

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

*Actividad antimicrobiana in vitro de nuevas  
6-fluoroquinolonas de administración por vía oral.  
Relación estructura - actividad*

Memoria que, para optar al grado  
de Doctora en Farmacia, presenta:

***Raquel Taléns Visconti***





## Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Los que suscriben, Dña. Emilia Cantón Lacasa, Doctora en Ciencias Biológicas y Farmacéutica Adjunta de la Unidad de Bacteriología Experimental del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia y Dña. Teresa M<sup>a</sup> Garrigues Pelufo, Doctora en Farmacia y Profesora Titular de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia.

### CERTIFICAN:

Que la Memoria de Doctorado que presenta la Licenciada en Farmacia Raquel Taléns Visconti y que lleva por título “*Actividad antimicrobiana in vitro de nuevas 6-fluoroquinolonas de administración por vía oral. Relación estructura-actividad*”, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Lo que suscriben en Valencia, a 24 de Octubre de 2001.

Fdo.: Dra. Emilia Cantón Lacasa

Fdo.: Dra. Teresa M<sup>a</sup> Garrigues Pelufo



*Esta Tesis Doctoral se ha realizado con la ayuda de una Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador, concedida por la Conselleria de Cultura i Educació, y forma parte del Proyecto SAF 96-1710 financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.*



A mi familia

A David



La presente Memoria se ha realizado en la Unidad de Bacteriología Experimental del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia, bajo la dirección del Dr. José M<sup>a</sup> Plá Delfina, la Dra. Emilia Cantón Lacasa y la Dra. Teresa M<sup>a</sup> Garrigues Pelufo, a quienes deseo expresar mi más sincero agradecimiento por trasmitirme sus conocimientos con la disposición que lo han hecho.

Emilia, te doy las gracias por la forma en que has sabido dirigirme hacia las técnicas de laboratorio, guiada por tu amplia experiencia y siempre con un interés contagioso por la consecución de los resultados. Tu entrega ha sido continua y es justo hacerlo constar.

Teresa, te doy las gracias porque siempre has estado dispuesta a ayudarme y lo has hecho, aunque no tenías obligación alguna, culminando tu generosidad al aceptar la dirección de la Tesis por el triste acontecimiento de todos conocido. Te aseguro, Teresa, que tu participación ha sido fundamental y espero saber mostrarte mi gratitud cuando las circunstancias así lo requieran.

Muchas otras personas han contribuido en la elaboración de esta Tesis, aunque no haya sido directa su participación. Así, en la Unidad de Bacteriología Experimental he encontrado compañerismo y ayuda, principalmente por parte de M<sup>a</sup> Jesús, Rosa, Carmen, Sandra e Isabel, si bien no debo olvidar al resto del personal del Centro de Investigación, ya que tanto el Dr. Rivera, como cualquier otro miembro del mismo, han facilitado mi labor y por ello les estoy agradecida.

En el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, he recibido toda mi formación galénica. Así pues, quiero expresar mi gratitud a

los profesores que lo componen, con los que, además, he compartido Docencia, Consejos y otras experiencias, sin nombrarlos a todos por su elevado número, si bien hay dos a los que debo recordar especialmente. Gracias Víctor porque desde siempre has sido mi guía, porque me abriste las puertas del Departamento, por tu participación como Presidente tanto del Tribunal ante el que defendí mi Memoria de Licenciatura como espero ahora del de la Tesis Doctoral, y sobre todo, por tu constante ofrecimiento de ayuda. Adelais, no olvido el tiempo que estuve colaborando en tu proyecto, ni la forma en que me acogiste, ni los consejos y facilidades que siempre me has otorgado, ni que has vivido todas mis inquietudes, ni que has participado en la elaboración de esta Tesis desde el principio. Has cumplido como tutora con creces. A ti no puedo decirte más que gracias. ¿Por qué? Por todo.

Mención aparte merece el profesor Mark Fisher. Durante cuatro meses he trabajado contigo en el St George's Hospital Medical School de Londres. Por mi condición de recién casada, sola y lejos de mi entorno habitual, me refugié en el Laboratorio no menos de doce horas diarias, sin festivos, viviendo sólo para mi trabajo. Pero ¿y tú? ¿Por qué lo hiciste? Gracias Mark, muchas gracias. Sería una inmensa alegría verte formando parte del Tribunal, como me has comunicado que es tu deseo. No puedo olvidar mencionar a tu equipo formado por personas maravillosas, Sandy, Xiao-Su, Vicky, Julia, Kate, Genoveva y Eli. Vosotras hicisteis mis estancias mucho más agradables, gracias a todas.

Me resulta difícil expresar en pocas líneas todo el agradecimiento que siento hacia mi familia. Durante este tiempo, ha habido acontecimientos que marcan una vida. He contraído matrimonio con mi único amor, David. Mi hermana Mara se ha casado con Fernando. Quiero que conste mi eterna

gratitud a mis padres por el esfuerzo que han hecho en mi educación personal y académica, por haberme inculcado desde pequeña el amor al estudio, por habernos preparado con tanto esmero nuestras ceremonias nupciales, por su cariño y generosidad, facilitándome lo cotidiano en aras a la tranquilidad en mis quehaceres profesionales. Mara y Fernando han compartido mis preocupaciones, aconsejándome principalmente en materia informática y mi hermano Edu, me ha preguntado por mis investigaciones, aun consciente de que, por su edad, no iba a entender mis respuestas. A todos ellos ¡gracias! Tampoco quiero olvidar a quienes compartiendo mis inquietudes, ilusionados y orgullosos, ya no podrán ver concluida la meta del doctorado.

Finalmente, agradecer muy especialmente el apoyo que he recibido de la vida de mi amor. Gracias David. Te has multiplicado. Has hecho lo increíble por mí. Llevamos más de siete años juntos y en ese tiempo siempre has estado ahí, alegrándote con mis éxitos y animándome en los malos momentos. Juntos, hemos preparado la casa y organizado todo lo que iba a formar parte de nuestro hogar. Has compartido mis tareas junto al ordenador, escuchándome con paciencia, ocupándote además de los menesteres propios de nuestra nueva vida. Pero sobre todo quiero agradecerte tu infinita comprensión al tener que dejarte tanto tiempo solo. Espero compensar tu abnegación demostrándote todo mi amor. Sin ti no lo habría conseguido.



In Memoriam



ILMO. SR. DR. D. JOSÉ MARÍA PLÁ DELFINA

Me has integrado en tu Proyecto, dándome la oportunidad de dedicarme a lo que tanto me gusta. Me has enseñado a ilusionarme con los logros conseguidos, a aprender de los errores, a superar dificultades, a canalizar mi capacidad de trabajo, a tantas y tantas cosas... Me has tratado siempre con cariño, haciendo gala de una bondad al alcance de muy pocos. Tus acertados consejos profesionales han ido a la par con los personales. Has sido profesor y amigo.

Recuerdo que, en 1.999, cuando defendía la Memoria de Licenciatura ante el Tribunal, estabas en primera fila a cargo de pasar las diapositivas. “José María por favor”. Y al mirarte veía tu rostro, satisfecho y complacido, que me lanzaba un guiño de complicidad indicándome que todo iba bien y animándome a seguir por ese camino. Ahora ya no podré contar con ese apoyo, aunque sé que tú estarás ahí porque no querrás perderte la exposición de tu obra.

Este trabajo es tuyo. El último de tu vida y a mí me ha correspondido el honor de colaborar en él y concluirlo. Tú has sido mi director. Hemos pasado mucho tiempo juntos. Mis visitas a tu casa, tus llamadas telefónicas a Londres, siempre apoyándome en los momentos difíciles. Como decía antes, tantas y tantas cosas...

Pocas horas antes de dejarnos, en tu casa, me dabas las gracias porque había sabido captar y plasmar tus ideas. José María, permíteme que te lleve la contraria, pues las gracias te las tengo que dar yo a ti, una y mil veces. Sólo espero saber aplicar tus enseñanzas a mi futura vida profesional, pues creo que sería el mejor homenaje que te puedo ofrecer.



## *Índice*

---

<b>Introducción</b> -----	<b>1</b>
<b>Capítulo I: Antecedentes</b> -----	<b>7</b>
1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS QUINOLONAS -----	7
1.2. EVOLUCIÓN HISTÓRICA Y CLASIFICACIÓN DE LAS QUINOLONAS -----	9
1.2.1. Quinolonas clásicas-----	9
1.2.2. Fluoroquinolonas -----	11

## Índice II

1.3. MECANISMO DE ACCIÓN Y RESISTENCIA BACTERIANA DE LAS QUINOLONAS -----	16
1.3.1. Mecanismo de acción antibacteriana -----	16
1.3.2. Mecanismos de resistencia bacteriana -----	26
1.4. EFECTO POSTANTIBIÓTICO DE LAS QUINOLONAS -----	39
1.5. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LAS QUINOLONAS -----	41
1.5.1. Benzopiridonas -----	46
1.5.2. Piridopirimidinas -----	57
1.5.3. Naftiridinas -----	57
1.5.4. Cinolinas -----	58
1.6. FARMACOCINÉTICA DE LAS QUINOLONAS -----	59
1.6.1. Absorción -----	59
1.6.1.1. Absorción de las quinolonas -----	59
1.6.1.2. Mecanismos de absorción y sus modificaciones ----	62
1.6.2. Distribución -----	65
1.6.3. Metabolismo y excreción -----	66
1.7. PENETRACIÓN INTRACELULAR DE LAS QUINOLONAS -----	69
1.8. APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LAS QUINOLONAS -----	73
1.8.1. Infecciones del tracto urinario -----	73
1.8.2. Enfermedades de transmisión sexual (ETS) -----	75
1.8.3. Infecciones gastrointestinales -----	76
1.8.4. Infecciones respiratorias -----	77
1.8.5. Infecciones osteoarticulares -----	78

1.8.6. Infecciones de la piel y tejidos blandos -----	78
1.8.7. Infecciones intraabdominales y pélvicas-----	79
1.9. EFECTOS ADVERSOS DE LAS QUINOLONAS E INTERACCIONES CON OTROS FÁRMACOS-----	80
1.9.1. Efectos adversos -----	80
1.9.2. Interacciones con otros fármacos -----	88
<b>Capítulo II: Materiales y métodos -----</b>	<b>93</b>
2.1. MICROORGANISMOS -----	93
2.1.1. Identificación y mantenimiento de las cepas -----	94
2.2. ANTIMICROBIANOS -----	95
2.3. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS-----	97
2.4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA -----	98
2.4.1. Generalidades -----	98
2.4.2. Pruebas de sensibilidad microbiológica: determinación de la CMI-----	99
2.4.2.1. Preparación de la solución madre de la quinolona --	99
2.4.2.2. Preparación del inóculo-----	100
2.4.2.3. Cálculo de la concentración mínima inhibidora en medio sólido -----	102
2.4.3. Ensayos cinéticos de la actividad bactericida de los antimicrobianos -----	106
2.4.3.1. Preparación del inóculo bacteriano -----	107
2.4.3.2. Medios de cultivo y concentraciones de quinolona estudiadas -----	108

## Índice IV

2.4.3.3. Preparación del antimicrobiano y de los tubos de ensayo-----	108
2.4.3.4. Toma de muestras -----	109
2.4.3.5. Cálculo de la curva de mortalidad-tiempo -----	110
2.4.3.6. Parámetros obtenidos de las curvas de letalidad ---	114
2.4.3.7. Comparación de las curvas de letalidad -----	114
2.5. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD -----	115
2.6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS EN <i>Streptococcus pneumoniae</i> -----	117
2.6.1. Actividad antimicrobiana de los homólogos del ciprofloxacino frente a determinadas cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> -----	118
2.6.2. Estudio <i>in vitro</i> de la formación del complejo ternario (“cleavage”) por las topoisomerasas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> -----	119
2.6.2.1. Reactivos y tampones-----	120
2.6.2.2. Estudio del “cleavage” en la topoisomerasa IV ----	123
2.6.2.3. Estudio del “cleavage” en la girasa -----	124
2.7. BALANCE ACTIVIDAD-BIODISPONIBILIDAD -----	126
2.7.1. Ecuación de trabajo-----	127
<b>Capítulo III: Resultados -----</b>	<b>129</b>
3.1. ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA -----	129
3.1.1 Cepas de referencia -----	129
3.1.2 Microorganismos Gram negativos-----	135
3.1.2.1. <i>Escherichia coli</i> -----	135

3.1.2.2. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> -----	140
3.1.2.3. <i>Achromobacter spp</i> -----	145
3.1.2.4. <i>Moraxella catarrhalis</i> -----	150
3.1.3. Microorganismos Gram positivos -----	155
3.1.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> -----	155
3.1.3.2. <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos-----	160
3.1.3.3. <i>Enterococcus faecalis</i> -----	165
3.1.3.4. <i>Streptococcus pneumoniae</i> -----	170
3.2. CURVAS DE LETALIDAD EN <i>Staphylococcus aureus</i>	
ATCC 25923-----	175
3.2.1. Ciprofloxacino -----	175
3.2.2. 4’N-metilciprofloxacino -----	180
3.2.3. 4’N-etilciprofloxacino-----	185
3.2.4. 3’metil,4’N-metilciprofloxacino (97-101)-----	189
3.2.5. Comparación entre las constantes de letalidad en función de la concentración de antibiótico ensayada -----	193
3.3. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD -----	196
3.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS EN <i>Streptococcus pneumoniae</i> -----	211
3.4.1. Actividad antimicrobiana de los homólogos del ciprofloxacino frente a determinadas cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> -----	211
3.4.2. Estudio <i>in vitro</i> de la formación del complejo ternario ("cleavage") por las topoisomerasas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> -----	215

## Índice VI

3.5. ELECCIÓN DE CANDIDATOS: BALANCE ACTIVIDAD- BIODISPONIBILIDAD-----	222
<b>Capítulo IV: Discusión -----</b>	<b>227</b>
4.1. SELECCIÓN DE LAS QUINOLONAS EN ESTUDIO -----	227
4.2. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA -----	229
4.2.1. Serie 4’N-alquilciprofloxacino-----	230
4.2.2. Serie 3’metil,4’N-alquilciprofloxacino-----	234
4.2.3. Heterólogos -----	240
4.3. CURVAS DE LETALIDAD EN <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923-----	244
4.3.1. Elección del modelo para el ajustado de las curvas de letalidad: justificación-----	245
4.3.2. Estudio comparativo de las curvas de letalidad en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 -----	247
4.4. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD -----	252
4.4.1. Calidad y alcance práctico de la correlación -----	253
4.4.1.1. Heterogeneidad y dispersión de datos -----	253
4.4.1.2. Número de datos experimentales-----	254
4.4.1.3. Distribución de los datos -----	256
4.4.1.4. Errores experimentales y otros factores modificadores-----	256
4.4.2. Capacidad predictiva -----	257
4.4.3. Óptimos de lipofilia (P <sub>0</sub> )-----	259
4.4.3.1. Significación del óptimo de lipofilia-----	266

4.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS EN <i>Streptococcus pneumoniae</i> -----	268
4.6. ELECCIÓN DE CANDIDATOS: BALANCE ACTIVIDAD- BIODISPONIBILIDAD-----	273
<b>Capítulo V: Resumen y conclusiones</b> -----	<b>283</b>
<b>Capítulo VI: Bibliografía</b> -----	<b>289</b>



## ABREVIATURAS UTILIZADAS

<b>97-100</b>	3' metilciprofloxacino
<b>97-101</b>	3' metil,4'N-metilciprofloxacino
<b>97-102</b>	3' metil,4'N-etilciprofloxacino
<b>97-103</b>	3' metil,4'N-propilciprofloxacino
<b>97-104</b>	3' metil,4'N-butilciprofloxacino
<b>ATCC</b>	Colección americana de cultivos tipo
<b>BAB</b>	Balance actividad-biodisponibilidad
<b>Butil-CIP</b>	4'N-butilciprofloxacino
<b>CA</b>	Cociente de actividad
<b>CC<sub>25</sub></b>	Concentración de fluoroquinolona que convierte el 25% del ADN superenrollado PBR322 a la forma lineal
<b>CF</b>	Cociente de biodisponibilidad
<b>CIP</b>	Ciprofloxacino
<b>CMB</b>	Concentración mínima bactericida
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibidora
<b>CMI<sub>50</sub></b>	Concentración que inhibe el 50% de las cepas
<b>CMI<sub>90</sub></b>	Concentración que inhibe el 90% de las cepas
<b>EPA</b>	Efecto postantibiótico
<b>Etil-CIP</b>	4'N-etilciprofloxacino
<b>F<sub>calc</sub></b>	Biodisponibilidad predicha
<b>FLQ</b>	Flumequino
<b>GRX</b>	Grepafloxacino
<b>k</b>	Constante de letalidad

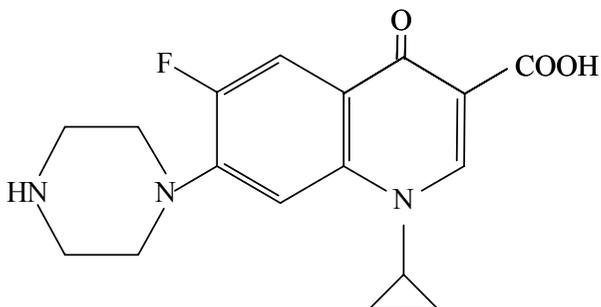
<b><math>k_a</math></b>	Constante de absorción
<b>Mar</b>	Resistencia múltiple a antibióticos
<b>Metil-CIP</b>	4’N-metilciprofloxacino
<b>MG CMI</b>	Media geométrica de las CMIs
<b>MHA</b>	Agar Müller-Hinton
<b>MHB</b>	Caldo Müller-Hinton
<b>NCCLS</b>	Comité nacional para estándares de laboratorio clínico
<b>OFX</b>	Ofloxacino
<b>P</b>	Coefficiente de reparto
<b>PmrA</b>	Proteína neumocócica de resistencia múltiple a fármacos
<b><math>P_0</math></b>	Óptimo de lipofilia
<b>Propil-CIP</b>	4’N-propilciprofloxacino
<b>QRDR</b>	Región determinante de resistencias a quinolonas
<b>SAR</b>	Sarafloxacino
<b>SCN</b>	Estafilococos coagulasa negativos
<b>SPA</b>	Esparfloxacino
<b><math>T_{1/2}</math></b>	Tiempo que tarda la población en reducirse a la mitad o duplicarse
<b><math>T_{90}</math></b>	Tiempo necesario para reducir o aumentar la población viable en un 90%
<b><math>T_{99,9}</math></b>	Tiempo en que se produce una reducción o aumento de tres logaritmos
<b>ufc</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>ufc/ml</b>	Unidades formadoras de colonias por mililitro
<b><math>\sigma</math></b>	Desviación estándar

## *Introducción*

---

Desde la introducción en terapéutica, en la década de los 60, del **ácido nalidíxico** y sus derivados –que conformaron en su día la primera generación de quinolonas antibacterianas– se han sintetizado y utilizado en clínica varios compuestos químicamente relacionados cada vez más efectivos, denominados en la actualidad de segunda y tercera generación. Uno de los más representativos de los cuales es, sin duda, el **ciprofloxacino**, cuya fórmula de constitución es:

## Introducción 2



El **ciprofloxacin** es, en efecto, uno de los antimicrobianos prescritos con mayor frecuencia en todo el mundo. En concreto, y por lo que a España se refiere, figura en decimotercer lugar por importe a precio de venta al público entre los principios activos comercializados durante 1999 (115). Esta aceptación se debe a su amplio espectro de acción, su eficacia, su excelente tolerancia y también al hecho de que puede ser administrado tanto por vía parenteral como por vía oral, aunque no está exenta de inconvenientes. El principal de ellos es que no posee una absorción intestinal suficientemente rápida para que se obtenga una biodisponibilidad completa; en la especie humana es del orden del 54-70%, y además es muy irregular, lo que ha propiciado la búsqueda de nuevos derivados que la mejoren.

Durante años se ha considerado que los derivados alquílicos en la posición 4'N –que, como se verá, no poseen este inconveniente– son menos activos que el ciprofloxacin frente a los principales agentes patógenos. Esta idea, junto con el hecho de que estos derivados, en el organismo, se desalquilan generando el compuesto de referencia, ha motivado que se buscaran nuevas moléculas con modificaciones más sustanciales, principalmente en el núcleo base de la benzopiridona, y ha llevado al hallazgo y comercialización de nuevas quinolonas más activas pero también,

en muchos casos, más tóxicas, hasta el punto de que algunas han dejado de usarse tras haberse demostrado su peligrosidad a medio o largo plazo.

Sin embargo, estudios más recientes parecen indicar que los asertos antes expuestos relativos a los derivados 4'-N-alquílicos del ciprofloxacino no sólo son discutibles sino incluso, en muchas ocasiones, inciertos. En efecto, ya en 1990 se demostró que los derivados etílico y propílico del ciprofloxacino en posición 4'-N son claramente más activos que el compuesto base frente a diferentes especies de *Mycobacterium*. En realidad, la actividad intrínseca de estos derivados depende de la especie considerada y debería investigarse específicamente en cada caso. Más tarde en 1997, se observó que el derivado metilado en la citada posición, que posee una actividad análoga a la del ciprofloxacino frente a un germen tan ubicuo como *Escherichia coli*, se absorbe mucho más eficientemente en el tracto digestivo, lo que supone, dosis por dosis, mayor rendimiento terapéutico.

Por otra parte, se ha demostrado también que estos compuestos se absorben siempre como tales (es decir, no se descomponen en el tracto digestivo antes de pasar a la circulación sistémica), no sufren metabolismo hepático de primer paso en proporción apreciable y, aunque sí producen ciprofloxacino como metabolito principal, su biotransformación es moderadamente lenta, de modo que se alcanzan elevados niveles del derivado alquílico en plasma; en el caso concreto del 4'-N-etilciprofloxacino, la biodisponibilidad oral en el perro es superior al 90% y se obtienen concentraciones plasmáticas claramente superiores a las del ciprofloxacino, metabolito mayoritario, durante seis horas por lo menos después de la administración.

#### Introducción 4

Por todos estos motivos, se juzgó conveniente profundizar en esta cuestión, estudiando el comportamiento de las citadas moléculas y el de otras muy similares, también de constitución sencilla, tanto desde el punto de vista **farmacodinámico** (actividad antimicrobiana sobre diferentes especies patógenas, convenientemente seleccionadas, medida *in vitro* por su concentración mínima inhibidora, CMI) como **farmacocinético** (equilibrio o balance entre actividad intrínseca y biodisponibilidad de los diferentes candidatos sobre los microorganismos estudiados). El trabajo que se presenta incluye dos series de compuestos homólogos: los derivados simples alquílicos en posición 4'N del **ciprofloxacino**, así como los que derivan de su análogo 3'metilado o **3'metilciprofloxacino**. Los compuestos en cuestión se han sintetizado específicamente para nuestro estudio por los laboratorios CENAVISA, copartícipes del Proyecto de Investigación (SAF 96-1710) que ha dado origen a la Memoria que se presenta.

Los resultados obtenidos en esta primera fase del trabajo pusieron de manifiesto la conveniencia de estudiar el **modo de acción** y, a ser posible, también el **mecanismo de acción** de los candidatos a fármacos más prometedores, con el fin de averiguar a qué se deben las diferencias de actividad observadas y por qué, según el microorganismo estudiado, un compuesto es más activo que los demás.

Para ello y aparte de establecer, en un estadio previo, las clásicas relaciones **estructura-actividad** para todos los compuestos sintetizados, se procedió, en primer lugar, a la obtención de las **curvas de letalidad** para los candidatos seleccionados frente a los microorganismos que se consideran más adecuados. Las curvas de letalidad proporcionan información dinámica sobre el crecimiento y la letalidad de los microorganismos y con ellas se

pueden determinar una serie de parámetros de gran interés en lo que se refiere al mecanismo de acción.

En último término, se procedió al estudio específico de los **mecanismos bioquímicos** de esta acción antimicrobiana; con el fin de explicar de un modo convincente cómo y a qué nivel actúan estos compuestos, si bien es cierto que el modo de acción de las quinolonas sigue hasta el momento sin estar totalmente esclarecido. El estudio se realizó incluyendo técnicas de tipo microbiológico, de biología molecular y enzimáticas tan necesarias en los estudios modernos sobre la acción de las fluoroquinolonas. En concreto, la investigación se centró en *Streptococcus pneumoniae*, determinando los efectos de inhibición de las quinolonas ensayadas en la ADN girasa y topoisomerasa IV bacteriana *in vitro*, con el propósito de conocer la diana específica de los derivados alquilados en comparación con el ciprofloxacino, proporcionar información acerca del modo de acción de estos compuestos y comprobar si ello permite explicar las diferencias en la actividad observadas sobre este microorganismo.

Esta última parte del trabajo se ha desarrollado en el St. George's Hospital Medical School, University of London, bajo la dirección del Doctor L. M. Fisher, altamente especializado en genética molecular y en particular en topoisomerasas bacterianas.

Los objetivos, por tanto, de la Memoria se podrían resumir en:

- 1- Determinar la actividad antimicrobiana de todos los derivados de las series 4'-N-alkilciprofloxacino y 3'-metil,4'-N-alkilciprofloxacino y de algunos heterólogos frente a las especies bacterianas seleccionadas.

## Introducción 6

2- Obtener las curvas de letalidad de *Staphylococcus aureus* con los compuestos que presentan mayor actividad en este microorganismo.

3- Establecer las correlaciones actividad-lipofilia.

4- Investigar acerca del mecanismo de acción de los derivados.

Creemos que los resultados obtenidos justifican plenamente la presentación y defensa de esta Memoria y señalan la conveniencia de realizar estudios ulteriores, especialmente en lo que atañe a las relaciones entre actividad intrínseca y biodisponibilidad oral aplicadas a los ensayos de **diseño y desarrollo de nuevas quinolonas antimicrobianas** de acuerdo con las pautas descritas en este trabajo.

