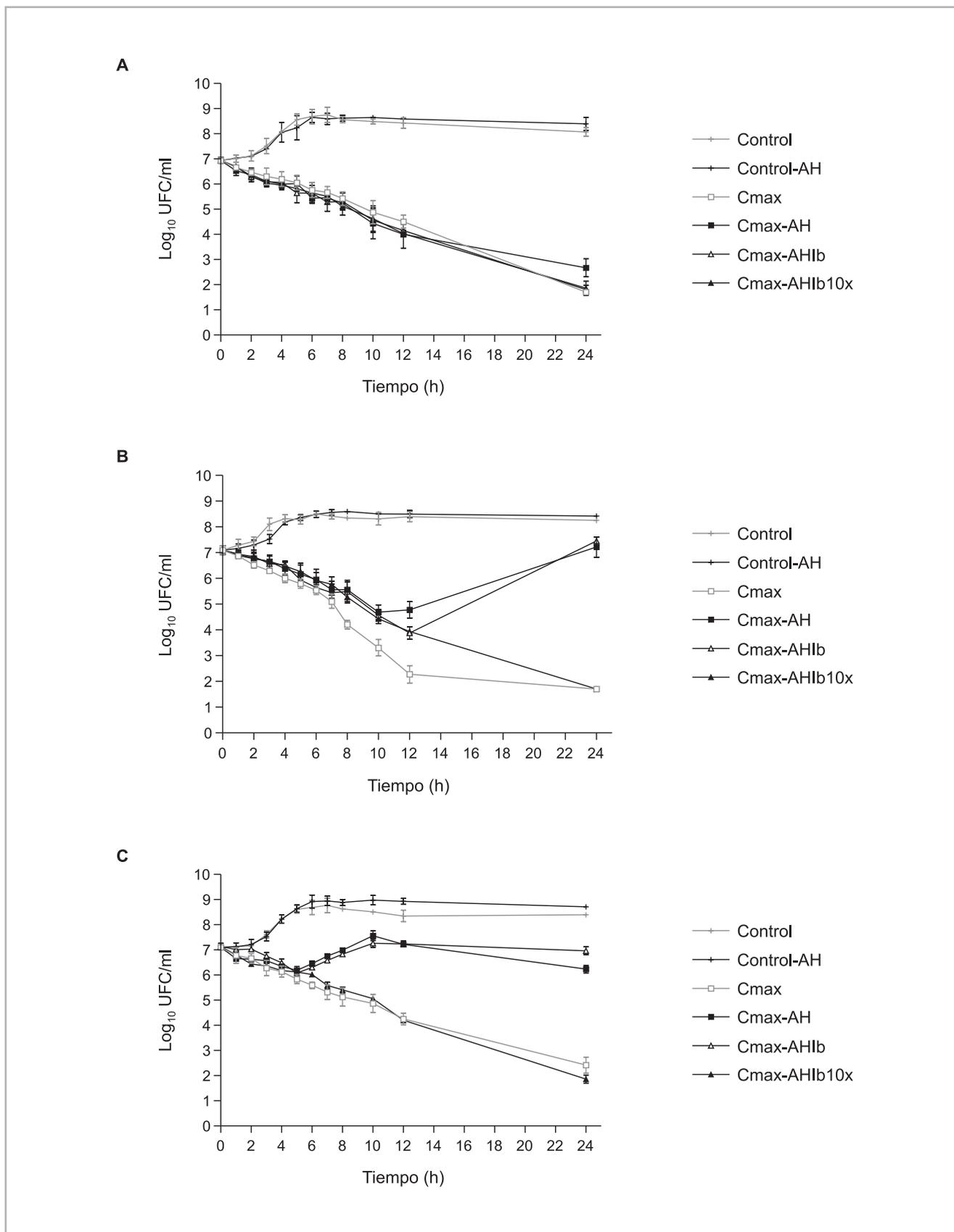
Cepa	CMI (mg/l)	Control		Control-AH		Cmax		Cmax-AH		Cmax-AH Ib		Cmax-AH Ib10x	
		12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
1	0,12	1,5 ± 0,3	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,2	-2,4 ± 0,4	-5,2 ± 0,1	-2,9 ± 0,5	-4,3 ± 0,3	-2,8 ± 0,3	-5,1 ± 0,3	-2,9 ± 0,2	-5,0 ± 0,2
2	0,25	1,3 ± 0,0	1,7 ± 0,1	1,4 ± 1,1	1,3 ± 1,3	-4,8 ± 0,3	-5,4 ± 0,2	-2,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	-3,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	-3,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	-5,4 ± 0,2 <sup>b,c</sup>
3	0,5	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,1	-2,8 ± 0,2	-4,7 ± 0,3	0,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	-0,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	-0,2 ± 0,3	-3,9 ± 0,1 <sup>b,c</sup>	-5,3 ± 0,3 <sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>p <0,001 frente a Cmax.

<sup>b</sup>p <0,001 frente a Cmax-H.

<sup>c</sup>p <0,001 frente a Cmax-AH Ib.

AH: albúmina humana; Ib: ibuprofeno 32,3 mg/l; Ib10x: ibuprofeno 323 mg/l.