## *Capítulo I: Antecedentes*

---

### **1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS QUINOLONAS**

Con el nombre de quinolonas se conoce a un grupo de compuestos antimicrobianos sintéticos de acción bactericida que derivan de una estructura básica idéntica, el **ácido 4-quinolín,3-carboxílico** (4-quinolona), cuya estructura se expone más adelante.

La **estructura básica** de las quinolonas antibacterianas es el núcleo quinolónico, que es el **ácido nalidíxico**, primera quinolona de origen sintético y que ya poseía el grupo cetónico. Por ello, se denominan 4-

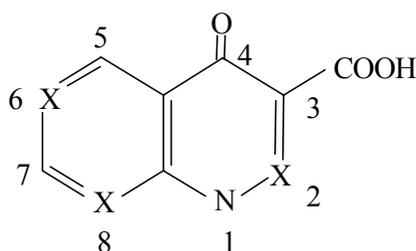
## Antecedentes 8

quinolonas. Pero esta estructura básica origina cuatro grupos diferentes, según el número y la posición de los átomos de nitrógeno de la molécula, todos ellos incluidos bajo la denominación de quinolonas. Estos grupos son los siguientes:

- **BENZOPIRIDONAS:** Contienen un único átomo de nitrógeno en la posición 1. Es, con mucho, el núcleo más utilizado en la síntesis de quinolonas.
- **NAFTIRIDINAS:** Contienen un átomo de nitrógeno en las posiciones 1 y 8.
- **PIRIDOPIRIMIDINAS:** Contienen un átomo de nitrógeno en las posiciones 1, 6 y 8.
- **CINOLINAS:** Contienen un átomo de nitrógeno en las posiciones 1 y 2.

Se esquematizan, junto con el núcleo fundamental, en la Figura 1.1.

### **Estructura básica de las 4-quinolonas: Ácido 4-quinolín, 3-carboxílico**



X: posiciones que pueden contener también un átomo de N

**Figura 1.1.** Estructura general y principales grupos de quinolonas.

## 1.2. EVOLUCIÓN HISTÓRICA Y CLASIFICACIÓN DE LAS QUINOLONAS

### 1.2.1. Quinolonas clásicas

La primera quinolona fue obtenida en 1949 por Price (244) a partir de alcaloides, pero no poseía actividad antimicrobiana. A partir de ese momento se sintetizaron compuestos similares con acción bactericida, que no fueron utilizados en clínica.

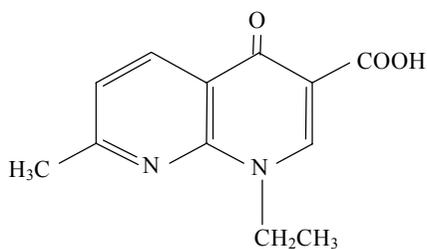
La primera quinolona usada clínicamente fue el **ácido nalidíxico**, sintetizada en 1962 por Leshner y col. (163), a partir de un compuesto intermedio obtenido durante la purificación del antimalárico cloroquina. Presenta una actividad moderada frente a microorganismos Gram negativos y se introdujo en clínica en 1964 para la terapéutica de las infecciones del tracto urinario. Pero sus propiedades farmacocinéticas desfavorables, la alta incidencia de efectos secundarios y la rápida aparición de resistencias bacterianas llevaron al desarrollo de nuevos compuestos, como: el **ácido oxolínico** (295), el **ácido piromídico** (271), el **ácido pipemídico** (272), el **cinnoxacino** (307) y el **flumequino**.

El flumequino, sintetizado en 1973, es la primera quinolona que contiene un átomo de flúor en su estructura, pero que no llega a gozar de las características farmacocinéticas de las nuevas fluoroquinolonas, si bien debido a la presencia de ese átomo de flúor su potencia es diez veces superior frente a los microorganismos Gram positivos (65, 107, 253, 254).

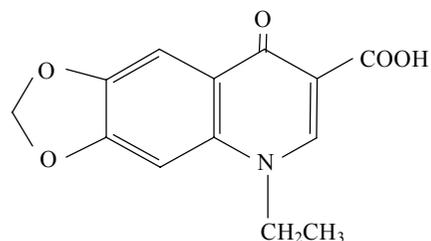
A excepción del flumequino y el ácido pipemídico (que potencia la actividad y espectro sobre Gram negativos, mejora la farmacocinética y presenta menor incidencia de efectos secundarios), estos derivados, no

## Antecedentes 10

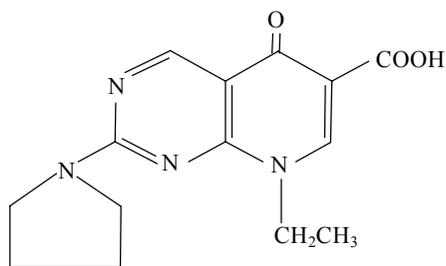
difieren mucho del ácido nalidíxico, ni en su espectro de acción, ni en su farmacocinética. Su estructura se resume en la Figura 1.2.



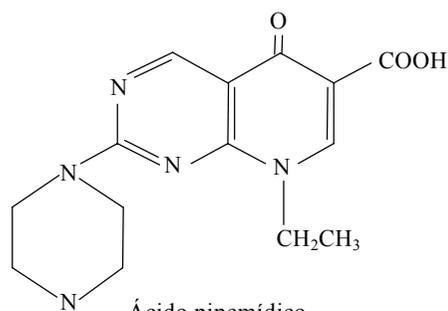
Ácido nalidíxico



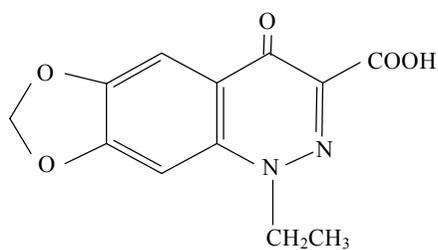
Ácido oxolinico



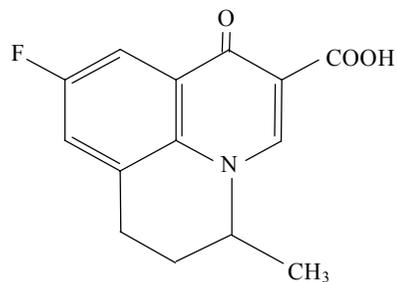
Ácido piromídico



Ácido pipemídico



Cinoxacino



Flumequino

**Figura 1.2.** Estructura de las principales quinolonas clásicas.

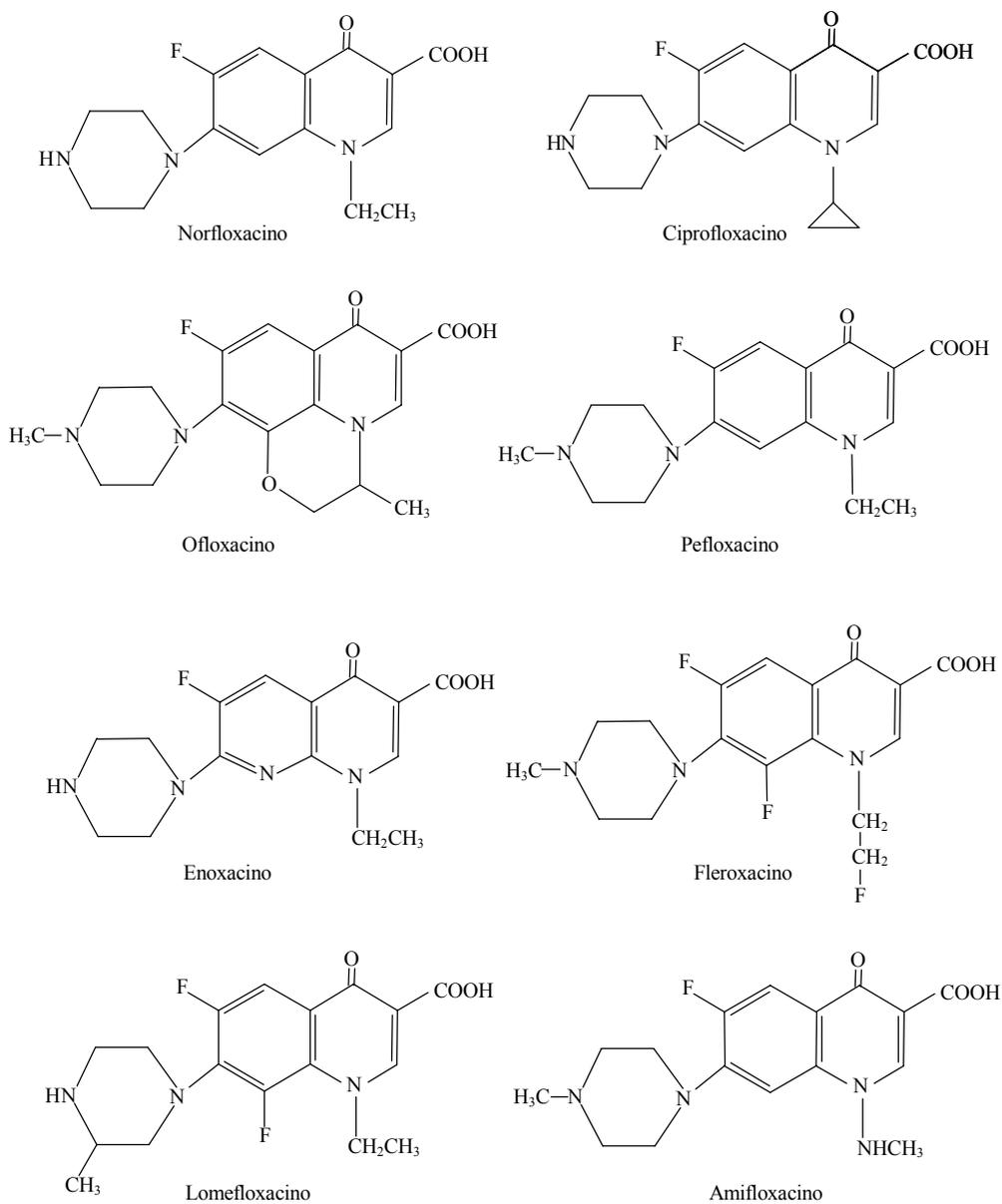
Las quinolonas mencionadas hasta ahora se conocen con el nombre de quinolonas clásicas o quinolonas de primera generación. Fueron empleadas clínicamente hasta finales de los años 70, momento en el que, con el fin de aumentar su potencia y su espectro antibacteriano, se realizaron distintas modificaciones en el anillo básico. El avance más significativo condujo a la obtención de un nuevo grupo: las quinolonas de segunda generación o fluoroquinolonas. Con la introducción en terapéutica de este nuevo grupo, las quinolonas clásicas fueron desplazadas.

### 1.2.2. Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas pertenecen principalmente a los grupos de las benzopiridonas o de las naftiridinas. Se diferencian de las quinolonas clásicas en dos características comunes a todas ellas: la presencia de un átomo de flúor en posición 6 y un anillo piperacínico o pirrolidínico en la posición 7 del núcleo quinolónico. Estos sustituyentes les confieren algunas propiedades que las diferencian de las quinolonas clásicas, como un espectro de acción más amplio, mejores propiedades farmacocinéticas (mayor penetración intracelular, baja unión a proteínas plasmáticas, larga semivida de eliminación) y menor aparición de resistencias (212, 258, 312, 314).

La primera quinolona de segunda generación que se introdujo en el mercado fue el **norfloxacin** (138, 151). Dentro de este grupo se encuentran, entre otras: **pefloxacin**, **enoxacin**, **ciprofloxacino**, **ofloxacin**, **lomefloxacino**, **fleroxacin** y **amifloxacino**. La constitución de algunos de estos compuestos se indica en la Figura 1.3.

## Antecedentes 12



**Figura 1.3.** Constitución química de las principales quinolonas de segunda generación. La estructura base se indica en la Figura 1.1.

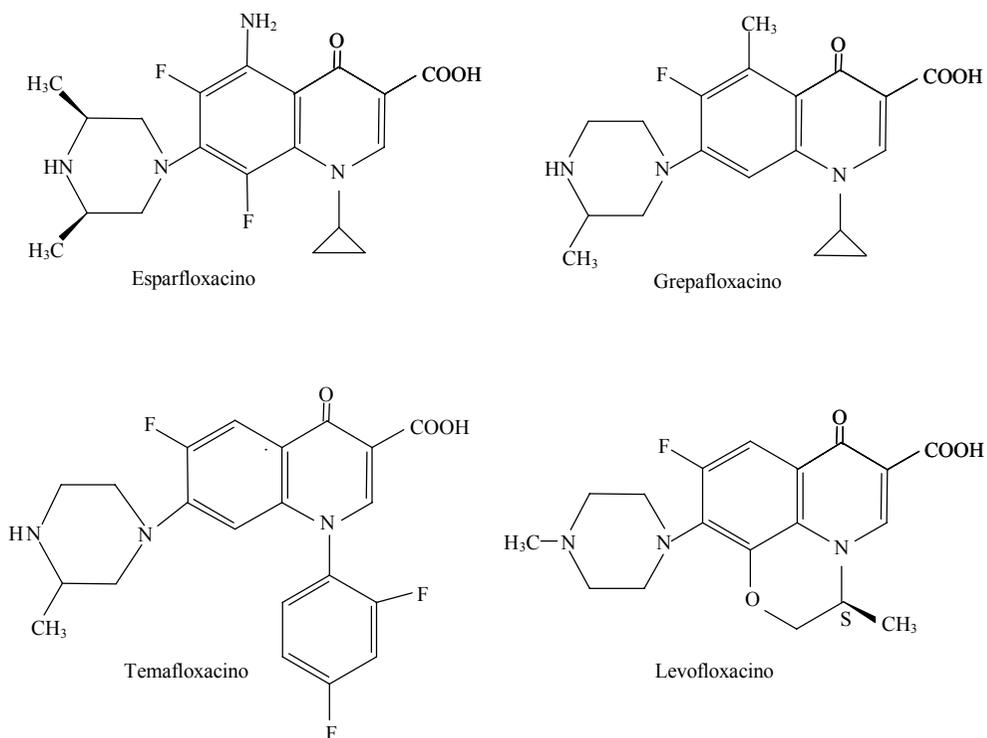
Por sus buenas propiedades, las quinolonas de segunda generación han sido probablemente los antimicrobianos más importantes en la quimioterapia antibacteriana durante las décadas 80 y 90 (27, 287). Se han utilizado ampliamente en clínica por su excelente actividad sobre *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* y otros bacilos Gram negativos aerobios (130). No obstante, todas las quinolonas de segunda generación tienen una limitación importante: son poco activas en cocos Gram positivos aerobios y apenas son eficaces sobre bacterias anaerobias. En consecuencia, no se han podido utilizar para el tratamiento de infecciones por *Streptococcus pneumoniae* ni en infecciones por microorganismos anaerobios. Con el fin de obviar este problema, la investigación ha llevado a cabo en los últimos años nuevas modificaciones en la molécula de la quinolona. Así, se han obtenido compuestos bi o trifluorados con mayor semivida plasmática y superior potencia antibacteriana *in vitro* sobre cocos Gram positivos y bacterias anaerobias. Las primeras son las quinolonas de tercera generación, y de cuarta generación las que además presentan actividad anaerobocida. Son muy bien toleradas y parecen destinadas a ocupar un lugar importante en terapéutica antiinfecciosa, fundamentalmente en procesos graves o producidos por bacterias con resistencia a otros antimicrobianos (143).

La tercera generación de quinolonas incluye compuestos con mayor complejidad estructural que los predecesores. Presentan mayor potencia frente a gérmenes Gram positivos (incluyendo *Streptococcus pneumoniae*) (240) y un espectro más amplio, que incluye patógenos anaerobios (11) y atípicos (140). Asimismo, presentan algunas ventajas farmacocinéticas

#### Antecedentes 14

respecto a las quinolonas de la segunda generación, como semividas de eliminación más prolongadas y mayor penetración tisular (149, 279).

Se incluyen en este grupo algunos derivados con varios átomos de flúor: **esparfloxacino**, **temafloxacino**, y **tosufloxacino**. También pertenecen a este grupo **grepafloxacino** y **levofloxacino**. Las estructuras de algunos de los compuestos mencionados se representan en la Figura 1.4.

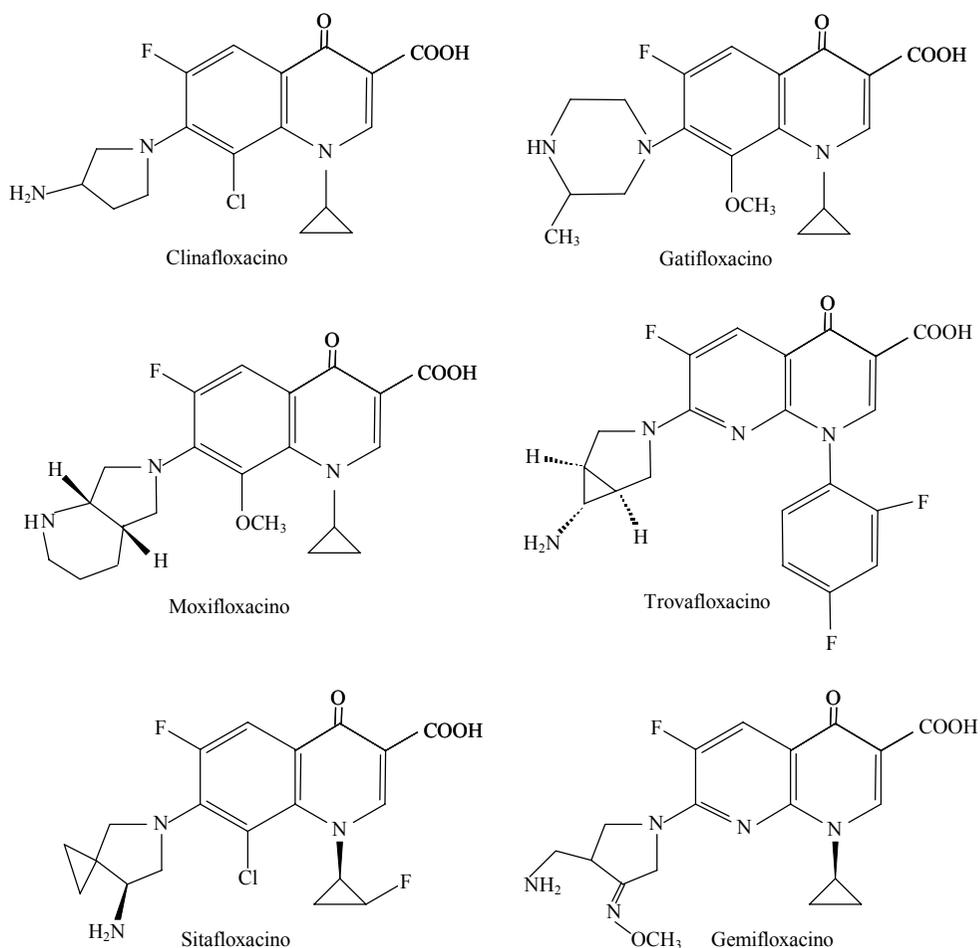


**Figura 1.4.** Constitución química de las principales quinolonas de tercera generación. La estructura base se indica en la Figura 1.1.

El grupo de las quinolonas de cuarta generación incluye compuestos que presentan una potencia similar a las de tercera generación frente a microorganismos Gram positivos, Gram negativos y atípicos, pero son más

potentes y actúan frente a un mayor número de patógenos anaerobios (11, 18, 26, 146). Desde el punto de vista farmacocinético presentan las mismas ventajas que sus predecesoras (278).

Pertencen a este grupo el **clinafloxacino**, **gatifloxacino**, **moxifloxacino**, **trovafloxacino**, **sitafloxacino** y **gemifloxacino**. Las estructuras de estos compuestos se presentan en la Figura 1.5.



**Figura 1.5.** Constitución química de las principales quinolonas de cuarta generación. La estructura base se indica en la Figura 1.1.

### **1.3. MECANISMO DE ACCIÓN Y RESISTENCIA BACTERIANA DE LAS QUINOLONAS**

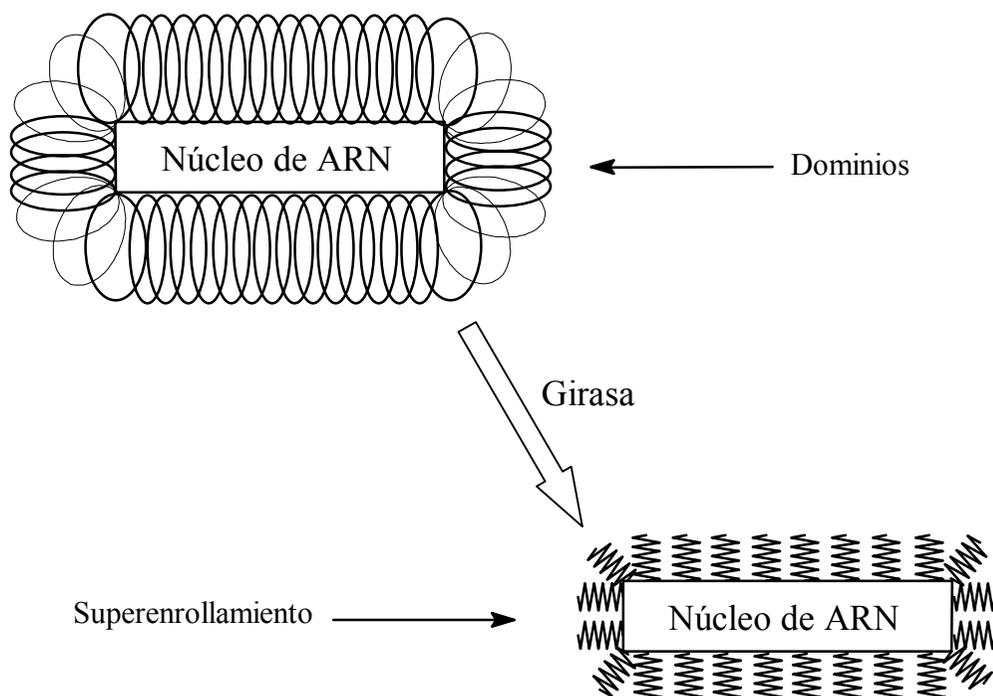
#### **1.3.1. Mecanismo de acción antibacteriana**

Las quinolonas ejercen su acción antibacteriana tras penetrar en el citoplasma bacteriano mediante un mecanismo de difusión pasiva a través de los canales acuosos transmembrana de las porinas, o de la capa de los lipopolisacáridos (219). Una vez dentro de la célula, actúan por mecanismos que son complejos y no del todo conocidos.

Aunque se conoce que las quinolonas están dotadas de acción bactericida, su mecanismo de acción no está, hasta el momento, totalmente esclarecido a pesar de que ha sido muy estudiado. Se cree que actúan inhibiendo la enzima ADN girasa de las células sensibles (78, 86). Esta enzima, descubierta en 1976 por Gellert y col. en *E. coli* (105), pertenece al grupo de las II topoisomerasas y es necesaria para la replicación del ADN, así como para ciertos aspectos de la transcripción, reparación, recombinación y trasposición del mismo. Por ello, a este grupo terapéutico se le engloba bajo la denominación de “inhibidores de la girasa”.

La función de la ADN girasa consiste en catalizar el superenrollamiento negativo del ADN circular de la bacteria, que es el estado natural en que se encuentra el cromosoma bacteriano. Para que el ADN pueda situarse en el espacio limitado del interior de la célula, dispone de unas 50-80 zonas especialmente organizadas que Worcel denominó “enrollamientos” o “dominios” (315), adosados a un núcleo central de ARN. Cada uno de estos dominios se condensa formando unos 400 “dominios de superenrollamiento”, cuyas espirales están dispuestas en sentido contrario a la hélice de ADN,

siendo, por tanto, un superenrollamiento negativo (negative superwisting) (258). En la Figura 1.6 se puede observar una propuesta de esquema para este proceso.



**Figura 1.6.** Esquema de los plegamientos sucesivos del ADN por la acción de la ADN girasa. Tomado de Smith (273).

En resumen, las quinolonas son agentes bactericidas que, como ya se ha comentado, inhiben la síntesis replicativa del ADN. Aunque este mecanismo de acción primario tiene una buena correlación con el efecto bactericida de estos compuestos (59, 273, 324), la capacidad de inhibir la síntesis del ADN no es suficiente para explicar la acción bactericida de las quinolonas.

## Antecedentes 18

En la búsqueda de una explicación y aunque durante muchos años se ha creído que la ADN girasa es la responsable de la separación de los cromosomas hijos y del superenrollamiento negativo del ADN, en 1990 se descubrió un homólogo de la girasa, la topoisomerasa IV (145). Actualmente está reconocido que la topoisomerasa IV, y no la girasa, es la responsable de la decatenación de los cromosomas hijos. Además, la topoisomerasa IV es también diana de las 4-quinolonas, que se creía actuaban sólo a través de la ADN girasa (166, 321).

En concreto, se han aislado e identificado cuatro topoisomerasas de *Escherichia coli*, cuyas principales reacciones se resumen a continuación:

➤ Topoisomerasa I. Fue la primera topoisomerasa que se descubrió en *E. coli* (305). Inicialmente conocida como proteína omega,  $\omega$ , es un polipéptido de 864 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 94 kDa (292). El gen que codifica esta enzima se denominó *topA* (291). Entre otras funciones, relaja el ADN superenrollado en ausencia de ATP.

➤ Topoisomerasa II (ADN girasa) (105), es la única enzima entre las topoisomerasas capaz de producir el superenrollamiento negativo del ADN relajado en una reacción dependiente de ATP.

➤ Topoisomerasa III. Identificada en *E. coli* por Dean y col. (68) es una cadena polipeptídica, codificada por el gen *topB*, con un peso molecular de 74 kDa que provoca la decatenación del ADN en ausencia de ATP (276). Recientemente (71), se ha observado que esta enzima puede actuar como ARN topoisomerasa, catalizando la interconversión del ARN circular y anudado; por ello se cree que esta topoisomerasa juega un papel importante en la topología molecular del ARN (304).

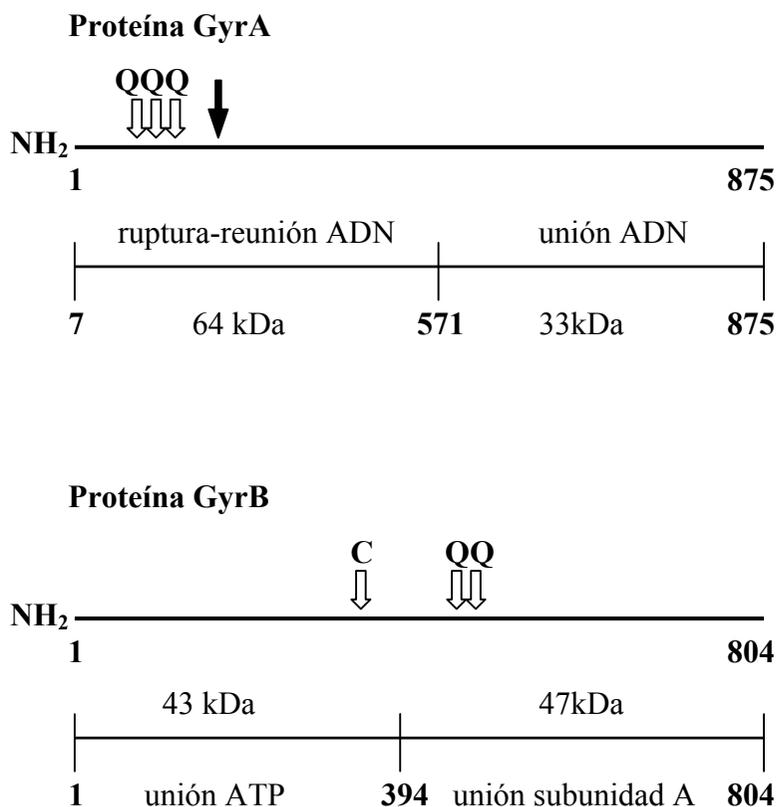
➤ Topoisomerasa IV (145) provoca la decatenación del ADN en presencia de ATP.

Las topoisomerasas son un grupo de enzimas necesarias para la viabilidad de todos los organismos, desde las bacterias hasta el hombre, puesto que controlan y modifican el estado topológico del ADN mediante rupturas transitorias y posterior unión del mismo (304). Para muchas topoisomerasas, un residuo específico de tirosina forma una unión covalente reversible con el extremo 5' o, menos frecuentemente, con el extremo 3' del ADN. Se dividen en dos clases dependiendo de si actúan en una hélice (tipo I) o en ambas (tipo II) del ADN (199). En cualquier caso, se cree que utilizan un mecanismo de puente enzimático, en el cual se forma un corte transitorio en una cadena de ADN, de tal forma que se abre un hueco entre las partes rotas que permite el paso de una segunda cadena de ADN o un segmento de doble cadena. Las topoisomerasas I y III son enzimas tipo I, mientras que girasa y topoisomerasa IV son enzimas de tipo II. En concreto, las topoisomerasas I, II y IV están implicadas en la eficacia de la replicación y transcripción del ADN (72) pero, mientras las topoisomerasas del tipo II son esenciales para el crecimiento bacteriano, las topoisomerasas de tipo I no lo son, puesto que su pérdida puede compensarse por alteración en los genes de las topoisomerasas del tipo II (72, 77). Conviene matizar que en las células de los mamíferos, las topoisomerasas I y III $\alpha$ , que pertenecen a la familia tipo I, sí resultan esenciales para el crecimiento y división celular *in vivo* (175, 202).

A nivel molecular la ADN girasa es un complejo tetramérico, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> (147) formado por dos monómeros A (GyrA) y dos monómeros B (GyrB) codificados por los genes *gyrA* y *gyrB*. Las subunidades GyrA y GyrB de *E.*

## Antecedentes 20

*coli*, son proteínas de 97 y 90 kDa, respectivamente, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*. Las proteínas GyrA y GyrB son las dianas de las 4-quinolonas y de las cumarinas, respectivamente. En la Figura 1.7 se muestra un esquema de la estructura de estas proteínas.



**Figura 1.7.** Representación esquemática de la estructura de las subunidades A y B de la ADN girasa de *E. coli*. Los números representan los residuos de aminoácidos. La Tyr-122 catalítica de la GyrA está representada por una flecha de color negro. Q determina la localización de las mutaciones resistentes a quinolonas. C muestra la posición de las mutaciones compensatorias. Tomado de Fisher y col. (93).

Para que la ADN girasa pueda ejercer su acción requiere la presencia de ambas subunidades y de ATP. En concreto, los monómeros A llevan a cabo los cortes en determinados puntos de la molécula de ADN y el posterior cierre de los puntos de ruptura, y los monómeros B inducen los superenrollamientos en torno al núcleo de ARN (105), se unen al ATP y participan en la transducción de la energía (127, 200). Parece que las quinolonas inhiben la acción de la ADN girasa a nivel de la subunidad A, aunque el ciprofloxacino podría también afectar a la subunidad B. Las quinolonas, al actuar sobre la subunidad A, impiden el cierre de los cortes producidos en el ADN, por lo que se inhibe la replicación del ADN. Dado que la inhibición de la ADN girasa impide la replicación, el efecto de las quinolonas debería ser bacteriostático, pero en realidad las quinolonas son bactericidas (35, 141, 174). Por tanto, parece que el mecanismo de acción de las quinolonas es mucho más complejo y conlleva otros efectos sobre la bacteria.

La topoisomerasa IV (145), otra enzima tipo II, es también un tetrámero,  $C_2E_2$  formado por dos subunidades C y dos E, codificadas por los genes *parC* y *parE*. Para ejercer su acción, al igual que la ADN girasa, también precisa la presencia de las dos subunidades y de ATP.

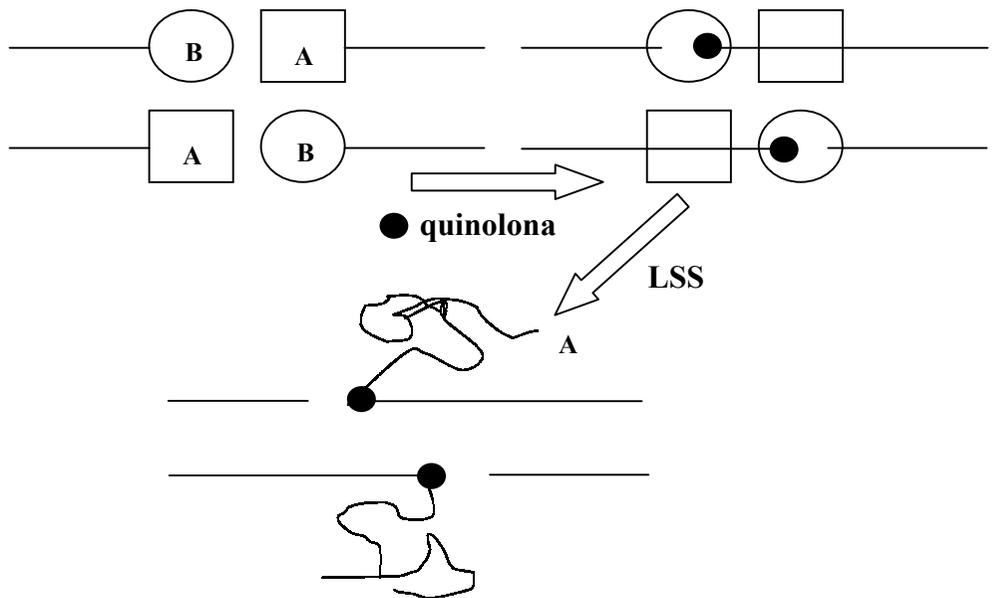
Resulta interesante el estudio que demuestra que la secuencia de aminoácidos codificados por los genes *parC* y *parE* son homólogos a los codificados por GyrA y GyrB (las dos subunidades de la ADN girasa), respectivamente (145). Secuencias similares se sitúan especialmente alrededor de la región de la ADN girasa conocida como región determinante en la aparición de resistencias bacterianas a las quinolonas (QRDR, del inglés “quinolone resistance-determining regions”) (206). Esta similitud en la

## Antecedentes 22

secuencia de aminoácidos entre la ADN girasa y la topoisomerasa IV, especialmente en las posiciones productoras de resistencias a quinolonas de la proteína GyrA de la girasa, implica que las quinolonas pueden ser capaces de inhibir la actividad de la topoisomerasa IV tanto como la de la ADN girasa (318).

En resumen, la acción de las quinolonas consiste en inhibir ambas enzimas, la ADN girasa y la topoisomerasa IV, formando un complejo ternario entre fármaco, enzima y ADN (“cleavage”) (55, 268), que tratado con detergente y proteinasa K genera roturas en la doble hélice de ADN (79). De igual modo, se cree que el proceso celular que actúa en el complejo ternario formado *in vivo* produce una inhibición de la síntesis del ADN rápida y reversible, cese del crecimiento, e inducción de la respuesta SOS, que consiste en un complejo mecanismo de reacción que actúa como respuesta a las acciones que pueden dañar el ADN (170). A dosis más elevadas de antibiótico se cree que tiene lugar la muerte celular por una rotura irreparable de la doble hélice de ADN (55, 79, 105, 145, 199). La naturaleza reversible del complejo ternario formado y la posterior muerte celular es importante para comprender y explicar los efectos fisiológicos de las quinolonas como agentes bactericidas (55), aunque conviene recordar que esta explicación esta basada en hipótesis. Además, puesto que ambas enzimas tienen funciones distintas en la célula bacteriana, la respuesta a las quinolonas por parte del microorganismo difiere según cual sea la primera diana en cada caso (79). Esto tiene mucha trascendencia puesto que estudios en *E. coli* han sugerido que la girasa actúa antes de la replicación de la horquilla, mientras que la topoisomerasa IV actúa predominantemente después, de forma que existe un intervalo de tiempo que permite reparar el daño en el ADN inducido por la

quinolona (321). Este escenario predice que la formación del complejo “cleavage” a través de la girasa proporcionaría una muerte rápida de la bacteria, mientras que a través de la topoisomerasa IV sería un proceso lento (148). En la Figura 1.8 se muestra un esquema de la formación del complejo ternario que resulta en una inhibición de la replicación del ADN y conduce a la generación de rupturas de la doble hélice de ADN y la subsiguiente muerte celular.



**Figura 1.8.** Esquema de la formación del complejo “cleavage” por las quinolonas con la girasa sobre el ADN. *A* y *B*: subunidades *GyrA* y *GyrB*, respectivamente. *LSS*: dodecil sulfato sódico. Tomado de Fisher y col. (93).

Atendiendo a los factores fisiológicos que se requieren en las quinolonas para que éstas ejerzan su acción bactericida, se han descrito cuatro mecanismos de acción conocidos como: A, B, B<sub>1</sub> y C, que varían

#### Antecedentes 24

según la quinolona y el microorganismo considerados (50, 168, 169, 173, 174, 247, 248). El mecanismo **A**, común a todas las quinolonas, requiere, para actuar, que la bacteria esté multiplicándose y que presente síntesis de ARN y proteínas. Este mecanismo es el único que se manifiesta en las quinolonas clásicas, como el ácido nalidíxico y el ácido oxolínico (70, 173, 309). Las fluoroquinolonas, además del mecanismo A, pueden presentar el mecanismo B y el C. El mecanismo **B** no requiere que se produzca síntesis de proteínas o de ARN en la bacteria para ejercer su efecto bactericida (50, 174, 247). La existencia de este último mecanismo, independiente de la síntesis de proteínas, se basa en que algunas quinolonas como el ciprofloxacino y el ofloxacino, administradas a dosis elevadas o en presencia de sustancias que inhiben la síntesis proteica o del ARN (rifampicina, cloranfenicol), e incluso en condiciones anaerobias, apenas alteran su efecto bactericida (171, 247, 273). Se ha identificado un mecanismo relacionado únicamente con clinafloxacino. Este mecanismo, conocido como **B<sub>1</sub>**, no precisa la síntesis de proteínas o ARN, pero necesita que la bacteria se esté multiplicando (169). Por último, el mecanismo **C** requiere que haya síntesis de proteínas y ARN para actuar, pero no hace falta que la bacteria se esté multiplicando (168). Este mecanismo se ha encontrado en norfloxacino (248) y enoxacino (168).

El hecho de que una fluoroquinolona presente un mecanismo de acción frente a una especie bacteriana no significa que lo presente frente a todas, puesto que éste depende de la quinolona y del microorganismo estudiado. Lo que sí está bastante aceptado es que la posesión de más de un mecanismo de acción puede explicar el hecho de que las fluoroquinolonas sean más potentes que las quinolonas clásicas, que sólo actúan a través del mecanismo A (245). Así por ejemplo, Lewin y Smith (173), han propuesto

como posible explicación de la menor actividad bactericida que presenta el ciprofloxacino sobre los estafilococos, en comparación con la actividad que muestra sobre *E. coli*, la ausencia del mecanismo B del ciprofloxacino sobre los primeros.

Dentro de este apartado, y puesto que no se considera como un mecanismo de resistencia, sino más bien como un modo de acción peculiar que presentan las quinolonas, conviene recordar que en algunas cepas bacterianas estos fármacos, a elevadas concentraciones, muestran una incapacidad para matar a las células bacterianas tan efectivamente como lo hace a concentraciones moderadas. De hecho, cuando se evalúa la actividad bactericida de las quinolonas a diferentes concentraciones en un período dado de tiempo, se ha observado, con frecuencia, que la proporción de bacterias supervivientes sigue una respuesta bifásica: en una primera fase al aumentar la concentración de fármaco, aumenta su actividad bactericida hasta alcanzar un máximo a partir del cual, su actividad disminuye con el incremento de la concentración. Al hecho de que a una concentración de fármaco superior a un determinado nivel, la actividad bactericida disminuya se le conoce como **efecto paradójico** y es uno de los mayores dilemas que existen sobre la actividad de las quinolonas (51). Este modo particular de acción se ha observado y estudiado en varias especies bacterianas (51, 172) y en un gran número de quinolonas (35, 141, 168, 169, 173, 174, 273).

Eagle, en 1948 (81), ya describió este efecto en la penicilina, y posteriormente otros autores lo describieron en otros antibióticos betalactámicos y aminoglucósidos (182, 266), aunque siempre de forma aislada, como característica propia de especie o cepa. En el caso particular de las quinolonas el efecto paradójico se presenta de forma más generalizada. En

1970, Winshell y Rosenkraz (309) observaron este fenómeno en el ácido nalidíxico al actuar sobre *E. coli*. En 1975, Crumplin y Smith (51) describieron también esta acción del ácido nalidíxico frente a varias cepas de *E. coli* y otras especies patógenas del tracto urinario y *Enterobacteriaceae*, proponiendo que, para el ácido nalidíxico, el efecto paradójico no es específico de cepa o especie, sino un fenómeno característico de su modo de actuar. Posteriormente se ha descrito en diversas fluoroquinolonas, como el ciprofloxacino, el ofloxacino, el enoxacino, el fleroxacino, el lomefloxacino y el norfloxacino entre otras (35, 141, 168, 273), lo que hace pensar que efectivamente, es un efecto característico de las quinolonas en general.

Para explicar este efecto se han propuesto varias hipótesis. La más aceptada se basa en la inhibición de la síntesis de ARN y de algunas proteínas que se observa a altas concentraciones de fármaco (186). Se cree que esta inhibición puede interferir en la eliminación letal de los complejos que contienen ácido nalidíxico y de esta forma originar el efecto paradójico. Sin embargo, ésta no es una explicación satisfactoria para comprender el comportamiento de quinolonas como ciprofloxacino, puesto que a altas concentraciones estos agentes matan la célula predominantemente de un modo que no se bloquea por la inhibición de la síntesis de proteínas (55). De este modo la pérdida de letalidad a altas concentraciones de quinolona permanece inexplicada.

### **1.3.2. Mecanismos de resistencia bacteriana**

Las bacterias resistentes a las quinolonas aparecen en clínica como resultado de la terapia con las mismas. Para ejercer su efecto citotóxico las

quinolonas deben penetrar la membrana bacteriana para alcanzar su diana celular, ADN girasa o topoisomerasa IV, y de esta forma inducir la muerte celular. Por ello, en un principio, las resistencias a las quinolonas pueden ser debidas a mutaciones que afecten cualquier paso de este proceso. Así, aunque se han descrito varios mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas, éstos pueden agruparse en tres grupos:

1.- Resistencias de tipo cromosómico que dan lugar a mutaciones de los cromosomas en segmentos definidos de los genes que se traducen en alteraciones en la ADN girasa (especialmente en la subunidad A) y topoisomerasa IV, dando lugar a las QRDR (206, 312).

2.- Resistencias por alteraciones en la membrana externa bacteriana que disminuyen la penetración intracelular del fármaco. Estas modificaciones se originan por alteraciones de los genes que codifican los canales de las porinas, lo que impide la entrada del quimioterápico en la bacteria.

3.- Resistencias basadas en la secreción (efflux) que provocan la extracción del antibacteriano desde el medio intracelular al extracelular por acción de transportadores activos endógenos.

Sin embargo, no se han descrito enzimas bacterianas capaces de degradar o inactivar las quinolonas (312).

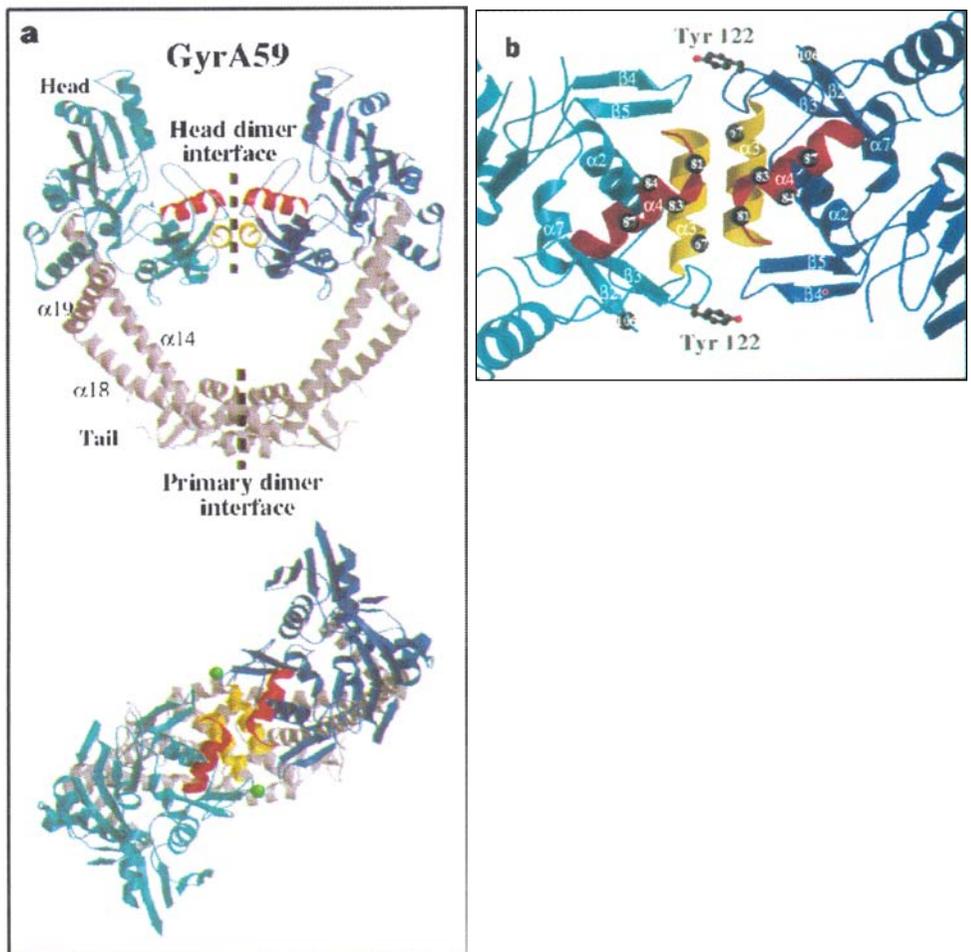
En relación al primer mecanismo mencionado, los primeros estudios, centrados en *Escherichia coli*, demostraron que la resistencia a las quinolonas se produce normalmente por mutaciones en regiones definidas de las proteínas GyrA o GyrB (52, 318, 319). Las mutaciones en las regiones equivalentes de las proteínas ParC o ParE tienen lugar tras aquellas producidas en la girasa y se asocian con altos niveles de resistencia a estos

fármacos (126). En esta observación se fundamenta la conclusión de que la girasa es la principal diana de las quinolonas.

En la Figura 1.9 se muestra la estructura cristalina del dominio ruptura-reunión de la proteína GyrA de *E. coli* (201). GyrA59K cristaliza como dímero, y es el mínimo fragmento de la subunidad A que al unirse con la subunidad B presenta actividad “DNA-cleavage”. Cada monómero GyrA está compuesto por una cabeza N-proximal y una cola C-proximal. La proteína GyrA es del tipo “helix-loop-helix”, compuesta por las hélices  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$ , que adopta diferentes conformaciones para permitir la apertura y cierre de lugares determinados por los que debe pasar el ADN. Se cree que la girasa interactúa con el ADN a través de la hélice  $\alpha_4$ . Un detalle importante es que las zonas en las que se producen las mutaciones frente a las quinolonas en la proteína GyrA (residuos 67, 81, 83 y 87) se sitúan cerca de la región de ruptura-reunión de esta proteína y de la tirosina activa (Tyr-122), lo que confirma que estos fármacos deben interactuar con el complejo girasa-ADN.

Sin embargo, estudios posteriores con *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* han rebatido la idea de que la girasa era la principal diana de las quinolonas (91, 217, 226-228, 230), puesto que a pesar de que en *E. coli* y en otras bacterias Gram negativas, como por ejemplo *Neisseria gonorrhoeae* y *Pseudomonas aeruginosa*, las quinolonas tienen como primera diana la ADN girasa (7, 79, 132), en algunas bacterias Gram positivas la situación es la inversa: las primeras resistencias tienen lugar por mutaciones producidas en la topoisomerasa IV, mientras que las mutaciones en la girasa proporcionan resistencias adicionales (79, 132). De este modo, en *S. aureus*, la topoisomerasa IV (cuyas subunidades se conocen como GrlA y GrlB en esta especie) es la primera diana de las quinolonas (91). Sin embargo

en *S. pneumoniae*, la actividad bactericida puede producirse a través de girasa, topoisomerasa IV o ambas, dependiendo de la estructura de la quinolona (228, 230). Esto indica que la relación estructura-actividad puede ser diferente para cada especie bacteriana.



**Figura 1.9.** a Estructura cristalina del dominio ruptura-reunión de la proteína GyrA de *E. coli*. La cabeza N-proximal se presenta en color azul. La “helix-loop-helix” en color amarillo ( $\alpha_3$ ) y rojo ( $\alpha_4$ ). La cola C-proximal en color gris. Las tirosinas activas, Tyr-122, se muestran como esferas verdes. b Las zonas que confieren resistencia a las quinolonas se muestran como esferas negras. Tomado de Morais Cabral y col. (201).

### Antecedentes 30

Debido a la aparición de resistencias, y en la búsqueda de nuevas sustancias, las fluoroquinolonas se han estudiado fundamentalmente en *Streptococcus pneumoniae* durante los últimos años, puesto que se considera como la principal causa de neumonía en la comunidad, además de estar implicado con frecuencia en exacerbaciones de bronquitis crónica y de meningitis, otitis media aguda y sinusitis (16). Así, según el orden de las consecutivas mutaciones QRDR en las topoisomerasas de mutantes resistentes seleccionados en *S. pneumoniae*, las quinolonas se pueden agrupar en tres clases (228, 230). El primer grupo, inicialmente identificado con **ciprofloxacino**, que incluye también a **levofloxacino**, **norfloxacino**, **pefloxacino** y **trovafloxacino**, induce mutaciones QRDR en la topoisomerasa IV antes que en la girasa, lo que sugiere que estos fármacos actúan preferentemente a través de la topoisomerasa IV *in vivo* (98, 204, 226, 227). En cambio, un segundo grupo de quinolonas, como **esparfloxacino**, **grefloxacino**, **gatifloxacino**, **moxifloxacino** y **NSFQ-105** (homólogo del ciprofloxacino con un grupo 4-(4-aminofenilsulfonil)-1-piperacínilo en C<sub>7</sub>) produce mutaciones en la girasa antes que en la topoisomerasa IV, lo que señala como su diana principal la girasa (9, 98, 230, 238). Finalmente, **clinafloxacino** y **gemifloxacino** actúan a través de ambas dianas, girasa y topoisomerasa IV (125, 228), pues aunque generan en primer lugar mutaciones QRDR en *gyrA* o *gyrB*, esta mutación simple se produce con poca frecuencia y a bajo nivel, lo que indicaría que ambas contribuyen de forma importante en la acción del fármaco (124, 228).

En conjunto estos resultados demuestran que la estructura de las quinolonas determina su modo de acción en *S. pneumoniae* (9, 230); así recientemente se han descrito en la bibliografía nuevas sustituciones en las

posiciones C<sub>7</sub> y C<sub>8</sub> que cambian la primera diana de acción de las quinolonas de topoisomerasa IV a girasa o a ambas y mejoran, por tanto, en gran medida, la actividad antibacteriana comparada con las quinolonas del grupo de ciprofloxacino (9, 322).