**Figura 1.** Curvas de muerte bacteriana de *S. pneumoniae* resistente a la penicilina con CMI de cefditoren de 0,12 (A), 0,25 (B) y 0,5 mg/l (C).

mente este efecto se debe a un aumento de las concentraciones libres de cefditoren, como consecuencia de su desplazamiento desde la albúmina por un fármaco de mayor afinidad por los mismos sitios de unión (6, 7).

Aunque las curvas de muerte bacteriana son herramientas muy útiles para valorar "factores", sus carencias para reproducir comportamientos dinámicos impiden abordar satisfactoriamente el fenómeno de la reversibilidad de la unión a las proteínas plasmáticas, pues un factor fundamental que afecta a la constante de asociación antibacteriano-albúmina, al margen de la variabilidad interpaciente en la cantidad de proteína existente, es el descenso exponencial de las concentraciones del antibacteriano en el organismo tras su administración. En estudios con modelos animales se ha determinado que empleando concentraciones terapéuticas de diferentes AINE, incluido el ibuprofeno, se observan aumentos sustanciales en las concentraciones séricas y tisulares de varias cefalosporinas (6). Este hecho pone de manifiesto que el desplazamiento desde la albúmina se verá favorecido por la propia dinámica de eliminación de ambos fármacos desde el organismo.

Además, desde un punto de vista meramente farmacodinámico, es necesario no olvidar el papel sinérgico de las cefalosporinas y otras proteínas presentes en el plasma humano, como inmunoglobulinas y complemento, que deben incrementar la actividad de estos antibacterianos frente a *S. pneumoniae* (12, 13).

La actividad de un antibacteriano de elevada unión a las proteínas plasmáticas no debería relacionarse exclusivamente con la fracción libre teórica extrapolada desde las concentraciones plasmáticas. El papel de los antagonistas de la unión a las proteínas merece ser analizado dado su frecuente uso en procesos respiratorios, particularmente asociados con la administración de cefalosporinas.

## AGRADECIMIENTOS

Parte de este estudio ha sido financiado por Tedec-Meiji.

---

**Correspondencia:** José Prieto Prieto, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Pabellón II, Planta baja, Universidad Complutense de Madrid, Avda. de la Complutense s/n, Madrid 28040. Tel.: +34 913 941 508; Fax: +34 913 941 511; E-mail: jprieto@med.ucm.es

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Moellering, R.C., Eliopoulos, G.M. *Principles of anti-infective therapy*. En: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (Eds.). Mandell, Douglas and Bennett Principles and practice of infectious diseases, 6th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia 2005; 242-253.
2. Cha, R., Rybak, M.J. *Influence of protein binding under controlled conditions on the bactericidal activity of daptomycin in an in vitro pharmacodynamic model*. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 259-262.
3. Palmer, S. M., Kang, S.L., Cappelletty, D.M., Rybak, M.J. *Bactericidal killing activities of cefepime, ceftazidime, cefotaxime, and ceftriaxone against Staphylococcus aureus and beta-lactamase-producing strains of Enterobacter aerogenes and Klebsiella pneumoniae in an in vitro infection model*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1764-1771.
4. Boswell, F. J., Ashby, J.P., Andrews, J.M., Wise, R. *Effect of protein binding on the in vitro activity and pharmacodynamics of faropenem*. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 525-532.
5. Armijo, J.A. *Absorción, distribución y eliminación de los fármacos*. En: Flórez, J., Armijo, J.A., Mediavilla, A. (Eds.). Farmacología humana. Masson, Barcelona 1987; 57-68.
6. Tsivou, E., Melakopoulos, I., Kotsiou, A., Anagnostopoulou, S., Tesseromatis, C. *Alterations in cefalosporin levels in the serum and mandible of hyperlipaemic rats after co-administration of ibuprofen*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 2005; 30: 171-174.
7. Bialer, M., Wu, W.H., Faulkner, R.D., Silber, B.M., Yacobi, A. *In vitro protein binding interaction studies involving cefixime*. Biopharm Drug Dispos 1988; 9: 315-320.
8. Soriano, F., Granizo, J.J., Fenoll, A. y cols. *Antimicrobial resistance among clinical isolates of Streptococcus pneumoniae isolated in four Southern European countries (ARISE Project) from adult patients: Results from the Cefditoren Surveillance Program*. J Chemother 2003; 15: 107-112.
9. Wellington, K., Curran, M.P. *Cefditoren pivoxil: A review of its use in the treatment of bacterial infections*. Drugs 2004; 64: 2597-2618.
10. Kapil, R., Nolting, A., Roy, P., Fiske, W., Benedek, I., Abramowitz, W. *Pharmacokinetic properties of combination oxycodone plus racemic ibuprofen: Two randomized, open-label, cross-over studies in healthy adult volunteers*. Clin Ther 2004; 26: 2015-2025.
11. Spangler, S.K., Jacobs, M.R., Appelbaum, P.C. *Time-kill studies on susceptibility of nine penicillin-susceptible and -resistant pneumococci to cefditoren compared with nine other beta-lactams*. J Antimicrob Chemother 1997; 39: 141-148.
12. Casal, J., Aguilar, L., Jado, I. y cols. *Effects of specific antibodies against Streptococcus pneumoniae on pharmacodynamic parameters of beta-lactams in a mouse sepsis model*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1340-1344.
13. Casal, J., Giménez, M.J., Aguilar, L. y cols. *Beta-lactam activity against resistant pneumococcal strains is enhanced by the immune system*. J Antimicrob Chemother 2002; 50 (Suppl. S2): 83-86.