En particular, el sustituyente de la posición 7 determina no sólo la potencia sino también la diana preferente de las fluoroquinolonas, como demuestra el trabajo publicado por Alovero y col. (9) que estudia el mecanismo de acción de una nueva serie de fluoroquinolonas idénticas al ciprofloxacino excepto por la adición de un grupo bencenosulfonamida en el anillo piperacínico de la posición 7. Este trabajo establece que el aumento de la potencia que muestran estos compuestos, en especial el derivado **NSFQ-105**, con respecto a su homólogo se asocia con la preferencia de la girasa como primera diana. A esta conclusión se llega tras observar que cepas mutantes en *parC* resistentes a ciprofloxacino permanecen sensibles a NSFQ-105, mientras que por el contrario las cepas con mutaciones en *gyrA* son resistentes a NSFQ-105 y sensibles a ciprofloxacino. Ésto demuestra que una modificación simple en el C<sub>7</sub> de este compuesto es suficiente para hacer que la diana preferente de estos nuevos derivados cambie de topoisomerasa IV a girasa. Este estudio confirma el modelo propuesto por Shen y col. (268) que ya postulaba la idea de que el sustituyente en C<sub>7</sub> está relacionado con las interacciones fármaco-enzima, conclusión que establecieron tras observar que las quinolonas con diferentes sustituyentes en la citada posición mostraban diferentes actividades inhibitoras de la ADN girasa *in vitro*. También otros estudios muestran que la adición de un grupo metilo en el anillo piperacínico del C<sub>7</sub> de las quinolonas aumenta en gran medida la actividad inhibitora de las mismas en las topoisomerasas II de los mamíferos (111), lo que

## Antecedentes 32

demuestra que el sustituyente de la posición 7 establece contactos críticos con la enzima que determina el reconocimiento de la diana bacteriana *in vivo* e *in vitro*.

Por otro lado, el sustituyente de la posición 8 de las fluoroquinolonas parece favorecer la acción de éstas a través de la girasa en *S. pneumoniae*. A esta conclusión se llega al observar que **esparfloxacino** y **clinafloxacino**, que actúan a través de la girasa, tienen un átomo de flúor y un átomo de cloro como sustituyente en la posición C<sub>8</sub>, respectivamente, mientras que **ciprofloxacino** y **trovafloxacino** no presentan ningún sustituyente en dicha posición y ambas actúan a través de la topoisomerasa IV en esta especie. No se sabe si estas preferencias se deben a un aumento de la afinidad por la diana o a un aumento de la letalidad, como se ha descrito para una serie de derivados 8-metoxi del ciprofloxacino en mutantes de *E. coli* (322). Además se cree que el sustituyente en C<sub>8</sub> hace a las fluoroquinolonas especialmente activas frente a cepas resistentes por mutaciones en girasa y topoisomerasa IV en *S. pneumoniae*, como demuestra un estudio realizado con **moxifloxacino**, que tiene un grupo metoxi en la citada posición (238). Otro estudio reciente con **gatifloxacino** (que también posee un grupo metoxi en C<sub>8</sub>) en el citado microorganismo, llega a esta misma conclusión, estableciendo que el grupo 8-metoxi contribuye al aumento de la actividad antibacteriana frente a cepas con mutaciones en las dianas, tanto como en la cepa libre de mutaciones (99).

Por último cabe también comentar un trabajo muy reciente que demuestra que en *S. aureus* la presencia del grupo metoxi en C<sub>8</sub> disminuye significativamente la tendencia al desarrollo de resistencias a las quinolonas

en esta especie en comparación con quinolonas con diferentes sustituyentes en esta posición (64).

Conviene destacar que el hecho de que diferentes quinolonas tengan distintas dianas en la misma especie bacteriana tiene implicaciones importantes en la práctica clínica. Para varios autores (217, 226) lo más deseable es una quinolona que actúe por igual a través de ambas dianas, puesto que las resistencias requieren la selección de dos mutaciones, una en cada diana, lo que ocurre con poca frecuencia. Este hecho explicaría la mejora en la actividad antineumocócica de **clinafloxacino** y **gemifloxacino** con respecto a las anteriores quinolonas.

De este modo, aunque los grupos responsables de la elección de la interacción de las quinolonas con girasa o topoisomerasa IV no se conocen, puesto que las diferencias entre los compuestos hacen difícil discernir la molécula determinante que rige la selección de la diana, sería posible diseñar quinolonas que actuaran selectivamente en una u otra enzima o en ambas a la vez. Por ejemplo, mutantes en *parC* (y no en *gyrA*) son resistentes a **ciprofloxacino** pero sensibles a **esparfloxacino**. Así, la elección de la quinolona adecuada junto al conocimiento del estado de las QRDR en *parC* y *gyrA* puede ser muy útil para evitar las resistencias a las quinolonas en *S. pneumoniae* (230).

Por otro lado, como se ha comentado al principio de este epígrafe, las mutaciones QRDR en la girasa o topoisomerasa IV no son los únicos mecanismos que desarrollan los microorganismos frente a la acción de los agentes antibacterianos, pues las resistencias a las quinolonas pueden estar condicionadas también por los procesos de transporte a través de la

#### Antecedentes 34

membrana (222). Así, el papel fundamental que ejercen los canales de las porinas en la difusión de la quinolona a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas según el tamaño y la carga característica de las quinolonas hidrofílicas, quedó respaldado por la observación de que varios mutantes que mostraban resistencias a estos agentes, tenían en común la reducción del número de OmpF, la principal y mayor proteína de las porinas de la membrana externa de *E. coli* (44), lo que demuestra que las quinolonas hidrofílicas deben de entrar en la célula bacteriana, al menos en parte, a través del canal de la porina OmpF.

Como norma general se considera que un tamaño voluminoso, la carga negativa y un aumento de la hidrofobicidad retrasan la penetración de los antibacterianos en los microorganismos Gram negativos a través de los canales de las porinas (119). Por otro lado, las moléculas hidrofóbicas parecen utilizar una ruta alternativa de difusión a través de lipopolisacáridos (54, 219). Algunos autores (19) han demostrado que la hidrofobicidad de los compuestos parece tener relevancia tanto en Gram positivos como en Gram negativos, mientras que el elevado peso molecular es un factor limitante sólo para los microorganismos Gram negativos.

Conviene destacar que cepas mutantes Mar (del inglés “multiple antibiotic resistant”) de *E. coli* expresan resistencias mediadas por cromosomas a una gran variedad de antibióticos hidrofóbicos e hidrofílicos estructuralmente no relacionados. Entre los cambios en la membrana externa de los mutantes Mar, la porina OmpF se encuentra reducida de una manera importante. Ésto significa que la reducción de OmpF requiere mutaciones en la región *marA* (45), o lo que es lo mismo, mutaciones en el locus *marA* confieren resistencias a varios grupos de antibióticos, entre ellos las

quinolonas, por un mecanismo que reduce la permeabilidad al disminuir la expresión de la OmpF, con lo que se concluye que la expresión de la OmpF está regulada por la región *marA*. Estas mutaciones que afectan a la permeabilidad confieren bajos niveles de resistencia a las quinolonas (aumento de 2 a 4 diluciones  $\log_2$  de la CMI), pero se producen habitualmente resistencias cruzadas con otros antibióticos estructuralmente no relacionados (44).

Posteriormente, se conoció la implicación en las resistencias a quinolonas del tercer mecanismo señalado, que implica a las bombas de secreción activa. Las quinolonas son sustratos de estos transportadores que actúan extrayendo el fármaco desde el medio intracelular al extracelular e impiden así la acumulación. A este proceso se le conoce como “efflux”.

El sistema de secreción se sitúa en la membrana interna de los microorganismos y cataliza un proceso dependiente de energía ligado a un gradiente de protones (43). En *E. coli* este sistema de transporte denominado AcrAB, es una bomba de flujo multifármaco que extrae de la célula una amplia variedad de antibióticos, incluidas las quinolonas y otras sustancias (221). Este sistema AcrAB está compuesto por el transportador AcrB y la proteína periplásmica accesoria AcrA. Se cree que AcrA, de forma alargada, aproxima las membranas externa e interna, formando un trímero que interacciona con el monómero AcrB, bombeando así una amplia variedad de sustancias, presumiblemente a través del canal TolC de la membrana externa (220).

El sistema AcrAB está codificado por los genes *acrAB*, y se cree que tiene una función fisiológica en *E. coli*, como es proteger a la célula frente a sales biliares y ácidos grasos, tóxicos habituales de su entorno fisiológico

### Antecedentes 36

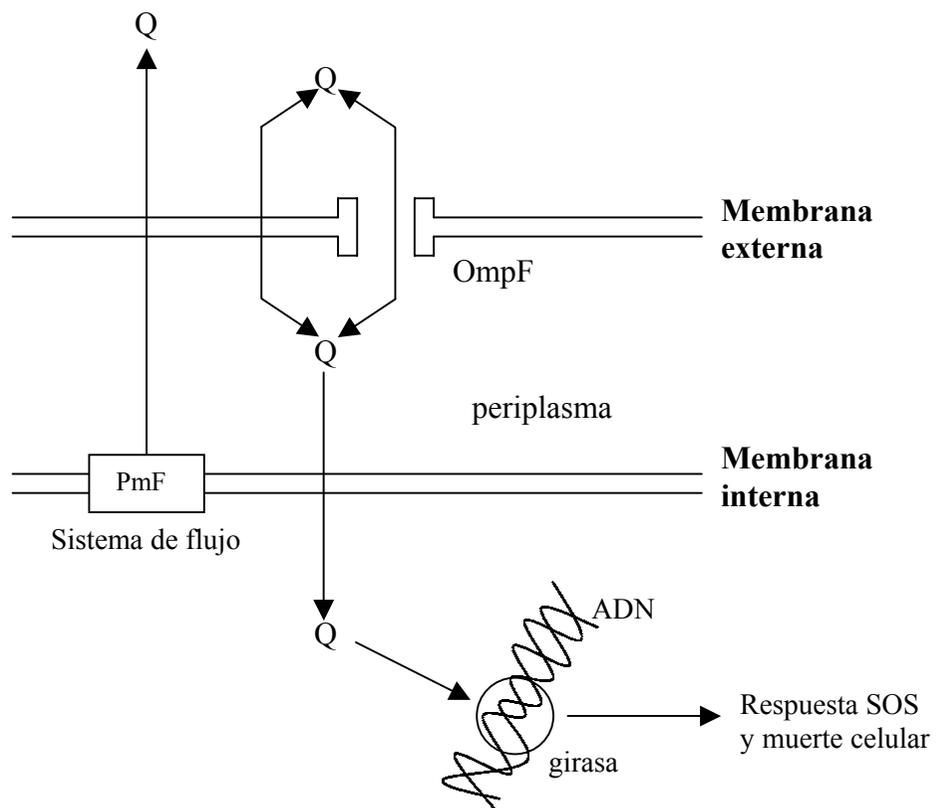
(183). Es importante destacar que la expresión de los genes *acrAB* aumenta de forma considerable en los mutantes Mar, lo que implica que el locus *marA* de *E. coli* regula, no sólo la expresión de la porina OmpF, sino también la expresión de la bomba AcrAB (183). Es decir, los mutantes Mar pueden presentar resistencias debido a una disminución de la permeabilidad de la membrana externa, y una importante secreción activa a través de la membrana interna, lo que repercute en una disminución de la entrada de fármaco y un aumento de la salida del mismo y, como consecuencia, una disminución de la sensibilidad a éste. Un esquema de este proceso de entrada y salida del antibiótico se representa en la Figura 1.10.

Entre las bacterias Gram positivas, se han identificado bombas de flujo en *Bacillus subtilis* (Bmr) (215) y *Staphylococcus aureus* (NorA) (297, 320).

El gen *bmr* codifica el transportador multifármaco Bmr de *B. subtilis*. Este transportador, al igual que el AcrAB de *E. coli*, bombea al exterior de la célula compuestos tóxicos de estructura diversa (214). Se ha comprobado que la sobreexpresión del gen *bmr* en este microorganismo proporciona resistencias elevadas a múltiples fármacos, incluidas las fluoroquinolonas. Este transporte puede revertirse con reserpina, que se comporta como inhibidor del transportador Bmr (3).

En cuanto a *S. aureus*, algunas de las resistencias pueden asociarse a un aumento de la transcripción del gen *norA* (320). El gen *norA* codifica las proteínas de membrana responsables de procesos de secreción dando lugar a resistencias en *S. aureus* y *E. coli* (216, 320), es decir, el nivel de expresión de este gen también es determinante de la sensibilidad que presentan las

bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, a las quinolonas. El efecto de la expresión del gen *norA* en la actividad de éstas depende de su afinidad por el transporte NorA, que se manifiesta fundamentalmente para las fluoroquinolonas hidrofílicas y confiere bajo nivel de resistencias (320). Cabría destacar que la proteína Bmr de *Bacillus subtilis* es muy similar a la proteína NorA de *S. aureus*, tanto estructural como funcionalmente (215).



**Figura 1.10.** Entrada y *efflux* de las quinolonas en *E. coli*. *Q* abreviatura de quinolona. *PmF* representa fuerza protón motriz.

Recientemente también se ha descrito un mecanismo de secreción como causa de bajos niveles de resistencia a las quinolonas en *S. pneumoniae* (32). A la bomba responsable de esta acción se le denominó bomba PmrA (del inglés “pneumococcal multidrug resistance protein”) (109). Se trata también de una proteína asociada a la membrana que se inhibe con reserpina, aunque las bases genéticas de este mecanismo no se conocen.

Se han descrito otros transportadores similares que afectan a la sensibilidad a las quinolonas en otras especies bacterianas, como por ejemplo el gen *mexABoprK* de *Pseudomonas aeruginosa* que proporciona resistencias a ciprofloxacino y ácido nalidíxico (242).

En resumen, la expresión de los transportadores de secreción puede determinar los niveles de sensibilidad antimicrobiana y está reconocido como causa de resistencias de bajo nivel a las quinolonas. Además, la baja afinidad de algunas quinolonas por estos transportadores contribuye a aumentar su potencia (132). Por otro lado, dado que este efecto es concentración dependiente determina al menos en parte que las fluoroquinolonas presenten mayor letalidad a concentraciones bajas y ello dificulta el que la bacteria desarrolle mutaciones en los cromosomas que puedan conducir a altos niveles de resistencia (237).

Dada la trascendencia de estos hallazgos se ha intentado establecer una relación entre los procesos de secreción y la estructura de las quinolonas. Varios autores (216, 320) consideran que el gen *norA* es el principal responsable de los altos niveles de resistencia a las quinolonas hidrofílicas. Sin embargo, estudios en *S. aureus* (284) han demostrado que la hidrofilia de las quinolonas no es un factor exclusivo y han argumentado que la actividad

en cepas resistentes se correlaciona mejor con el volumen del sustituyente en C<sub>7</sub> y el volumen e hidrofobia del sustituyente en C<sub>8</sub>. Por último, otros autores (32) apoyan la idea de que las fluoroquinolonas hidrofóbicas son sustratos pobres de la bomba de secreción neumocócica.

En resumen, se puede afirmar que los mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas incluyen mutaciones en los genes que codifican la ADN girasa y topoisomerasa IV, alteraciones en la permeabilidad de la membrana y un flujo activo de los antimicrobianos desde las células al exterior. Este proceso de secreción puede permitir que las bacterias sobrevivan durante un corto periodo de tiempo para poder desarrollar posteriormente resistencias a las quinolonas vía mutaciones en los lugares clave de los genes de las dianas de estos agentes antibacterianos. Estos mecanismos de resistencia pueden manifestarse solos o en combinación, si bien se cree que *in vivo* el aumento en los niveles de resistencia a las quinolonas debe ser producto de varios mecanismos simultáneos.

#### **1.4. EFECTO POSTANTIBIÓTICO DE LAS QUINOLONAS**

Efecto postantibiótico (EPA) es el término utilizado para describir la persistencia de la inhibición del crecimiento bacteriano tras una corta exposición del microorganismo a los agentes antimicrobianos. Es un fenómeno asociado a la actividad inhibidora de la mayor parte de las sustancias con acción antimicrobiana y se produce cuando éstas se ensayan a concentraciones iguales o superiores a la CMI (48). El EPA se demuestra por

#### Antecedentes 40

seguimientos microbiológicos de la cinética de crecimiento después de la eliminación del antimicrobiano.

Se ha observado EPA con la mayoría de las familias de antibacterianos (235) y con varios antisépticos (144) y antifúngicos (296), aunque la mayoría de los estudios publicados se refieren a los antimicrobianos más utilizados en la práctica médica, como son betalactámicos, aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas.

La duración del EPA está influida, principalmente, por el tipo de microorganismo y antimicrobiano, así como por la concentración del mismo y la duración de la exposición (234).

En general, después de una hora de exposición a concentraciones entre la CMI y diez veces la CMI, la duración del EPA oscila entre una y dos horas. En los casos en que se han observado EPA largos (más de tres horas), éstos se han conseguido con concentraciones de antimicrobiano de 400 a 600 veces la CMI.

Las quinolonas tienden a producir, por lo general, EPA largos sobre las bacterias Gram negativas, con la excepción del ciprofloxacino sobre *Enterobacter aerogenes* y el lomefloxacino sobre *E. coli*, cuyos EPA son siempre menores de 1,5 horas (235), y de duración intermedia sobre las bacterias Gram positivas.

El estudio del EPA viene reforzado por sus implicaciones clínicas ya que los microorganismos durante la fase EPA pueden tener mayor sensibilidad a bajas concentraciones de antimicrobiano y mayor sensibilidad a la acción antimicrobiana de los leucocitos polimorfonucleares, así como disminuída su actividad hemolítica y producción de toxinas. La duración del EPA influye mucho a la hora de establecer la dosificación de los

antimicrobianos. Así, se ha sugerido que el intervalo óptimo de dosificación no debería ser más largo que la suma del tiempo en que la concentración de antibiótico en suero excede la concentración mínima inhibidora (CMI) más la duración del EPA. Consecuentemente, los antimicrobianos con una elevada actividad inhibidora y un EPA largo podrían permitir una dosificación más espaciada sin pérdida de efectividad en el tratamiento, lo cual podría ser óptimo en términos de eficacia, toxicidad y coste económico. Los estudios del EPA de los antibióticos son, por tanto, clínicamente importantes.

## **1.5. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LAS QUINOLONAS**

Desde el momento de su introducción, a finales de los años setenta, las fluoroquinolonas han alcanzado gran importancia en la quimioterapia antibacteriana en todo el mundo (287), debido a que parecían ofrecer potencialmente todos los atributos que aportaría un agente antibacteriano ideal. En efecto, se pueden administrar en formas de dosificación oral y parenteral; poseen un amplio espectro de actividad que incluye bacterias Gram negativas y Gram positivas aerobias, anaerobias e incluso micobacterias; alcanzan elevados niveles en plasma y tejidos; gozan de buena estabilidad biológica y química; y presentan una incidencia relativamente baja de efectos secundarios graves (61, 197, 312).

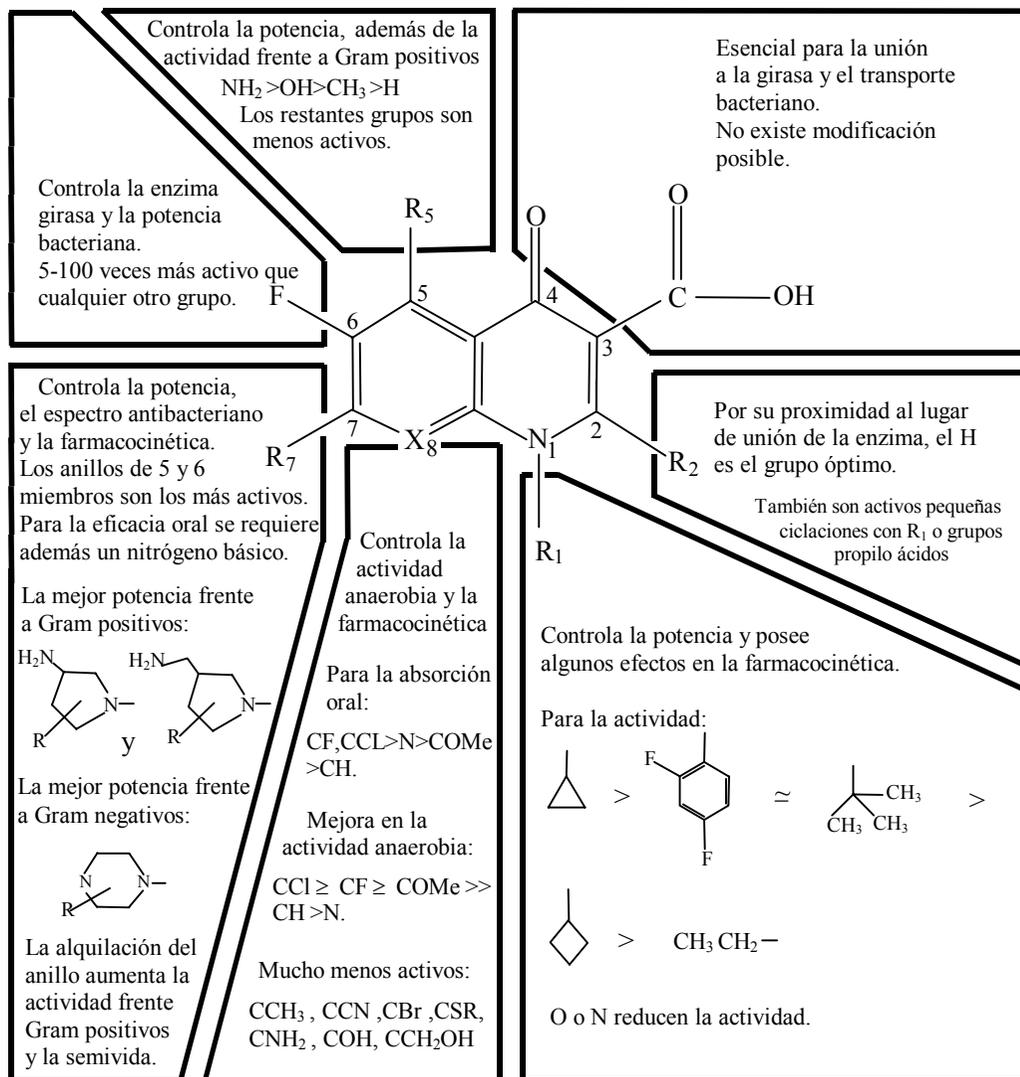
Durante los últimos quince años, científicos de todo el mundo han intentado hacer de estos atributos potenciales una realidad. Primero se consiguieron grandes mejoras en la potencia, el espectro y la eficacia *in vivo*

## Antecedentes 42

como resultado de modificaciones moleculares, es decir, se obtuvieron sintéticamente nuevas quinolonas mejores en clínica, pero se observó que tenían efectos secundarios. El segundo objetivo fue reducir o eliminar estos efectos secundarios mediante una nueva modificación, pero manteniendo la potencia.

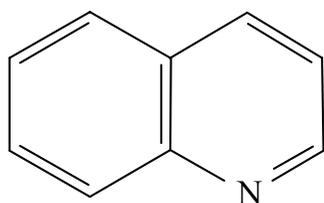
La relación estructura-actividad puede ayudar a decidir los grupos óptimos para cada posición en términos de tamaño, forma y propiedades electrónicas, como puede verse de una forma resumida, en la Figura 1.11 y se intentará puntualizar más detalladamente a continuación.

Como ya se ha expuesto anteriormente, las quinolonas tienen un núcleo central común, el ácido 4-quinolín,3-carboxílico. Las diferencias que existen entre ellas están determinadas por el número y posición de los átomos de nitrógeno en el núcleo central y los diferentes radicales unidos al mismo. Estas diferencias estructurales les confieren diferencias específicas, tanto en su actividad antimicrobiana y mecanismo de acción, como en sus propiedades farmacocinéticas. Por este motivo y debido a la existencia de un gran número de quinolonas, el estudio de las relaciones estructura-actividad se centra en la determinación de los grupos funcionales esenciales u óptimos para la actividad antibacteriana. Para facilitar la exposición se agrupan éstas según el núcleo del que derivan, cuya estructura se detalla en la Figura 1.12, que no es más que una extensión de la 1.1. Además, en el Cuadro 1.1 se muestra de modo orientativo una clasificación de las quinolonas atendiendo a la naturaleza de los grupos unidos al núcleo central y al número total de átomos de flúor presentes en la molécula.

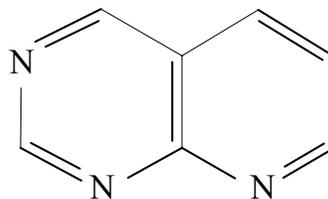


**Figura 1.11.** Resumen de la relación estructura-actividad antibacteriana de las quinolonas. Tomado de Domagala (76).

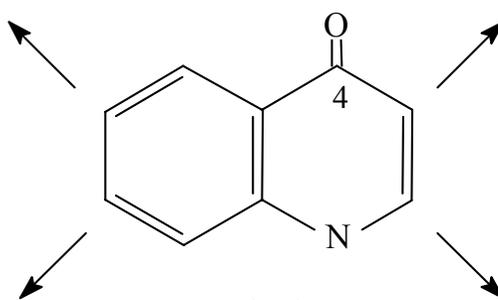
Antecedentes 44



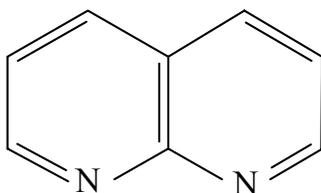
Benzopiridona



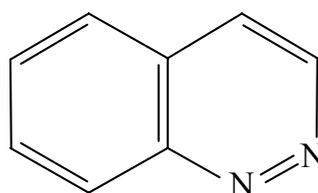
Piridopirimidina



4-Quinolona  
(estructura general)



Naftiridina



Cinolina

**Figura 1.12.** Fórmulas desarrolladas de las estructuras base de los principales grupos de quinolonas determinadas por el número y posición de los átomos de nitrógeno en el núcleo central.

<b>Benzopiridonas</b>	
➤ MONOFLUORADAS:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flumequino</li> <li>• Norfloxacin</li> <li>• Ciprofloxacino</li> <li>• Ofloxacino</li> <li>• Pefloxacino</li> <li>• Amifloxacino</li> <li>• Grepafloxacino</li> <li>• Levofloxacino</li> <li>• Moxifloxacino</li> <li>• Clinafloxacino</li> <li>• Gatifloxacino</li> </ul>
➤ DIFLUORADAS:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lomefloxacino</li> <li>• Esparfloxacino</li> <li>• Sitafloxacino</li> <li>• Difloxacino</li> </ul>
➤ TRIFLUORADAS:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fleroxacin</li> <li>• Temafloxacino</li> </ul>
<b>Piridopirimidinas</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido piromídico</li> <li>• Ácido pipemídico</li> </ul>
<b>Naftiridinas</b>	
➤ MONOFLUORADAS:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enoxacin</li> <li>• Gemifloxacino</li> </ul>
➤ TRIFLUORADAS:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tosufloxacino</li> <li>• Trovafloxacino</li> </ul>
<b>Cinolinas</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cinoxacin</li> </ul>

**Cuadro 1.1.** Principales quinolonas, incluidas en sus correspondientes grupos, atendiendo al núcleo central y al número de átomos de flúor que contienen. La estructura fundamental de cada grupo se esquematiza en la Figura 1.12.

### 1.5.1. Benzopiridonas

Las benzopiridonas poseen un único nitrógeno en la posición 1 del núcleo central y, a diferencia del ácido nalidíxico, no tienen un nitrógeno en posición 8; esta sustitución del N<sub>8</sub> del ácido nalidíxico por carbono, aumenta su actividad frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas. Esta modificación, junto con otras en los carbonos 6 y 7 dan lugar al **ácido oxolínico** (75) (Figura 1.2).

El **flumequino**, otra quinolona de este grupo, presenta dos características muy particulares: la presencia de flúor en C<sub>6</sub> y una estructura tricíclica, debida a los dos átomos de carbono añadidos al grupo alquílico dependiente del nitrógeno en posición 1 (Figura 1.2), que implica mayor rigidez de la molécula, lo que *a priori* podría parecer contraproducente. Aparece por primera vez un carbono asimétrico, responsable de la actividad óptica de este derivado y también por primera vez se preconiza la posible influencia de esta actividad óptica en el efecto antimicrobiano. El flumequino tiene una buena actividad frente a *E. coli*, otras bacterias Gram negativas y *S. aureus* (2, 8, 195). El hecho de que este compuesto no haya llegado al mercado farmacéutico para medicina humana puede deberse a algún factor diferente de su actividad antibacteriana, pero no está claro en la literatura cuál puede ser.

Se han sintetizado muchos otros compuestos que se diferencian en los sustituyentes del núcleo de benzopiridona. A continuación se detallan los grupos más adecuados para cada una de las posiciones.

### Posición 1

El sustituyente del N<sub>1</sub> controla la potencia antibacteriana y, con mucha diferencia, los grupos óptimos son el ciclopropilo, seguido del 2,4-difluorofenilo y terc-butilo (76). Podemos encontrar ejemplos de estos sustituyentes en **tosufloxacino**, **temafloxacino** y **BMY 40062** (57) (Figuras 1.4 y 1.13).

Estudios recientes (251) sobre la relación estructura-actividad en micobacterias demostraron que la actividad antimicobacteriana que confiere el sustituyente del N<sub>1</sub> sigue este orden decreciente: terc-butilo  $\geq$  ciclopropilo > 2,4-difluorofenilo > etilo  $\simeq$  ciclobutilo > isopropilo.

Estudios paralelos (150) realizados con 63 quinolonas sobre catorce cepas de *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare* también demostraron que los compuestos más activos eran los que tenían un terc-butilo como sustituyente en el N<sub>1</sub> (**PD 161315** y **PD 161314**), seguidos de los que poseían un ciclopropilo en dicha posición (**PD 138926** y **PD 158804**). (Figura 1.13).

Un estudio posterior en *S. pneumoniae* (198) demuestra que los compuestos con un grupo 2,4-difluorofenilo en posición N<sub>1</sub> del núcleo quinolónico presentaron la mayor actividad bactericida y EPA. Sin embargo ambos, actividad bactericida y EPA, varían de forma menos ostensible por cambios en el núcleo o en la posición 7. Como ejemplos, **temafloxacino**, **trovafloxacino** y **tosufloxacino** (Figuras 1.4, 1.5 y 1.13, respectivamente) tienen un grupo 2,4-difluorofenilo en N<sub>1</sub> y presentan mayor actividad frente a *S. pneumoniae* que otras quinolonas con un grupo etilo o ciclopropilo.

## Antecedentes 48

Otros estudios en *S. aureus* (239) han confirmado que sólo las modificaciones en los sustituyentes de la posición C<sub>7</sub> confieren pocas diferencias en la actividad antimicrobiana de las quinolonas, mientras que las sustituciones en C<sub>1</sub> ratificaron que el grupo terc-butilo confiere una mejora en la actividad frente a este microorganismo comparada con los grupos ciclopropilo o etilo en la citada posición, lo que sugiere que la afinidad por las bombas de flujo puede verse influenciada por la estructura de la quinolona. A este efecto obviamente también pueden contribuir las modificaciones que este grupo produce en el transporte a través de las porinas y en la selección de la diana *in vivo*.

### Posición 2

Por su proximidad al lugar de unión de la enzima, el átomo de H es el grupo óptimo y sustituciones en C<sub>2</sub> se han considerado generalmente desfavorables. En muy pocos casos, como se ve en **A-62824** y **NM-398-394** (metabolito activo del profármaco prulifloxacino (NM-441) (225)) (Figura 1.13), la posición 2 puede presentar un sulfuro, si se incorpora como integrante de un pequeño anillo (62, 76).

El efecto de la sustitución del carbono 2 por nitrógeno en los derivados de la cinolina se comentará más adelante.

### Posición 3

Todos los intentos para introducir modificaciones permanentes en el grupo carboxílico en posición C<sub>3</sub> han dado como resultado la obtención de derivados con una actividad antimicrobiana baja (76). Sin embargo, Chu y

col. (60) han diseñado y sintetizado una serie de quinolonas modificadas en esta posición que muestran una elevada potencia antibacteriana, como es el **A-62824** (Figura 1.13).

#### Posición 4

Los cambios en la posición C<sub>4</sub> parece que tampoco favorecen. Se cree que el grupo carbonilo es necesario en esta posición (2) y lo poseen todas las quinolonas sintetizadas hasta la fecha. Algunos autores suponen que este átomo de oxígeno es el que establece los puntos de unión del fármaco al ADN (268) y estudios posteriores (76) demuestran que los grupos 3-carboxilato y 4-carbonilo constituyen el lugar crítico, estructuralmente hablando, para la unión al complejo girasa-ADN.

#### Posición 5

Las sustituciones en la posición C<sub>5</sub> no son, en general, favorables, excepto en casos muy concretos. Algunos estudios demuestran que este sustituyente controla significativamente la potencia *in vivo*; los grupos óptimos son NH<sub>2</sub> y OH, seguidos de CH<sub>3</sub>, todos los cuales parecen aportar un aumento de la potencia contra organismos Gram positivos (75, 76). Sin embargo, todos presentan una actividad *in vivo* inferior a la esperada en base a las CMIs, es decir, tienen un efecto negativo en la eficacia *in vivo*. Grupos de mayor tamaño disminuyen enormemente la potencia tanto *in vitro* como *in vivo* (73). Las quinolonas más relevantes sustituidas en la posición 5 son (76) **esparfloxacino**, que presenta un grupo NH<sub>2</sub> en dicha posición y **grefarfloxacino** (OPC 17116) (56), que presenta un CH<sub>3</sub> (Figura 1.4).

## Antecedentes 50

Concretamente el grepafloxacino es una quinolona sintetizada por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japón, que posee gran potencia frente a bacterias Gram positivas (303). Su eficacia terapéutica se debe no sólo a su actividad *in vitro*, sino a la elevada concentración en tejidos que es capaz de alcanzar (136). Sin embargo, el 17 de noviembre de 1999 la Agencia Española del Medicamento, a solicitud de los laboratorios Glaxo Wellcome y Otsuka Pharmaceutical (10) dispuso su retirada del mercado. En el seguimiento llevado a cabo sobre el perfil de seguridad de este medicamento una vez comercializado (septiembre de 1998 en España) se detectaron sospechas de reacciones adversas cardiovasculares, ocasionalmente graves, en las que no se ha podido descartar una posible relación de causalidad con la administración del fármaco.

El esparfloxacino, por su parte, fue aprobado para su comercialización en Estados Unidos por la “Food and Drug Administration” el 19 de diciembre de 1996, pero nunca llegó a comercializarse en España.

### Posición 6

Como se indica en el epígrafe 1.2, la introducción de un átomo de flúor en posición C<sub>6</sub> es responsable en gran medida de las mejoras generales de las fluoroquinolonas. Se ensayó inicialmente la introducción de otros grupos en esta posición (H, Cl, Br, -CH<sub>3</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, y otros) sin resultados satisfactorios. Se ha visto (76) que un átomo de flúor es capaz de multiplicar por diez la inhibición de la ADN girasa y disminuir unas cien veces la CMI, por lo que cualquier modificación que elimine el átomo de flúor en esta posición supondría una reducción de la eficacia antibacteriana.

Estudios posteriores (36) han demostrado, sin embargo, que la sustitución del átomo de flúor en posición 6 por un grupo amino (38, 39), produce una buena actividad antibacteriana *in vitro* frente a 32 cepas de *Helicobacter pylori*. Así pues, parece que algunas de las nuevas 6-desfluoroquinolonas serán muy útiles en la erradicación de las infecciones por la citada bacteria. Se ha evaluado asimismo, la actividad *in vitro* de una serie de 6-aminoquinolonas frente al virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), observando que presentan un mayor efecto antiviral que las fluoroquinolonas (41).

También existen en la bibliografía (40), estudios sobre series de 6-desfluoro-8-metilquinolonas. Los mejores resultados, en lo que respecta a la actividad antibacteriana frente a Gram positivos, se obtuvieron con un derivado que posee un grupo piperidinilo en el carbono 6; es diecisiete veces más potente que el ciprofloxacino y presenta una elevada actividad frente a *Streptococcus pneumoniae*.

Con la idea de comprender mejor el papel en el mecanismo de acción del sustituyente en C<sub>6</sub>, se ha sintetizado un nuevo derivado 6-desfluoroquinolona, caracterizado por la presencia de un grupo hidroxilo en lugar del usual átomo de flúor en C<sub>6</sub> (283). La actividad antibacteriana de este compuesto muestra que el grupo hidroxilo es un buen sustituto para el átomo de flúor de C<sub>6</sub>, especialmente contra bacterias Gram positivas. Por el contrario, es un inhibidor muy débil de la diana, lo que podría explicarse desde la base de sus propiedades de unión girasa-quinolona-ADN.

Sólo en los derivados de la piridopirimidina la posición C<sub>6</sub> está ocupada por un átomo de nitrógeno, lo que impide la presencia de un átomo

de flúor en dicha posición, por lo que como se verá más adelante, este anillo resulta ser el menos interesante.

### Posición 7

El sustituyente en posición 7 influye enormemente en la potencia, el espectro y la farmacocinética. Sin excepciones, los grupos óptimos han sido heterociclos nitrogenados de cinco y seis miembros (76) que contienen nitrógenos básicos, siendo los más comunes las aminopirrolidinas y piperacinas. Las pirrolidinas, presentes por ejemplo en **clinafloxacino** (Figura 1.5), ofrecen la más alta potencia contra bacterias Gram positivas; mientras que las piperacinas, presentes por ejemplo en **ciprofloxacino**, **lomefloxacino** y **temafloxacino** (Figuras 1.3 y 1.4), entre otras, proporcionan habitualmente mejor potencia frente a bacterias Gram negativas y mayor eficacia *in vivo* (259).

Se han sintetizado algunas quinolonas con otros anillos heterocíclicos (139, 152). No han demostrado un aumento en la actividad.

Asimismo, siempre manteniendo el flúor en posición 6, se han ensayado muchos otros sustituyentes en posición 7 (-CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-, bencil, 2-hidroxil-alil, formil, acetil, benzoil), que conducen en todos los casos a una disminución del efecto bactericida, especialmente frente a microorganismos Gram negativos (75). Parece que el grupo en posición 7 proporciona a la molécula su capacidad de penetración intracelular (196). Las sustituciones en los carbonos y nitrógenos de los grupos piperacino y pirrolidino pueden introducir mejoras en las propiedades de estos compuestos (196). De hecho, la sustitución alquílica de los anillos favorece el aumento de la actividad

frente a bacterias Gram positivas y de la semivida en suero (76). Ejemplos de estas modificaciones alquílicas importantes son **lomefloxacin**, **temafloxacin**, **esparfloxacin**, **sitafoxacin** (DU 6859) (6), y las nuevas quinolonas **PD 138312** (117, 133, 267) y **PD 140248** (74, 133, 267) (Figuras 1.3-1.5 y 1.13). Concretamente, el sitafoxacin demostró poseer amplio espectro y gran actividad para Gram positivos, Gram negativos y bacterias anaerobias (207), pero sobre todo frente a los primeros (154).

### Posición 8

La posición X<sub>8</sub> controla la eficacia *in vivo*, siendo los grupos óptimos en dicha posición: N, CF, y CCl. Ciertos grupos como CF, CCl y COMe, amplían el espectro antibacteriano, incluyendo actividad frente a anaerobios. Estos grupos se encuentran por ejemplo en **clinafoxacin**, **sitafoxacin** (ambos con un átomo de flúor unido al C<sub>8</sub>), **gatifloxacin** y **moxifloxacin** (ambos con un grupo OCH<sub>3</sub> unido al C<sub>8</sub>). Por otro lado, algunos autores mencionan que la introducción de un átomo de flúor a ese nivel, parece mejorar algunas propiedades farmacocinéticas (34). El resto de sustituyentes tiende en general a disminuir la eficacia *in vitro* y/o *in vivo* (76). Una excepción es el **flumequino** (Figura 1.2), en el cual el sustituyente es parte de un radical cíclico que a su vez, forma un anillo con un grupo central. Otro caso sería el del **ofloxacin** (Figura 1.3), el ejemplo más importante en el que se ha observado una mejora debido al anillo formado entre X<sub>8</sub> y N<sub>1</sub> responsable del aumento de la actividad frente a patógenos Gram positivos y anaerobios (76, 211).

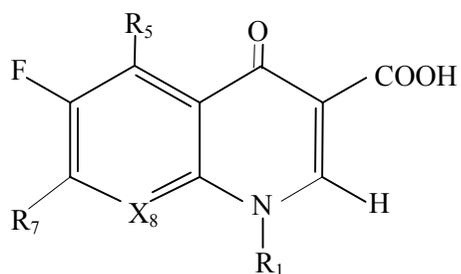
#### Antecedentes 54

Al variar el grupo de la posición 8 es posible generar análogos con el espectro de actividad deseado (184). Se ha indicado con anterioridad (epígrafe 1.3) que el sustituyente de la posición 8 de las fluoroquinolonas parece favorecer la acción de éstas a través de la girasa en *S. pneumoniae*, ya que **esparfloxacino** y **clinafloxacino**, que actúan a través de la girasa, presentan un átomo de flúor y cloro como sustituyente en la posición C<sub>8</sub> respectivamente, mientras que **ciprofloxacino** y **trovafloxacino** carecen del mismo y ambas actúan a través de la topoisomerasa IV en esta especie.

Recientemente se ha estudiado una serie de quinolonas con sustituciones en posición 8, sintetizadas como parte de un estudio para examinar la relación entre las modificaciones estructurales en esta posición y la actividad contra micobacterias (250). Los resultados demostraron que la contribución de la posición 8 a la actividad antimicobacteriana depende del sustituyente en el nitrógeno 1, tal como se detalla:

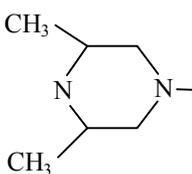
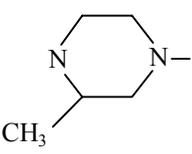
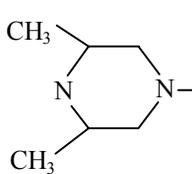
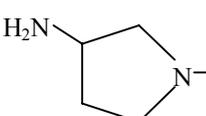
- N<sub>1</sub> es ciclopropilo: los mejores sustituyentes en la posición 8 son el grupo CoMe ~ CBr > CCl > CH ~ CF ~ COEt > N > CCF<sub>3</sub>.
- N<sub>1</sub> es 2,4-difluoropentilo: los grupos adecuados siguen este orden: N ~ CH > CF > COMe.
- N<sub>1</sub> es terc-butilo: el sustituyente más apropiado es N ≥ CH.
- N<sub>1</sub> es etilo: la actividad disminuye en el sentido N > CH.

Los sustituyentes en N<sub>1</sub> pueden mejorar las propiedades de estos compuestos. En un principio se pensó que estos sustituyentes debían ser grupos pequeños, pero, posteriormente, se vio que grupos de mayor tamaño también podían producir mejoras generales.

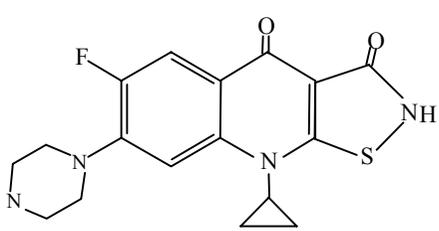


Nombre/ Identificación	R <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>5</sub>
A-62824	ver página 56			
BMV 40062		N	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C-	H-
NM-398-394	ver página 56			
PD 138312		N	c-C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> -	H-
PD 138926				H-
PD 140248		N	2,4-diFPh-	H-

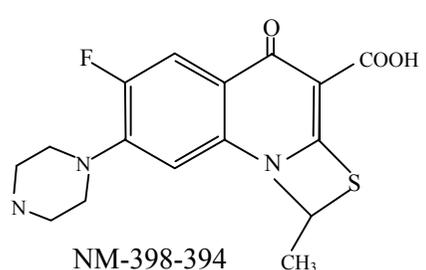
Antecedentes 56

Nombre/ Identificación	R <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>5</sub>
PD 158804		=CH-		H-
PD 161314		=CH-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C-	H-
PD 161315		=CH-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C-	H-
Tosufloxacin		N	2,4-di-FPh-	H-



A 62824



NM-398-394

**Figura 1.13.** Estructura química de las quinolonas a las que se hace referencia en este epígrafe, presentadas por orden alfabético.

### 1.5.2. Piridopirimidinas

La sustitución en el C<sub>6</sub> del ácido nalidíxico por el nitrógeno y la adición de un heterociclo nitrogenado en el C<sub>7</sub> dio como resultado la síntesis de los **ácidos piromídico** y **pipemídico** (Figura 1.2), los cuales presentan mejor actividad frente a los gérmenes Gram positivos que el ácido nalidíxico, aunque, en el caso del ácido piromídico, a costa de una reducción de la actividad frente a *E. coli* (271). Estos cambios también aumentan la absorción y los niveles en sangre (2).

En concreto el ácido pipemídico, cuya síntesis fue comunicada por Shimuzu y col. en 1975, constituyó un gran avance por ser un compuesto de mayor actividad y espectro sobre Gram negativos, mejor farmacocinética, menor incidencia de efectos secundarios, y una aparición de mutantes resistentes durante el tratamiento menos frecuente (272).

### 1.5.3. Naftiridinas

El **enoxacino** (Figura 1.3) tiene su fórmula estructural igual al norfloxacino, con la única diferencia de que conserva el nitrógeno en posición 8 a semejanza del ácido nalidíxico. No es tan potente ni tiene un espectro de acción tan amplio como el norfloxacino, pero es muchísimo más eficaz que el ácido nalidíxico, lo cual pone en evidencia la influencia positiva de la presencia del átomo de flúor en el carbono 6 y el grupo piperacínico en el carbono 7.

En la última generación de quinolonas, vuelve a aparecer compuestos con la estructura base del grupo de las naftiridinas incorporando uno o varios

átomos de flúor a la molécula, como son el **gemifloxacino** (monofluorado) y **trovafloxacino** (difluorado) (Figura 1.5).

#### 1.5.4. Cinolinas

En estos derivados, la sustitución del carbono 2 por nitrógeno representa una disminución del espectro de acción, pero la reducción de la intensidad y frecuencia de los efectos secundarios y la mejora de las propiedades bioquímicas (75, 90) hace que tengan cierta utilidad. El **cinoxacino** (Figura 1.2) es el derivado de la cinolina más representativo (65). Sin embargo, la reducción en el espectro antibacteriano ha hecho que no se haya avanzado en la síntesis de compuestos de este tipo.

De lo anteriormente expuesto se puede concluir que, aunque se han hecho muchos intentos para determinar qué tipo de núcleo central confiere mejores propiedades a las quinolonas, no se ha podido encontrar una respuesta única. De los ensayos realizados sobre la enzima libre y sobre células intactas se concluye que, *in vitro*, no puede hacerse una generalización entre benzopiridonas y naftiridinas (2), las cuales resultan ser, en muchos aspectos, las mejores. Las piridopirimidinas (ácidos pipemídico y piromidínico) no pueden beneficiarse de la presencia de un átomo de flúor en posición 6, por lo cual este anillo resulta ser el menos favorecido. Sería posible intentar la fluoración del carbono 5, pero compuestos de este tipo no se han descrito todavía y se presume que no deben ser muy estables (196). Por otro lado, la sustitución del carbono 2 por nitrógeno reduce el espectro antibacteriano y tampoco se han sintetizado muchos compuestos de este tipo. El anillo del cual han surgido más análogos es el de las benzopiridonas, o

quinolonas propiamente dichas. En cuanto a las sustituciones del anillo central, se ha visto, en todas las quinolonas pertenecientes a cualquiera de los cuatro grupos anteriormente descritos, que las sustituciones en el carbono 7 y en el nitrógeno 1 y la adición de flúor en el carbono 6 y, en algunas ocasiones, de flúor u otro halógeno en el carbono 8, son los sustituyentes que aportan mejores propiedades farmacológicas y mayor actividad y espectro de acción.

## 1.6. FARMACOCINÉTICA DE LAS QUINOLONAS

La eficacia terapéutica de las quinolonas está determinada no sólo por su actividad antimicrobiana sino también por el perfil farmacocinético que presentan (135), puesto que éste determina la concentración que se alcanzará en el foco infeccioso. A continuación se revisan las propiedades más importantes.

### 1.6.1. Absorción

#### 1.6.1.1. Absorción de las quinolonas

Las quinolonas se absorben en el tracto gastrointestinal después de la administración oral y sufren efecto de primer paso poco importante. Presentan una biodisponibilidad comprendida entre el 12 y el 93%, es decir, desde escasa a eficiente, que parece deberse, fundamentalmente, al proceso de absorción. Existen opiniones controvertidas respecto al mismo. Algunos autores observan un retraso en la absorción al aumentar la dosis de **ciprofloxacino**; obtienen la concentración máxima más tarde y menores

## Antecedentes 60

áreas bajo la curva cuando se administran dosis de 750 y 1000 mg, en relación con dosis de 50 o 100 mg (128). Otros por el contrario no encuentran diferencias significativas (129).

Tartaglione y colaboradores (289) caracterizan claramente la cinética de absorción como de orden cero. La atribuyen bien al proceso de absorción en sí, o a fenómenos que se producen antes de ésta, y que actúan como factores limitativos, como el proceso de disgregación/disolución; o bien porque, debido al carácter anfotérico del ciprofloxacino, los cambios de pH pueden originar cambios en la absorción, de los que resultaría una absorción rápida en duodeno y yeyuno proximal y más lenta en la porción distal del intestino.

En general se acepta que quinolonas como **norfloxacino** (282), **ciprofloxacino** (164), **ofloxacino** (161), **lomefloxacino** (95), **levofloxacino** (92) y **trovafloxacino** (290) presentan una farmacocinética lineal en el ámbito terapéutico de dosis, de forma que los valores de concentración en el pico ( $C_{max}$ ) y área bajo la curva (AUC) aumentan de forma proporcional a la dosis. Sin embargo, se ha indicado que **pefloxacino** (17), **grepafloxacino** (84) y **esparfloxacino** (110) presentan una farmacocinética no lineal, de tal manera que al aumentar la dosis, la fracción absorbida es, relativamente, menor. En el caso de enoxacino existen opiniones controvertidas en cuanto a la linealidad del proceso (53, 310).

La velocidad de absorción varía según la fluoroquinolona pero, en general, es rápida y el máximo en plasma ( $t_{max}$ ) se alcanza entre 0,5 y 2 horas.

La biodisponibilidad oral, como se ha comentado, también varía en función de la quinolona. Puesto que los efectos de primer paso son, en

general, poco importantes en todos los casos y la constante de absorción intrínseca de los compuestos muy hidrófilos suele ser baja, parece lógico pensar que la biodisponibilidad incompleta de algunos de ellos se deba a su falta de absorbabilidad. Por otro lado, la existencia de un proceso activo de secreción transepitelial del fármaco que ha penetrado ya en el enterocito hacia el fluido luminal (que parece afecta a algunas quinolonas como **ciprofloxacino**, **norfloxacino** y **esparfloxacino**), puede también rebajar la biodisponibilidad (46, 47, 112).

Con las nuevas fluoroquinolonas se ha logrado un aumento de la biodisponibilidad oral con respecto a los derivados más antiguos; así, aunque el **ciprofloxacino** presenta una biodisponibilidad oral comprendida entre 56 y 77% en adultos sanos, la del **pefloxacino** está próxima al 100% (21). Con la adición de un sustituyente como el cloro o el flúor en posición 8 también se mejora la misma (34).

En general, la administración conjunta de fluoroquinolonas y compuestos que contengan metales catiónicos provoca una disminución de la absorción intestinal de las primeras, probablemente porque se forman complejos insolubles (69, 224, 269). De este modo, debe evitarse la administración simultánea de estos antibióticos y preparados antiácidos (sales de magnesio y aluminio) o polivitamínicos que contengan sales de hierro, zinc u otros cationes metálicos.

La administración en presencia de alimentos da lugar a una disminución en la velocidad de absorción de quinolonas como **ciprofloxacino**, **norfloxacino**, **enoxacino** y **lomefloxacino**, pero la biodisponibilidad en magnitud no se ve afectada en ningún caso (96). De

## Antecedentes 62

hecho, la administración simultánea con alimentos parece favorable para disminuir la incidencia de efectos adversos gastrointestinales (69).

### 1.6.1.2. Mecanismos de absorción y sus modificaciones

Durante mucho tiempo se ha pensado que la absorción intestinal de la mayoría de los fármacos discurre por mecanismos de difusión pasiva, en los que la solubilidad en lípidos de las moléculas es un factor determinante. Sin embargo, compuestos naturales solubles en agua, como aminoácidos y azúcares, pueden penetrar a través de las membranas de las células por mecanismos de transporte especializados mediados por transportadores, y algunos fármacos hidrófilos aprovechan dichos mecanismos para su absorción (288).

En el caso de los mecanismos de transporte pasivo, que son, con mucho, los más frecuentes, la absorción de los fármacos depende del gradiente de concentración entre el lado seroso y mucoso (12). Hasta hace muy poco se creía que la difusión pasiva dependía sólo del pH del lugar de absorción, del pKa y de la lipofilia de los solutos presentes. Hoy se sabe que existen factores que pueden desvirtuar la absorción pasiva. El más importante de todos ellos es la presencia de **glicoproteína P** en las membranas del epitelio intestinal, enzima transportadora poco específica que tiende a excretar activamente, hacia el lumen intestinal, los solutos que se están absorbiendo, tanto si están atravesando la membrana celular de los microvilli como si han penetrado y accedido al citoplasma del enterocito (12, 58, 288, 298). Es decir, su efecto es totalmente contrario al que ejercen las enzimas transportadoras de membrana en general.

Estudios realizados en ratones parecen demostrar que la mayor función de esta proteína consiste en la protección del organismo frente a varios xenobióticos tóxicos a los que puede estar expuesto. La glicoproteína P confiere protección limitando la absorción de estos compuestos en el tracto gastrointestinal, y también, al parecer, mediante la estimulación de la secreción de los mismos en hígado, riñón e intestino. Aunque no se pueden excluir las funciones fisiológicas de la glicoproteína P, la ausencia de la misma no implica la mortalidad de los ratones, puesto que éstos continúan conservando las funciones vitales y no muestran anomalías en el fenotipo ni hipersensibilidad a los fármacos (262). La inhibición de la glicoproteína P intestinal, por ejemplo con un agente reversible como la ciclosporina A, puede aumentar la biodisponibilidad oral de los fármacos que son sustratos de dicha glicoproteína. Verapamilo y progesterona son dos sustancias que actúan también como inhibidores de la glicoproteína P, de tal forma, que aumentan significativamente la acumulación celular en el epitelio de los fármacos que actúan como sustratos de dicha glicoproteína (47). Este aumento es resultado de la inhibición de la secreción del fármaco por parte, en este caso, del verapamilo o de la progesterona. Un trabajo muy reciente (264) estudia los requisitos necesarios para que un compuesto sea sustrato de la glicoproteína P. Estos autores concluyen que el paso limitante para la interacción de un sustrato con la glicoproteína P es el reparto en la membrana lipídica y que la disociación del complejo formado por el sustrato y la glicoproteína P está determinado por el número y fuerza de los enlaces de hidrógeno formados entre el sustrato y el transportador.

En resumen, la glicoproteína P es una bomba de flujo dependiente de energía, capaz de disminuir la concentración intracelular de una amplia gama

#### Antecedentes 64

de agentes quimioterápicos tanto *in vitro*, como *in vivo*, como se ha demostrado en ciertos estudios recientes (15, 165). Este fenómeno le dota de un interés especial en el campo de la investigación frente al cáncer, puesto que, para contrarrestar las resistencias a los fármacos, se administran a los pacientes agentes bloqueantes de la glicoproteína P durante el tratamiento con quimioterapia (261). En lo que se refiere a las fluoroquinolonas como **ciprofloxacino**, **norfloxacino**, **levofloxacino**, **grefloxacino** y **esparfloxacino**, estudios recientes realizados en monocapas de células Caco-2 han demostrado que la absorción (paso de la membrana apical a la basal) de estos fármacos, resulta pequeña en comparación con el paso de los mismos desde la membrana basal a la membrana apical (112), lo que es indicativo de secreción del mismo al lumen intestinal (47, 113, 208). Este hecho hace suponer que estos compuestos son sustratos de una secreción transepitelial activa (37, 112). Por otro lado, se ha observado que un cierto número de 4-quinolonas y fluoroquinolonas, son capaces de inhibir la secreción del ciprofloxacino y la acumulación a lo largo de la superficie de las células basal-laterales. Un ejemplo es el cinoxacino, una 4-quinolona que puede inhibir selectivamente la salida del ciprofloxacino desde las células a través de la membrana apical. Estos estudios de competición sugieren que las fluoroquinolonas deben utilizar un transportador común en la membrana basal-lateral lo que explica la eliminación transintestinal del ciprofloxacino observada en estudios farmacocinéticos realizados en el hombre (113). El **ciprofloxacino** parece presentar *in vivo* poca afinidad por el citado transportador, por lo que la absorción intestinal de esta fluoroquinolona no se ve exageradamente disminuida en general (112).

Es de señalar, por último, que en la actualidad se desarrolla un gran trabajo para esclarecer los mecanismos implicados en este proceso, por la trascendencia que tienen, fundamentalmente, en el diseño de nuevas moléculas.

### 1.6.2. Distribución

Las fluoroquinolonas se distribuyen rápida y ampliamente en los tejidos y fluidos corporales después de la administración oral o intravenosa (128). Se distribuyen en vesícula biliar, hígado, pulmones, útero, fluido seminal, tejido prostático, ovarios, trompas de Falopio, riñón, amígdalas y saliva (212, 279, 313). El **ciprofloxacino** accede también al hueso y puede atravesar la barrera hematoencefálica y, aunque las concentraciones que alcanza en líquido cefalorraquídeo no son excesivamente elevadas, pueden ser iguales o superiores a la CMI para los microorganismos causantes de meningitis (130, 311).

Atraviesan la barrera placentaria y acceden al líquido amniótico y también algunos compuestos pueden excretarse a la leche materna (108, 190). Además, presentan una buena penetración intracelular, alcanzando dentro de las células niveles superiores a los que presentan en el medio circundante, como ocurre en los macrófagos alveolares y leucocitos polimorfonucleares (312, 313).

Las fluoroquinolonas se unen a proteínas plasmáticas en bajo porcentaje, que para el **ciprofloxacino** representa un 20-30% (80, 212). Se distribuyen rápidamente y de forma amplia a los tejidos y fluidos corporales después de administración oral. Presentan un volumen de distribución que

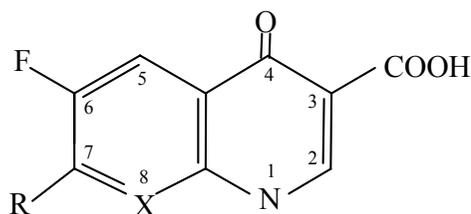
supera el volumen corporal: entre 1,5 y 3,1 l/kg (21, 30, 128), lo que es indicativo del acceso de las mismas a compartimentos profundos del organismo (128) y de su retención reversible en éstos.

### **1.6.3. Metabolismo y excreción**

Se eliminan por vía renal, transintestinal y por metabolismo. El metabolismo tiene lugar en el hígado y se produce principalmente sobre el anillo piperacínico en posición 7, dando lugar a distintos (hasta siete) metabolitos por hidrólisis, oxidación o sulfonación de este último (128); algunos de ellos son activos, aunque en menor medida que el fármaco del que proceden (128, 178). Este mecanismo de eliminación es susceptible de sufrir saturación después de administrar un régimen de dosis múltiples no optimizado (162). Sin embargo, especialmente para las quinolonas menos hidrófilas, en regímenes de dosificación optimizados por vía oral, no se observa modificación en las concentraciones plasmáticas una vez instaurados éstos si se trata de pacientes con funciones renales normales, lo cual indica que no sufren acumulación (29) y que no existen inducción ni inhibición metabólicas.

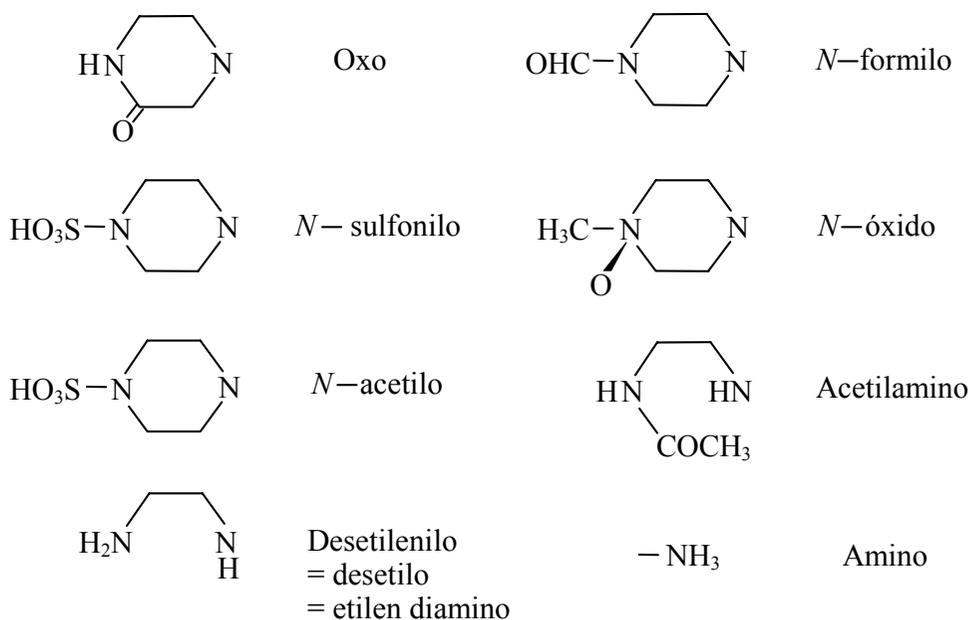
La tasa de biotransformación, es muy variable y se produce en mayor porcentaje para los derivados más lipófilos, ya que para el **pefloxacino** y **esparfloxacino** es de un 85% y 60%, respectivamente (97, 110), y en menor medida para los más hidrófilos, como 25-40% para el **ciprofloxacino** e incluso menor del 5% para el **ofloxacino** (161, 164). La saturación del metabolismo hepático parece ser la causa de la aparición de fenómenos de no linealidad en algunos de estos compuestos (179, 212).

Los fármacos sujetos a biotransformación hepática, normalmente presentan varios metabolitos originados por vías metabólicas paralelas o consecutivas. Los principales cambios metabólicos de algunas quinolonas se presentan en la Figura 1.14.



Estructura básica

R:



**Figura 1.14.** Estructura química de los principales metabolitos de ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino, pefloxacino y ácido nalidíxico.

## Antecedentes 68

El principal núcleo de la biotransformación de las quinolonas es el anillo piperacínico, como ya se ha indicado. Los principales metabolitos de **ciprofloxacino**, **enoxacino** y **norfloxacino** son las oxoquinolonas, mientras el N-formilo es el menos importante. El producto mayoritario del metabolismo del **pefloxacino** es el desmetilpefloxacino (norfloxacino), a partir del cual todos los metabolitos del norfloxacino se forman subsiguientemente. Los únicos exclusivos del pefloxacino son el N-óxido y los sustituyentes oxo (20).

Las fluoroquinolonas y sus metabolitos se excretan por orina y heces y sólo una pequeña cantidad del fármaco aparece en bilis. El porcentaje de fármaco excretado por cada vía varía mucho según la quinolona.

En la mayoría de las fluoroquinolonas, el fármaco inalterado sufre excreción renal por filtración glomerular y secreción tubular activa; la saturación del proceso de secreción tubular podría ser responsable de la no linealidad del proceso de eliminación a altas dosis que preconizan algunos autores. De hecho, la secreción tubular de la mayor parte de quinolonas resulta bloqueada por el probenecid (270, 308), siendo una excepción el **fleroxacino** (306).

En las quinolonas más hidrofílicas, como **ofloxacino**, **levofloxacino**, **lomefloxacino** y **fleroxacino**, la eliminación tiene lugar predominantemente por vía renal, esencialmente como fármaco inalterado. En estos casos se hace necesario un ajuste de la pauta posológica en pacientes con insuficiencia renal o en ancianos, para prevenir la acumulación del fármaco (212, 279).

Otras quinolonas se excretan principalmente por vías no renales. Por ejemplo, **grepafloxacino** y **trovafloxacino** se excretan predominantemente como fármaco inalterado por vía biliar y, en menor proporción, por

conjugación hepática (83, 192). En pacientes con función hepática alterada tratados con **trovafloxacino** es necesario un ajuste de la pauta posológica.

El **ciprofloxacino** se elimina no sólo por vía renal y metabólica, sino que también presenta eliminación transintestinal y solo una pequeña cantidad de ciprofloxacino (menos del 1% de la dosis administrada) (33) aparece en bilis. En condiciones normales, el ciprofloxacino se elimina por orina en un 15-50% en forma inalterada y del 10 al 15% en forma de metabolitos; el restante 20-40% se encuentra en las heces. Entre los metabolitos del ciprofloxacino destacan el desetilén-ciprofloxacino, sulfociprofloxacino, oxociprofloxacino y formilciprofloxacino. Todos ellos poseen cierta actividad antibacteriana, pero mucho menor que su precursor común.

La vía transintestinal de eliminación compensa la disminución de la eliminación por orina en los casos de insuficiencia renal (255). Así, se observa un aumento de la eliminación por heces del **ciprofloxacino** inalterado desde el 11% en pacientes normales al 37% en insuficientes renales, y un aumento de metabolitos del 7 al 26%. Alcanzan el colon por transporte a través de la mucosa intestinal directamente al lumen intestinal. Esta vía de eliminación también es operativa para el **norfloxacino**, y explica que la semivida en pacientes con insuficiencia renal no exceda de las 10-12 h, cuando en pacientes normales está comprendida entre 3 y 5 h.

## 1.7. PENETRACIÓN INTRACELULAR DE LAS QUINOLONAS

Hasta hace unos años, los estudios realizados para establecer la dosificación de los antimicrobianos se basaban en conocer las

## Antecedentes 70

concentraciones que se alcanzan en suero y otros líquidos orgánicos, y las que se necesitan para inhibir o matar a los microorganismos causantes de la infección (CMI y CMB) sin tener en cuenta toda una serie de factores relacionados con los mecanismos de defensa del huésped. Los esfuerzos iban dirigidos, fundamentalmente, a desarrollar fármacos con un espectro de acción progresivamente mayor y a controlar la aparición de resistencias; sin embargo, últimamente existe un interés creciente por conocer la relación que se establece entre el sistema inmunitario y el antimicrobiano y las implicaciones clínicas de tal relación. Parte de este interés se debe al aumento del número de pacientes inmunodeprimidos con una deficiencia adquirida en las funciones fagocíticas, que manifiestan por infecciones recurrentes y fallos de tratamiento causados, posiblemente, por la supervivencia intrafagocítica de determinados microorganismos (299).

La penetración, la acumulación y la localización de los antimicrobianos en el interior de las células fagocíticas son nuevos parámetros farmacocinéticos que cada día adquieren mayor importancia en el estudio de los antimicrobianos.

Para cuantificar el grado de penetración de un antimicrobiano se usa la relación entre la concentración intracelular y la extracelular del mismo (I/E). En las quinolonas este cociente oscila entre 2 y 28 dependiendo del tipo de célula, de la quinolona considerada y de otros factores tales como el método utilizado y la concentración extracelular (236).

Los antimicrobianos pueden pasar al interior de las células fagocíticas por cuatro vías distintas: durante la ingestión bacteriana, por difusión, por gradiente de pH y mediante transporte activo dependiente de energía. Las

quinolonas muestran un comportamiento heterogéneo respecto a los mecanismos de transporte implicados y no guarda relación con la liposolubilidad de la quinolona ni con el grado de fluorinización de la molécula. El **ofloxacino**, el **levofloxacino**, el **lomefloxacino** y el **temafloxacino** se incorporan a los leucocitos polimorfonucleares por un sistema de transporte activo relacionado con los aminoácidos, que requiere viabilidad celular, temperatura alta (37 °C) y energía metabólica, ya que los inhibidores que bloquean la glucólisis y otros procesos metabólicos impiden la acumulación (233); sin embargo, el **ciprofloxacino**, el **difloxacino**, el **esparfloxacino** y el **gatifloxacino** no requieren viabilidad celular, por lo que su paso al interior de los fagocitos debe ser por un mecanismo pasivo (82, 101, 316). El BAY Y 3118 tiene un mecanismo mixto (103). Otro factor que interviene en la acumulación intrafagocítica es la estimulación previa mediante la ingestión de microorganismos, partículas de zimosán opsonizadas, o bien con un activador de membrana de los polimorfonucleares como el acetato de fobol miristato (PMA). La ingestión de **ciprofloxacino** y **ofloxacino** se ve favorecida cuando los polimorfonucleares se estimulan con partículas de zimosán opsonizadas (102); sin embargo, con el **BAY Y 3118** ocurre lo contrario: la acumulación intrafagocítica disminuye si los leucocitos polimorfonucleares se estimulan con partículas de zimosán o con *S. aureus*, y se ve favorecida si la estimulación de la célula se realiza con PMA (103).

La penetración de las quinolonas es, en general, un proceso rápido no saturable y reversible, ya que son rápidamente liberadas cuando las células se transfieren a un medio sin antimicrobiano. La velocidad con que se liberan depende de la quinolona; mientras que con la mayoría de las quinolonas, a los

cinco minutos de ser transferidas a un medio sin antimicrobiano, se retiene de un 5% a un 40%, el **trovafloxacino** y el **NM394** (metabolito activo del prulifloxacino), además de acumularse en mayor cantidad tienen una elución más lenta y se retiene a los 20 minutos un 57% y un 40% del antimicrobiano, respectivamente (82, 231).

La localización subcelular de las quinolonas no se conoce muy bien. Estudios de fraccionamiento celular no muestran una asociación significativa de las fluoroquinolonas con orgánulos específicos, ya que las quinolonas se recogen en las fracciones solubles, sugiriendo que se localizan en el citosol o que pueden estar unidas de forma no específica a proteínas solubles. También es posible que estén asociadas de forma reversible con orgánulos o componentes de los que se liberan durante la homogenización o el fraccionamiento celular (294). Se ha observado que casi un tercio de la concentración intracelular de las fluoroquinolonas se encuentra asociado a los lisosomas (299). El pH del medio no tiene influencia significativa en el cociente I/E, aunque hay una tendencia a obtener concentraciones más elevadas a pH ácido.

Finalmente, las quinolonas también se acumulan en otras células como las epiteliales humanas, alcanzando concentraciones iguales a las de los neutrófilos (**esparfloxacino** y **BAY Y 3118**) y en otros casos inferiores (**ofloxacino**, **levofloxacino** y **lomefloxacino**). Asimismo, se ha descrito acumulación en los fibroblastos, donde la concentración del **trovafloxacino** es mayor que en los neutrófilos; mientras la del **ofloxacino** y el **norfloxacino** es similar a la alcanzada en los neutrófilos (66, 232).

## 1.8. APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LAS QUINOLONAS

El perfil farmacocinético que presentan las fluoroquinolonas, así como su elevada actividad antibacteriana y su amplio espectro de acción, hace que sus indicaciones terapéuticas sean muy variadas. De hecho, las quinolonas actualmente se utilizan en el tratamiento de gran número de infecciones, tanto en el ámbito hospitalario como en la práctica clínica ambulatoria (130). Sin embargo, como norma general, el empleo de estos antimicrobianos debería restringirse a aquellas situaciones en las que el microorganismo presente multirresistencia, la infección se localice en tejidos poco asequibles a otros fármacos o existan contraindicaciones para utilizar otros antibacterianos. Sólo mediante el seguimiento de estos criterios será posible evitar la aparición indiscriminada de mutantes poco sensibles o resistentes y de esta manera, seguir incluyendo a estos quimioterápicos, a lo largo del tiempo, entre los antibacterianos de amplio espectro, reservándolos, por las grandes ventajas que aportan, como alternativa a muchas terapias parenterales (131).

Las principales indicaciones clínicas de las quinolonas son las siguientes:

### 1.8.1. Infecciones del tracto urinario

Debido a la excelente actividad que presentan frente a casi todos los patógenos del tracto urinario, tanto Gram positivos como Gram negativos, y a las elevadas concentraciones que alcanzan en orina (50% y 90% de la dosis en el caso del **ciprofloxacino** y **ofloxacino**, respectivamente) las quinolonas

de primera y segunda generación son efectivas en el tratamiento de infecciones urinarias. Quinolonas más recientes como **esparfloxacino** presentan niveles en orina mucho más bajos (<15%), pero se mantienen por encima de las CMI<sub>s</sub> para estos microorganismos durante un periodo de tiempo prolongado. Además, su larga semivida permite administrarlas una vez al día (312).

**Ciprofloxacino, pefloxacino, ofloxacino y levofloxacino** están indicados en el tratamiento de infecciones urinarias crónicas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* y otros patógenos, incluyendo infecciones como pielitis, pielonefritis, cistitis, colecistitis y aquellas propias de pacientes que siguen diálisis peritoneal (256, 257).

Debido a que las fluoroquinolonas penetran en el tejido prostático y alcanzan concentraciones similares o superiores a las de suero, pueden utilizarse en la prostatitis aguda causada por *E. coli* y otras *Enterobacteriaceae*, pero son menos efectivas si el organismo causante es *Pseudomonas aeruginosa* o *Enterococcus sp.* (205, 312).

En general, todas las fluoroquinolonas son adecuadas en la terapia de infecciones del tracto urinario no complicadas. Estudios comparativos con otros antibióticos de uso habitual demuestran que las quinolonas tienen mejor efecto en este tipo de infecciones (312). De hecho, estos fármacos se utilizan normalmente en infecciones recurrentes, en especial si el riñón está afectado, y/o en ancianos, cuando la terapia con antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y trimetoprim ha fracasado (89).

### 1.8.2. Enfermedades de transmisión sexual (ETS)

Las fluoroquinolonas son antibióticos indicados en el tratamiento de algunas ETS debido a su amplio espectro antibacteriano y a unas características farmacocinéticas favorables que facilitan la posología y el seguimiento del tratamiento. Por ello, pueden utilizarse en el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual.

Cabría añadir que los microorganismos causantes de la gonorrea, *Neisseria gonorrhoeae* y del chancro blando, *Haemophilus ducreyi*, son extremadamente sensibles a las fluoroquinolonas. Algunos compuestos presentan además actividad frente a otros patógenos genitales como *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*, aunque carecen de actividad frente al agente causante de la sífilis (*Treponema pallidum*) (252). En resumen, las quinolonas se utilizan en el tratamiento de:

- Uretritis gonocócica no complicada y cervicitis: ambas pueden ser erradicadas con una dosis única de **norfloxacin**, **ciprofloxacino**, **pefloxacino** u **ofloxacino** (252, 312). También resultan efectivas en la mayoría de los casos de infecciones rectales y de faringe.
- Uretritis no gonocócica e infecciones por *Chlamydia*: son efectivos el **ofloxacino** y algunas quinolonas de tercera generación (323).
- Chancro blando o chancroide: puede tratarse con una pauta de varios días de **ciprofloxacino** o **enoxacino**, aunque el tratamiento de elección son antibióticos como la ceftriaxona y la azitromicina (263).

### 1.8.3. Infecciones gastrointestinales

Las fluoroquinolonas también son útiles para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, especialmente de procesos gastroentéricos agudos (212).

Son potentes inhibidores de la mayoría de las bacterias patógenas conocidas del tracto gastrointestinal incluyendo *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas spp.* y *E. coli* enterotoxigénica (5, 312).

Las fluoroquinolonas **norfloxacin**, **ciprofloxacino** y **ofloxacino** son eficaces en el tratamiento de las infecciones gastrointestinales, debido a que alcanzan buenas concentraciones en el intestino (5 a 10 veces superiores a las plasmáticas), se eliminan parcialmente por la bilis y tienen una excelente actividad sobre los enteropatógenos más comunes (5). El **norfloxacin** también ha resultado eficaz cuando se ha utilizado como quimioprofilaxis de la diarrea del viajante en México, Asia, África e Hispanoamérica (142).

Dentro de este apartado, debe prestarse particular atención a una utilidad propia de las quinolonas en **pacientes inmunocomprometidos**, en especial los que padecen granulocitopenia y esencialmente los que reciben quimioterapia, puesto que esto conlleva una ruptura de la integridad de la mucosa gastrointestinal y el consecuente riesgo de padecer una bacteriemia por bacilos Gram negativos de origen intestinal (312). En este sentido, se utilizan **norfloxacin**, **ciprofloxacino**, **pefloxacino** y **ofloxacino**, por su capacidad de inhibir de forma selectiva la flora bacteriana aerobia Gram negativa con poco efecto sobre el número de anaerobios intestinales, con el fin de prevenir infecciones nosocomiales en dichos pacientes. Este uso de las

quinolonas como profilaxis en pacientes neutropénicos y oncológicos debe llevarse a cabo con precaución debido a la aparición de resistencias asociadas a su uso continuado (155).

#### 1.8.4. Infecciones respiratorias

El uso del **norfloxacin** se restringe a infecciones del tracto genitourinario y gastrointestinal, pero otras fluoroquinolonas como **ciprofloxacino**, **ofloxacino**, **pefloxacino**, **enofloxacino**, **levofloxacino** y **esparfloxacino** han probado su eficacia *in vivo* frente a la mayoría de infecciones respiratorias (312). De hecho, ciertos patógenos respiratorios, tanto Gram negativos (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*) como Gram positivos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) son considerablemente sensibles a las fluoroquinolonas. Otros patógenos respiratorios atípicos como *Legionella spp.*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* son sólo moderadamente sensibles (18, 26).

Las fluoroquinolonas presentan características farmacocinéticas favorables para el tratamiento de infecciones respiratorias causadas por estas bacterias ya que penetran bien en el parénquima pulmonar, fluidos bronquiales y macrófagos alveolares, alcanzando concentraciones similares o superiores a las halladas en suero, lo que asegura su eficacia *in vivo* (27, 212). En este sentido, las quinolonas de última generación son particularmente útiles.

Actualmente se utilizan **ciprofloxacino**, **ofloxacino** y **levofloxacino** en el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias superiores y

otorrinolaringológicas, como amigdalitis, sinusitis y otitis media (27). En el caso de las infecciones en vías respiratorias inferiores (neumonía nosocomial, neumonía adquirida en la comunidad, fibrosis quística, bronquitis aguda) se utilizan esas mismas quinolonas y, en infecciones graves, antes de su retirada del mercado, se utilizaba el **trovafloxacino**.

### **1.8.5. Infecciones osteoarticulares**

El agente causal más común de osteomielitis bacteriana es *Staphylococcus aureus*, aunque también son frecuentes las infecciones polimicrobianas en las que están implicados patógenos Gram negativos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* (312). Estos microorganismos presentan resistencias cada vez más frecuentes a la combinación terapéutica de elección: un antibiótico  $\beta$ -lactámico y un aminoglucósido, además las terapias convencionales en adultos a menudo conllevan un período de hospitalización prolongada (312). Por ello, una alternativa es la administración oral de fluoroquinolonas como **ciprofloxacino** y **ofloxacino**, ya que son capaces de acceder fácilmente al tejido óseo y presentan un espectro de acción adecuado (167).

### **1.8.6. Infecciones de la piel y tejidos blandos**

Son un grupo de enfermedades infecciosas muy heterogéneo en cuanto a su etiología y morfología, difícilmente clasificables en un apartado único: piodermias clásicas, como son el impétigo, la erisipela, el ectima y las celulitis; infecciones más graves como las necronizantes y gangrenosas de

tejidos blandos, incluyendo fascitis y mionecrosis; infecciones por mordedura de animales, infecciones en el pie del diabético y las asociadas a las úlceras de decúbito.

Los microorganismos más frecuentemente relacionados con éstas son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Haemophilus influenzae*, aunque como causantes de estas infecciones podemos encontrar también *Enterobacteriaceae* y otros patógenos Gram negativos (312).

Fluoroquinolonas como **ciprofloxacino**, **ofloxacino** y **levofloxacino** son buenos candidatos para su tratamiento debido a su amplio espectro y a que alcanzan concentraciones adecuadas en piel y tejidos blandos. Además se debe tener en cuenta sus propiedades farmacocinéticas que posibilitan la administración oral frente a la de cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos (22, 130).

Sin embargo, conviene destacar que tanto en las infecciones osteoarticulares, como de la piel y tejidos blandos es necesario realizar un estudio de sensibilidad que indique la terapia antibiótica óptima según el agente causal de la infección y vigilar la eficacia del tratamiento con el fin de evitar la posible aparición de resistencias sobre todo cuando el microorganismo es *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, o del género *Streptococcus*, los cuales han sido asociados a fallos en el tratamiento (258, 312).

### **1.8.7. Infecciones intraabdominales y pélvicas**

Las quinolonas pueden utilizarse asimismo en el tratamiento de infecciones intraabdominales (peritonitis, absceso intraabdominal,

pancreatitis), ginecológicas (endometritis, anexitis, parametritis, salpingitis, enfermedad inflamatoria pélvica) y andrológicas (prostatitis, epididimitis), aunque para ello es necesario el empleo de una terapia combinada con metronidazol cuando se utilizan quinolonas como **ciprofloxacino**, debido a la poca actividad de este último frente al anaerobio *Bacteroides fragilis* (274).

Sin embargo, el espectro antibacteriano de las quinolonas de cuarta generación, como **moxifloxacino** y **clinafloxacino**, podría permitir su empleo como único quimioterápico en el tratamiento de estas infecciones (14, 275).

## 1.9. EFECTOS ADVERSOS DE LAS QUINOLONAS E INTERACCIONES CON OTROS FÁRMACOS

### 1.9.1. Efectos adversos

En general, los derivados quinolónicos son seguros y bien tolerados. No obstante, determinados derivados quinolónicos, incluso algunas de las quinolonas que se han nombrado durante la presente Memoria, han sido retiradas del mercado por presentar problemas de toxicidad grave. Así:

➤ En la primavera de 1992 los laboratorios Abbot solicitaron la retirada voluntaria del mercado de las especialidades farmacéuticas cuyo principio activo era el **temafloxacino**, debido a la aparición de efectos adversos severos asociados al uso de estos fármacos, como anemia hemolítica, frecuentemente asociada con fallo renal, disfunción hepática y coagulopatía. También podían producir hipoglucemia en pacientes de avanzada edad. El 25 de septiembre de 1997, la “Food and Drug

Administration” comunicó la retirada del mercado de las especialidades farmacéuticas en cuya composición entra a formar parte dicho principio activo (94).

➤ El 17 de noviembre de 1999 la Agencia Española del Medicamento, a solicitud de los Laboratorios Glaxo Wellcome y Otsuka Pharmaceutical (10), como se ha indicado con anterioridad, dispuso la retirada del mercado de las especialidades farmacéuticas en cuya composición entra a formar parte el principio activo **grepafloxacino**, debido a la aparición de sospechas de reacciones adversas cardiovasculares, ocasionalmente graves, en las que no se pudo descartar una posible relación de causalidad con la administración del fármaco.

➤ Hasta junio de 1999, el **trovafloxacino** y el **alatrofloxacino** (profármaco de aquél) eran las únicas quinolonas de cuarta generación cuyo empleo en humanos había sido autorizado por la “Food and Drug Administration” y por la “Comisión Europea” en julio de 1998. La comercialización en España fue autorizada en diciembre de 1998 para el tratamiento de determinados tipos de infección. Sin embargo, desde su autorización se encontraban registrados varios casos documentados de alteraciones hepáticas graves. Por ello, el Comité de Especialidades Farmacéuticas (CEF) Europeo consideró que el balance actual beneficio/riesgo de estos fármacos era negativo, recomendando la suspensión de autorización de comercialización de las citadas especialidades, medida que la Agencia Española del Medicamento decidió hacer efectiva a partir del 15 de junio de 1999, fecha en que se retiró del mercado (1).

## Antecedentes 82

A pesar de todo, las quinolonas en conjunto pueden considerarse como un grupo con un buen balance beneficio/riesgo. Frecuentemente, los efectos adversos decrecen con la reducción de la dosis y la duración de la terapia con quinolonas. Es necesaria la interrupción del tratamiento tan sólo del 1-3% de los pacientes (130). Las reacciones adversas más frecuentes son las que afectan al tracto gastrointestinal, sistema nervioso central (SNC) y piel. En la Figura 1.15 se presenta un resumen de la relación estructura-efectos secundarios de las quinolonas.

Los **efectos gastrointestinales** más comunes son las náuseas, seguido en orden de frecuencia decreciente por dolor abdominal, emesis, diarrea y dispepsia. Estas manifestaciones se presentan en el 3-5,6% de los pacientes. Son, en general, leves y desaparecen al suspender el tratamiento (27, 312). Se han descrito en todas las quinolonas y por el momento no se ha asociado ninguna estructura aislada a estos efectos gastrointestinales (76).

Los **efectos adversos a nivel del SNC** aparecen en el 0,9-4,4% de los pacientes. Los más frecuentes son mareos, cefaleas, inquietud, depresión, insomnio y somnolencia (312). En casos muy raros se observan alteraciones de la coordinación motora (marcha inestable, temblores), convulsiones, trastornos visuales, reacciones psicóticas o maníacas y alteraciones del gusto, olfato y oído (13). Estos efectos se han asociado a una acción directa de la quinolona sobre receptores cerebrales, concretamente sobre los receptores activados por el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), un inhibidor de la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis de la célula nerviosa cerebral de los mamíferos, desplazándolo y dando lugar a la estimulación del SNC. Las concentraciones a las que esta unión al receptor GABA<sub>A</sub> tiene lugar son generalmente elevadas comparadas con las que se alcanzan en tejidos y

plasma a las dosis terapéuticas (76). Algunos estudios (4, 61, 265, 293) establecen que la cadena unida al sustituyente de R<sub>7</sub> confiere la mayor influencia en el grado de unión al receptor GABA<sub>A</sub>. De este modo, las quinolonas con una cadena lateral voluminosa en dicha posición, como por ejemplo ocurre en **temafloxacino**, **esparfloxacino** y **gatifloxacino**, muestran menor unión a estos receptores; las quinolonas piroimidínicas, como **tosufloxacino** y **clinafloxacino** son intermedias en esta unión y las piperacinas no sustituidas, como se observa en **ciprofloxacino**, **enoxacino** y **norfloxacino**, son las que muestran mayor unión a los receptores. Sin embargo, el conocimiento de estos datos es insuficiente debido a que *in vivo* se debe considerar además, la penetración en el cerebro.

En resumen, las quinolonas deben administrarse con precaución en pacientes que hayan sufrido crisis epilépticas o con alteraciones preexistentes del SNC que impliquen una disminución del umbral convulsivo, como accidentes cerebrovasculares o traumas craneoencefálicos. Por otra parte, estos efectos adversos pueden potenciarse por interferencia con otros fármacos, como se comentará más adelante.

Reacciones de **hipersensibilidad** como prurito, eritema o urticaria se han observado en un 0,5-2% de los pacientes. Mecánicamente, los síntomas podrían ser causados por una reacción alérgica, fotosensibilidad o fenómenos de liberación de histamina como se ha sugerido para la quinolona BMY 40062 (249).

La principal reacción cutánea de las quinolonas es la fotosensibilidad, que parece ser un efecto de clase, puesto que existe una dosis y un nivel de exposición que causa fototoxicidad para la mayoría de los compuestos descritos (13). Sin embargo, parece que la fotorreactividad y con ella la

#### Antecedentes 84

fototoxicidad se debe a los sustituyentes de la posición C<sub>5</sub> y X<sub>8</sub> de la molécula. Respecto a C<sub>5</sub>, el grupo metilo es el más perjudicial. En posición X<sub>8</sub> los que presentan el mayor potencial fototóxico son los derivados con un halógeno, como se aprecia con **fleroxacino**, **clinafloxacino**, **lomefloxacino** y, en mayor medida, **esparfloxacino** (181, 277), mientras la menor fototoxicidad se manifiesta con X<sub>8</sub>=COR (76). Para el resto de quinolonas la fotosensibilidad es menor, pero debido a que las 8-haloquinolonas (X<sub>8</sub>=CF, CCl) y aquellas con grupos alquilados en R<sub>7</sub> muestran un aumento de la eficacia *in vivo*, la mayoría de las nuevas quinolonas incluyen estos grupos en su molécula por lo que la fototoxicidad ha adquirido gran importancia en clínica. Así, aunque las quinolonas difieren por el nivel de riesgo fototóxico, en cualquier caso debe evitarse la exposición a la luz ultravioleta durante el tratamiento y hasta cinco días después de finalizado.

Todas las quinolonas administradas a dosis elevadas de forma crónica causan **erosión irreversible en los cartílagos de las articulaciones** en animales inmaduros, lo cual implica que su uso está contraindicado como tratamiento prolongado en pacientes cuyo crecimiento sea incompleto, como en niños, adolescentes en fase de desarrollo, mujeres embarazadas (principalmente durante el primer trimestre) y mujeres lactantes, hasta que no se haya demostrado su inocuidad para estos tejidos en el hombre (277). En adultos, no se ha detectado erosión en cartílagos, y efectos como tendinitis u otras toxicidades que dañen los tejidos conectivos, se han descrito con muy poca frecuencia (312). En algunos casos, después de varios meses de tratamiento con estos antibióticos, se ha observado tendinitis aquiliana y tendencia a la ruptura tendinosa (tenorrexis) (123). Su uso debe, pues, evitarse en pacientes con antecedentes de alteraciones de este tipo.

La **toxicidad renal** es poco frecuente, aunque en un bajo número de pacientes se ha desarrollado hematuria, nefritis intersticial o fallo renal agudo (13). La cristaluria y la nefrotoxicidad no asociadas con función renal alterada son también reacciones adversas raras, aunque se han descrito en un pequeño porcentaje pacientes con pH urinario entre 6,5 y 7,5 que recibieron dosis elevadas de fluoroquinolonas (312). Este dato se ha tenido en cuenta en el diseño, pues en ocasiones se buscan cambios moleculares que aumenten la solubilidad intrínseca en agua al pH fisiológico para disminuir cualquier riesgo de formación de cristales en la orina. Generalmente, las sustituciones alquílicas del sustituyente en R<sub>7</sub> o la presencia de radicales CF, CCl, CCF y COMe en X<sub>8</sub> aumentan la solubilidad en agua de estos compuestos (76).

Algunas reacciones inesperadas, como episodios de hemólisis, fallo renal e hipoglucemia después de las comidas se describieron con **temafloxacino**, y fueron los causantes de su retirada del mercado. Estos efectos no se han notificado con otras fluoroquinolonas (13).

En general, se ha detectado una incidencia muy baja de **efectos cardiovasculares**. No obstante, el potencial cardiotóxico es mayor en el caso de quinolonas como **grefafloxacino** y **esparfloxacino**, debido a que provocan una prolongación del intervalo QTc (180, 277). El empleo de estas quinolonas debe, por tanto, evitarse en pacientes tratados simultáneamente con fármacos que prolonguen dicho intervalo y/o que presenten alteraciones del ritmo cardíaco, hipocalcemia o insuficiencia cardíaca congestiva (27).

Como se ha indicado anteriormente, la aparición de reacciones adversas de este tipo ha sido el principal motivo de la retirada del mercado del **grefafloxacino**.

Durante la terapia con fluoroquinolonas, aunque infrecuentemente, se han encontrado anormalidades en las **pruebas de laboratorio**, como elevación de las transaminasas en suero, leucopenia y eosinofilia. Normalmente estas alteraciones han sido transitorias o no progresivas y no requirieron el cese del tratamiento (312).

Se han descrito **reacciones anafilácticas** con varias fluoroquinolonas, a menudo con pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia humana (13).

La **toxicidad oftalmológica** sólo se ha descrito para **flumequino** en tres pacientes con fallo renal (134).

Por el momento, las fluoroquinolonas parecen tener un potencial bajo para inducir **cáncer o mutaciones**, como han demostrado varios ensayos realizados *in vitro* o con animales para estudiar la mutagenicidad o daño cromosómico (191). Sin embargo, las fluoroquinolonas son potentes inhibidores de la topoisomerasa II bacteriana, por lo que pueden inhibir topoisomerasas eucariotas y de este modo producir toxicidad celular y clastogenicidad. No obstante, las topoisomerasas del tipo II de las células de los mamíferos son unas mil veces menos sensibles a la acción inhibidora de las quinolonas que la girasa bacteriana, y no se ha descrito en el ser humano ningún efecto carcinogénico, probablemente porque la enzima humana es estructural y funcionalmente distinta (70).

En un intento para determinar los factores estructurales de las fluoroquinolonas asociados a la toxicidad celular en los mamíferos, varios autores (281) examinaron una amplia variedad de sustituyentes en las posiciones 1, 5, 7 y 8. Los resultados indicaron que ninguna posición tiene efectos que controlen por sí sólo la citotoxicidad. En cambio, una

combinación de ciertos sustituyentes contribuye a provocar los efectos observados, como el hecho de que compuestos con pirrolidinas en la posición 7 son más tóxicos que aquellos con piperacinas, y los halógenos en X<sub>8</sub> se asocian a mayor citotoxicidad respecto al hidrógeno. En la Figura 1.15 se detallan los grupos ordenados de mayor a menor toxicidad en cada posición.

Las nuevas fluoroquinolonas son esencialmente un grupo de antibacterianos bien tolerado, cuyos beneficios sobrepasan claramente sus desventajas en un amplio ámbito de indicaciones terapéuticas. Su eficacia clínica ha sido el mayor determinante para que estos compuestos hayan tenido éxito en el mercado a pesar de su posible toxicidad. Sin embargo, el menor potencial de los efectos adversos de algunos de estos compuestos, como norfloxacin, ofloxacin y ciprofloxacino han conducido, sin lugar a dudas, a su amplia utilización. Para otros, como el enoxacin, una mayor percepción de la toxicidad ha conducido a su utilidad clínica limitada.

Dado que las fluoroquinolonas tienen un espectro de actividad similar, y permiten una terapia de amplio espectro en pacientes con una gran variedad de infecciones, la elección entre ellas debería basarse en las diferencias en términos de eficacia y seguridad o tolerabilidad. La mayoría de las reacciones adversas que originan estos agentes son leves y reversibles al interrumpir el tratamiento, pero estos efectos pueden asociarse a una mortalidad y morbilidad significativa, como en el caso de trovafloxacin y temafloxacin (25). Por tanto, continúa la posibilidad del desarrollo de fluoroquinolonas más seguras e incluso más activas por medio de modificaciones químicas tanto en el núcleo como en los sustituyentes de cada posición (13).

### 1.9.2. Interacciones con otros fármacos

Se han descrito numerosas interacciones entre quinolonas y otros fármacos, cuya importancia depende del derivado que se considere. Las más importantes y generales se resumen a continuación.

La interacción más importante resulta de la administración simultánea de algunas quinolonas con derivados de la xantina como la cafeína y, en mayor medida, la **teofilina** (muy utilizada en el tratamiento del asma), que puede ocasionar una disminución del aclaramiento de ésta y, consecuentemente, un aumento de su semivida plasmática y de sus niveles en plasma, pudiendo alcanzar concentración superiores a 20 µg/ml y dar lugar a los síntomas de intoxicación teofilica (náuseas, vómitos, insomnio, cefalea, mareos, vértigo, temblores, taquicardia, e incluso convulsiones). Esta interacción se ha observado, fundamentalmente, con el **ácido pipemídico** y **enoxacino** y, en menor medida, con otras quinolonas como **ciprofloxacino**, **norfloxacino**, **pefloxacino** y **grefloxacino** (27, 181). Este efecto no parece tener importancia clínica en las quinolonas más recientes como **gatifloxacino** (223).

Esta interacción parece deberse a que la teofilina se metaboliza en gran parte, mediante desalquilación e hidroxilación, por los sistemas de los citocromos hepáticos P-448 y P-450, por lo tanto, los fármacos que interfieran con dichos citocromos (las quinolonas se metabolizan mediante interacción con el citocromo P-450) bloquearían el metabolismo teofilínico y, consecuentemente, la teofilina ve aumentados sus niveles plasmáticos (67).

Debido a que el asma se complica a menudo con infecciones respiratorias, es frecuente el uso combinado de quinolonas y teofilina, por lo

que debe prestarse especial atención al metabolismo de la misma durante la administración concomitante.

Estructuralmente, las interacciones quinolona-teofilina dependen, principalmente, de la naturaleza del sustituyente en posición 7, pero también se ven influenciadas por el sustituyente de la posición 1 y en menor medida, por el de  $X_8$ . Las interacciones más importantes se producen con sustituyentes pequeños no voluminosos, como piperacina y pirrolidinas, de tal forma que conforme aumenta el tamaño del sustituyente en dicha posición la interacción es menor. El sustituyente de  $R_1$  influye en menor medida, el etilo y ciclopropilo son neutrales, pero el F-etilo (**fleroxacino**) y el 2,4-difluorofenilo (**temafloxacino**, **tosufloxacino**, **trovafloxacino**) en dicha posición reducen el nivel de interacción del 10-25% respecto al grupo ciclopropilo. El sustituyente de  $X_8$  también debe ser de elevado tamaño, por lo que el N (naftiridinas) es el peor sustituyente en lo que a interacciones se refiere. Sin embargo, la influencia del sustituyente de  $R_7$  domina de tal modo la relación estructura-efectos secundarios que un grupo voluminoso en  $R_7$  puede compensar la presencia del nitrógeno en  $X_8$  (76).

La administración conjunta de fluoroquinolonas y compuestos que contengan **metales catiónicos** provoca una disminución de la absorción intestinal de estas últimas debido a la formación de complejos insolubles, como ya se indicó en el epígrafe 1.6.1.1 al hablar de la absorción de estos compuestos. La quelación con cationes metálicos ha sido descrita en el 22-76% de pacientes y es una de las interacciones que afecta a las quinolonas de modo general, aunque parece más importante para las quinolonas que presentan menor número de sustituyentes en la estructura básica y en el anillo piperacínico como **ciprofloxacino**, **norfloxacino** y **enoxacino** (69, 224). En

## Antecedentes 90

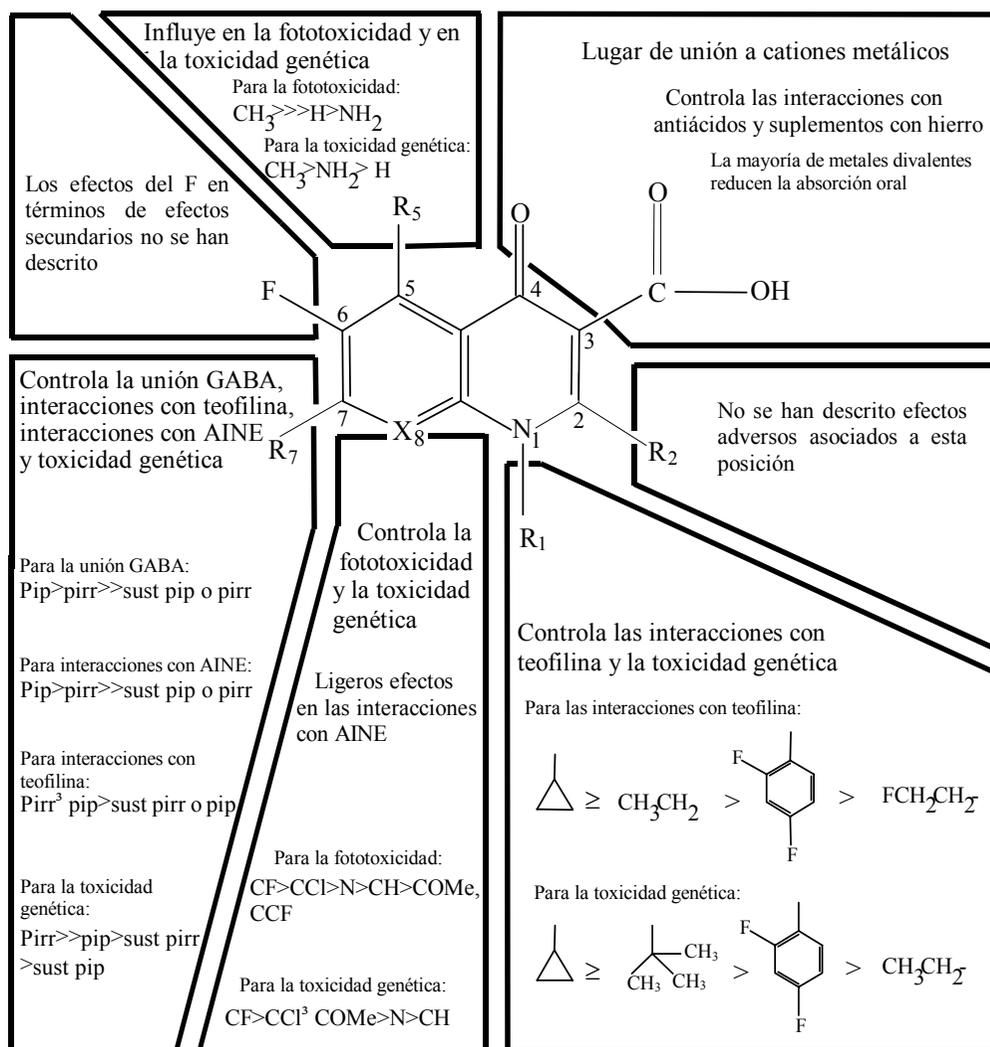
cualquier caso, debe evitarse la administración simultánea de estos antibióticos y sulfacrató, preparados polivitamínicos que contengan sales de hierro, zinc u otros cationes metálicos, así como antiácidos que contengan sales de magnesio, aluminio o calcio (no existe interacción con ranitidina ni cimetidina) (269). Si es necesaria, la co-administración debería espaciarse entre 2 y 4 horas.

Por otro lado, la administración conjunta de quinolonas y algunos **antiinflamatorios no esteroideos** (AINE) potencia su efecto convulsivante debido a una posible sinergia en la inhibición de la unión a los receptores del GABA (67). Esta interacción no se produce en quinolonas de tercera y cuarta generación (279).

Parece que el grupo de la posición 7 confiere la mayor influencia en los efectos sobre el SNC potenciados por los AINE, de forma que la relación estructura-efectos secundarios es paralela a la comentada con anterioridad al estudiar los efectos adversos de las quinolonas a nivel del SNC (76).

En resumen, las quinolonas han mostrado su eficacia en multitud de infecciones, según se ha visto con anterioridad, pero debido a sus efectos adversos e interacciones, su empleo está contraindicado en enfermos con historia previa de sensibilidad a sustancias de estructura quinoleínica, insuficiencia hepática grave, embarazadas, niños y adolescentes hasta el final de su desarrollo, y en personas de edad avanzada que tengan alguna lesión en el sistema nervioso central. Además, cuando se administre simultáneamente con otros fármacos debe tenerse en cuenta las posibles interacciones bacteriológicas y farmacológicas. En cualquier caso deben considerarse fármacos de reserva para el tratamiento de infecciones graves y nunca deben

utilizarse en procesos banales o que puedan ser controlados por otros agentes antimicrobianos de eficacia bien demostrada, a pesar de la tentación que supone la comodidad de su administración oral y de su posología (en general, cada 12 horas).



**Figura 1.15.** Resumen de la relación estructura-efectos secundarios de las quinolonas. Tomado de Domagala (76). **Pip:** piperacina; **pirr:** pirrolidina.



## *Capítulo II: Materiales y métodos*

---

### **2.1. MICROORGANISMOS**

Los estudios expuestos en este trabajo se han realizado utilizando ocho especies microbianas diferentes, cuatro de ellas pertenecientes a microorganismos Gram negativos y cuatro a Gram positivos. En los Cuadros 2.1 y 2.2 se especifican estos géneros y el número de cepas ensayadas. Además, se han utilizado en un estudio previo varias cepas de referencia de la colección americana de cultivos tipo (ATCC) y de colección. En el apartado 3.1 del capítulo de Resultados se especifican las cepas.

GÉNERO Y ESPECIE	NÚMERO DE CEPAS
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	20
<i>Achromobacter spp.</i>	18
<i>Moraxella catarrhalis</i>	20

**Cuadro 2.1.** Cepas Gram negativas ensayadas en los estudios de actividad.

GÉNERO Y ESPECIE	NÚMERO DE CEPAS
<i>Staphylococcus aureus</i>	20
<i>Staphylococcus coagulasa negativos</i>	20
<i>Enterococcus faecalis</i>	20
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	22

**Cuadro 2.2.** Cepas Gram positivas ensayadas en los estudios de actividad.

### 2.1.1. Identificación y mantenimiento de las cepas

Todas estas cepas proceden de aislamientos clínicos del Hospital Universitario La Fe de Valencia. Los gérmenes se han identificado por el sistema automático Vitek AMS, API 20S y otras pruebas complementarias.

Las cepas empleadas se han mantenido en tubos de agar inclinado Müller-Hinton a 4 °C, realizando resiembras sucesivas con periodicidad quincenal. Además se han conservado congeladas a -40 °C en viales con medio Skim Milk (Difco) al 10%.

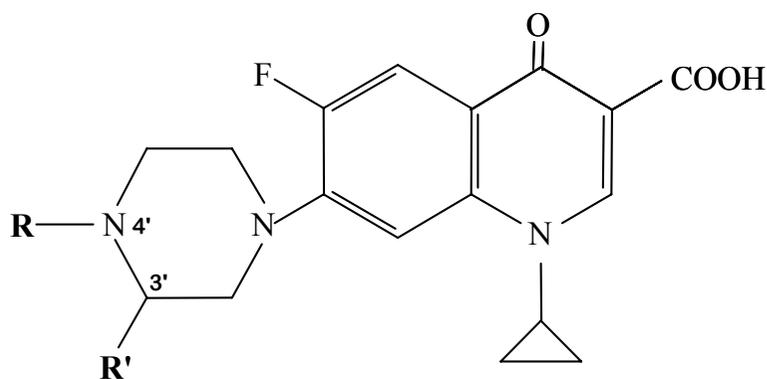
## 2.2. ANTIMICROBIANOS

Los antibióticos utilizados en este estudio son el ciprofloxacino (fármaco utilizado como patrón) y los homólogos, pertenecientes a dos series: serie de los 4'-N-alquilciprofloxacino y serie de los 3'-metil,4'-N-alquilciprofloxacino, cuyas estructuras químicas correspondientes se esquematizan en la Figura 2.1. Eventualmente y como término de comparación, se incluyeron algunos heterólogos de uso más o menos corriente, pero no en todos los casos. Los compuestos estudiados de cada serie se detallan en el Cuadro 2.3.

SERIE DE LOS HOMÓLOGOS DEL CIPROFLOXACINO		SERIE DE LOS HETERÓLOGOS
4'-N-alquilciprofloxacino	3'-metil,4'-N-alquilciprofloxacino	
Ciprofloxacino (CIP)	3'-metilciprofloxacino (97-100)	Grepafloxacino (GRX)
4'-N-metilciprofloxacino (Metil-CIP)	3'-metil,4'-N-metilciprofloxacino (97-101)	Ofloxacino (OFX)
4'-N-etilciprofloxacino (Etil-CIP)	3'-metil,4'-N-etilciprofloxacino (97-102)	Flumequino (FLQ)
4'-N-propilciprofloxacino (Propil-CIP)	3'-metil,4'-N-propilciprofloxacino (97-103)	Esparfloxacino (SPA)
4'-N-butilciprofloxacino (Butil-CIP)	3'-metil,4'-N-butilciprofloxacino (97-104)	Sarafloxacino (SAR)

**Cuadro 2.3.** *Quinolonas utilizadas en el estudio.*

Los elementos homólogos que aparecen en el Cuadro 2.3 forman parte de dos nuevas series de quinolonas, siendo todas ellas de nueva síntesis. Se han preparado para este trabajo por la empresa CENAVISA, de Reus (Tarragona), que colabora en nuestro proyecto de investigación.



Serie 4'N-alkilciprofloxacino	Serie 3'metil,4'N-alkilciprofloxacino
<p><b>R:</b> de H a butilo <b>R':</b> H</p>	<p><b>R:</b> de H a butilo <b>R':</b> metilo</p>

**Figura 2.1.** Estructura química de los homólogos del ciprofloxacino.

Los compuestos heterólogos se han obtenido de los laboratorios fabricantes de la molécula, a excepción del flumequino, que ha sido proporcionado por CENAVISA.

## 2.3. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

### Agar Müller-Hinton (MHA)

Este medio se prepara disolviendo 38 gramos de “Müller-Hinton Agar” (Difco) en 1 litro de agua destilada, calentando hasta ebullición y esterilizando la solución obtenida en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Tras su esterilización, el medio presenta un pH de  $7,3\pm 0,1$ .

El MHA se ha utilizado para el mantenimiento de las cepas, para realizar los recuentos de bacterias viables en placa y para las pruebas de sensibilidad microbiológica.

### Caldo Müller-Hinton (MHB)

Se obtiene disolviendo 22 gramos de “Müller-Hinton Broth” (Difco) en 1 litro de agua destilada y esterilizando posteriormente en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Tras su esterilización, el medio presenta un pH de  $7,3\pm 0,1$ .

Este medio se ha empleado en la preparación de los inóculos.

### Solución de Ringer

Se obtiene disolviendo un comprimido de Ringer 1/4 (Oxoid) en 500 mililitros de agua destilada y esterilizando en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Este medio se ha utilizado para preparar las diluciones de los inóculos a la concentración deseada en las pruebas de sensibilidad microbiológica. También se ha empleado para hacer las diluciones necesarias de las muestras,

tomadas a los diferentes tiempos, durante los ensayos de las curvas de mortalidad-tiempo.

#### Tampón de fosfatos, pH 8

Se prepara mezclando los componentes en las siguientes cantidades:

- fosfato bipotásico ( $K_2HPO_4$ ) .....16,730 gramos
- fosfato monopotásico ( $KH_2PO_4$ ) .....0,523 gramos
- agua destilada c.s.p. ....1 litro

El tampón se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Este tampón se ha utilizado en la preparación de las correspondientes diluciones de las quinolonas en las pruebas de sensibilidad microbiológica.

## **2.4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

### **2.4.1. Generalidades**

La actividad antibacteriana de las quinolonas se ha estudiado mediante la determinación de dos parámetros: concentración mínima inhibidora y curvas de mortalidad-tiempo.

La concentración mínima inhibidora (CMI) se define como la concentración mínima de fármaco capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo después de 18-20 horas de incubación a 35 °C. La CMI es un parámetro estandarizado que proporciona información acerca de la actividad de los compuestos estudiados, y en nuestro caso, permite determinar si existen diferencias entre las distintas quinolonas para los

diferentes microorganismos ensayados. No obstante, se trata de un parámetro estático, que se mide transcurridas 18 h de incubación y no proporciona información dinámica a lo largo del tiempo.

Las curvas de letalidad o mortalidad-tiempo suministran información sobre la dinámica de la acción bactericida de un antibiótico y sobre la relación entre la concentración de antibiótico y su actividad bactericida. Se utilizan fundamentalmente para el estudio de nuevos antimicrobianos y para determinar si existe sinergismo o antagonismo en la combinación de dos o más sustancias administradas conjuntamente. En resumen, proporcionan información dinámica sobre el crecimiento y la letalidad de los microorganismos.

En las bacterias, para las que estos ensayos están muy desarrollados y convenientemente estandarizados, los datos que se han obtenido han ayudado a comprender el mecanismo de acción de los antimicrobianos. De hecho, la determinación de las curvas mortalidad-tiempo se ha convertido en una importante herramienta de trabajo para determinar los efectos de los antimicrobianos sobre las bacterias.

## **2.4.2. Pruebas de sensibilidad microbiológica: determinación de la CMI**

### **2.4.2.1. Preparación de la solución madre de la quinolona**

Todas las quinolonas se han preparado a una concentración de 640 µg/ml y a partir de esta solución madre, diluyendo convenientemente, se han obtenido las concentraciones de trabajo. La cantidad de sustancia pesada y los disolventes utilizados se indican a continuación.

## **Materiales y métodos 100**

Se pesan 6,4 mg de la quinolona correspondiente y se disuelven en un volumen total de 10 mililitros de NaOH 0,05 N, a excepción de ciprofloxacino, 4'-N-butilciprofloxacino, 97-103 y 97-104 que se disuelven en agua destilada con un 10% de metilformamida.

El grepafloxacino se obtiene a partir de un polvo valorado, suministrado por los laboratorios Glaxo Welcome Research and Development, que se disuelve a razón de 6,4 mg por 10 ml de agua destilada.

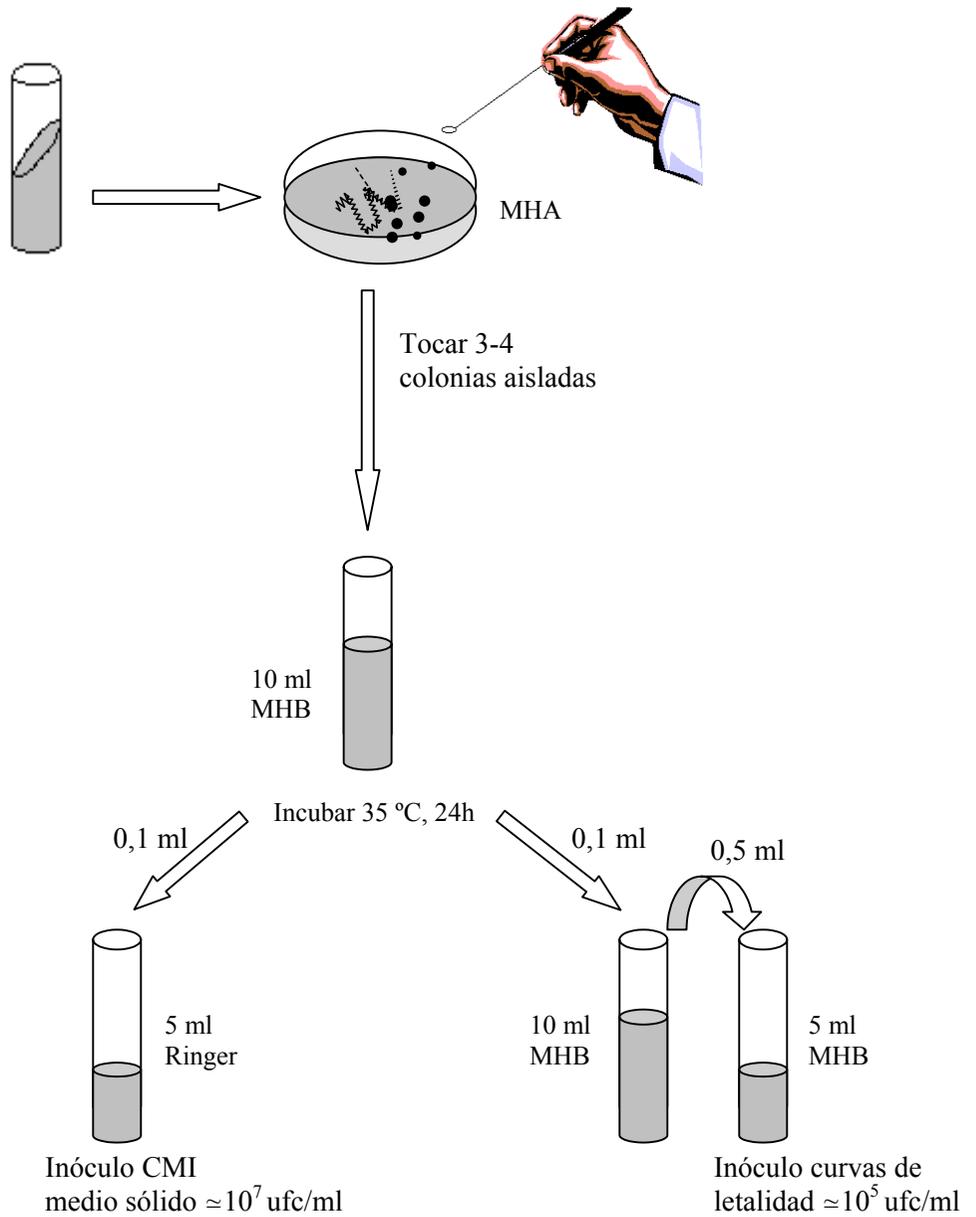
El ofloxacino se obtiene a partir del preparado comercial Tarivid® (Hoescht Farma) para infusión por vía i.v.

El flumequino (6,4 mg) se disuelve en 10 ml de NaOH 0,1 N.

### 2.4.2.2. Preparación del inóculo

El inóculo se ha preparado siguiendo los siguientes pasos:

- 1) A partir del tubo de agar inclinado en que se tienen sembradas las cepas, se hace un cultivo en MHA y se incuba durante 24 horas a 35 °C.
- 2) Se tocan unas tres colonias del cultivo en MHA y se siembran en un tubo de MHB que se incuba durante 18-24 horas a 35 °C.
- 3) Tras el tiempo de incubación, la concentración de bacterias se diluye convenientemente en Ringer para obtener un valor de  $10^7$  ufc/ml para el cálculo de la CMI en medio sólido. En la Figura 2.2 se pueden observar los pasos seguidos en la preparación del inóculo bacteriano.



**Figura 2.2.** Preparación del inóculo bacteriano utilizado en las pruebas de la actividad antimicrobiana.

### 2.4.2.3. Cálculo de la concentración mínima inhibidora en medio sólido

La CMI se ha determinado por el método de dilución en agar, siguiendo las recomendaciones del comité nacional para estándares de laboratorio clínico (NCCLS) (209). Se han ensayado las siguientes concentraciones: 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,12, 0,06, 0,03, 0,015, 0,007, 0,004, 0,002, 0,001 µg/ml. Como cepas control se han utilizado *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 19606, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

En nuestro caso, se ha trabajado con una batería de tubos de vidrio Pyrex<sup>®</sup> estériles de 15x150 mm, que contenían concentraciones de antibiótico 10 veces superiores a las que se utilizan para el cálculo de la CMI. Estas suspensiones se diluyen 1/10 con medio de cultivo MHA y se depositan en placas, de forma que se obtiene una serie de 18 placas, cada una de ellas con una concentración diferente de quinolona, además de otra placa sin antimicrobiano que se utiliza como control de crecimiento. Las placas se siembran con ayuda de un inoculador multipunto Denley (Figura 2.4), que deposita sobre la placa 1 µl de la suspensión de bacterias (inóculo), por lo que la cantidad de bacterias en cada impronta fue del orden de 10<sup>4</sup> ufc. De este modo, pueden ensayarse hasta 21 cepas bacterianas por placa.

El procedimiento utilizado, que se expone de forma esquemática en la Figura 2.3, se lleva a término para cada una de las quinolonas que constituyen el objeto del trabajo de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. En cada uno de los tubos de una serie de 17, se deposita un mililitro de tampón fosfato pH 8, excepto en el primer tubo. El número de tubos que

se preparan depende del número de concentraciones que se requieran para el análisis. En nuestro caso, puesto que se ensayaron 17 concentraciones de antibiótico, se necesita, obviamente, una serie de 18 tubos.

2. Al primer tubo de la serie, vacío hasta el momento, se le añaden 2 ml de la solución madre del antibiótico, obtenida según se ha indicado en el apartado 2.4.2.1, a una concentración de 640  $\mu\text{g/ml}$ , de forma que este valor es 10 veces superior a la mayor concentración de antibiótico deseada. Del primer tubo se transfiere 1 ml al segundo, que se mezcla bien con el mililitro de tampón fosfato pH 8 que ya contenía, de tal forma que el volumen final en el segundo tubo es de 2 ml, del que se toma 1 ml y se lleva al tercer tubo. Se repite este proceso de diluciones dobles seriadas de razón 2 en tampón fosfato pH 8 sucesivamente con todos los tubos, hasta que se llega al último, del cual se elimina 1 ml.

Tras este proceso, el volumen final en todos los tubos es de 1 ml.

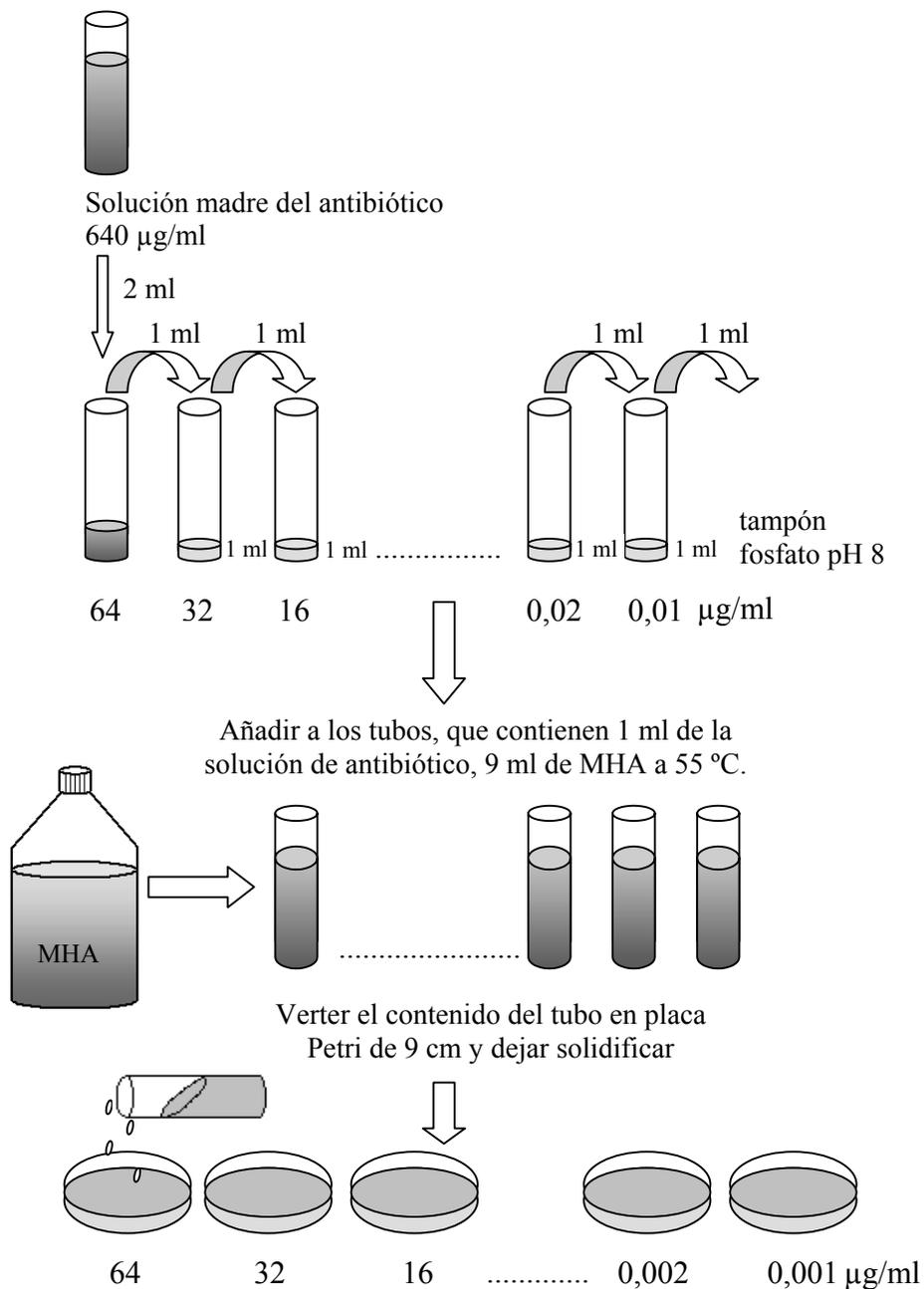
3. Posteriormente se añade a los tubos 9 ml de MHA fundido, con lo que el antibiótico se diluye 10 veces con MHA y se deposita sobre una placa de Petri estéril de 9 cm de diámetro. Además, se dispone otra placa con 10 ml de MHA que se utiliza como control de crecimiento.

4. Una vez solidificado el medio, se procede a depositar los inóculos (preparados según se ha indicado en el apartado 2.4.2.2.) sobre las mismas, con ayuda del inoculador multipunto Denley.

5. Una vez finalizado el proceso anteriormente descrito, se llevan todas las placas a incubar en la estufa durante 18-24 horas a 35 °C.

6. Transcurrido el tiempo de incubación se procede a la lectura de los resultados. La CMI corresponde a la concentración más baja que no presenta crecimiento visible del microorganismo.

**Materiales y métodos 104**

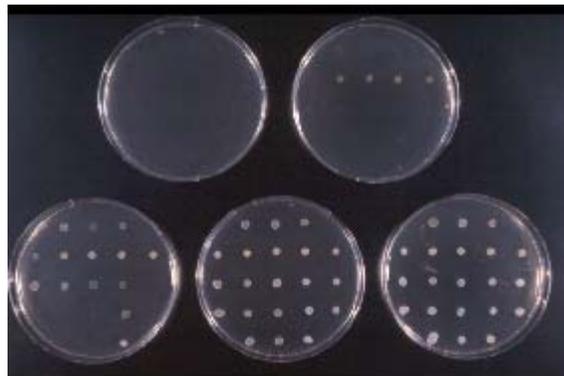


**Figura 2.3.** Procedimiento seguido para la determinación de la CMI en medio sólido.

En la Figura 2.4 se puede observar el inoculador multipunto Denley y en la Figura 2.5 cinco placas representativas de los resultados obtenidos.



**Figura 2.4.** *Inoculador multipunto Denley.*



**Figura 2.5.** *Imagen de los resultados obtenidos, en la determinación de la CMI.*

En la realización de todos los pasos descritos hasta aquí, se debe tener siempre la precaución de trabajar en ambiente estéril, para evitar contaminaciones. Esto se consigue utilizando tampones y materiales estériles y trabajando siempre cerca de la llama de un mechero, que creará una zona de esterilidad en el campo de trabajo, o bien, en campana de flujo laminar.

### **2.4.3. Ensayos cinéticos de la actividad bactericida de los antimicrobianos**

Con el fin de estudiar la actividad bactericida de las quinolonas se han realizado las curvas de mortalidad-tiempo a concentraciones superiores e inferiores a la CMI.

La técnica para determinar las curvas de letalidad consiste en inocular una serie de tubos que contienen concentraciones conocidas de antibiótico, con una cantidad determinada de bacterias. A tiempos establecidos se toma una muestra de la suspensión que, convenientemente diluida, se siembra en placas de agar. Después de incubarlas durante 24 horas a 35 °C, se cuenta el número de unidades formadoras de colonias (ufc). Multiplicando el número de colonias por el volumen y la dilución ensayada, se obtiene el número de bacterias supervivientes. Se ensayan dos o tres diluciones de cada concentración de antibiótico y más de una placa por dilución.

Antes de llevar a efecto estas pruebas es conveniente determinar una serie de parámetros, entre ellos:

➤ Efecto del antibiótico arrastrado con la muestra. Es importante determinarlo, ya que de lo contrario puede considerarse como bactericida una

concentración en la que la disminución del número de ufc se debe a la acción del antibiótico arrastrado con la muestra. Esta determinación consiste en extender volúmenes conocidos de cada concentración de antibiótico a ensayar sobre una placa de cultivo, dejar secar unos 30 minutos y, posteriormente, sembrar una concentración conocida de bacterias. Después de incubar 24 h se compara el número de colonias de las placas con antibiótico con el de las placas control. Se puede considerar que no hay efecto de arrastre si la diferencia de ufc es menor del 25% en una cierta concentración.

➤ Límite de la detección de la técnica. Se define como el número mínimo de ufc que puede detectar la técnica con una reproducibilidad expresada como coeficiente de variación menor del 25%.

➤ Reproducibilidad intraensayo. Se siembran varias placas, se comparan los resultados de la misma concentración de antibiótico y se calcula el coeficiente de variación obtenido el mismo día.

#### 2.4.3.1. Preparación del inóculo bacteriano

A partir de una colonia de 24 horas de crecimiento a 35 °C en una placa de MHA, se siembra un tubo de MHB y se incuba a 35 °C durante 18-24 h. Transcurrido este tiempo de incubación, la suspensión bacteriana se diluye 1/100 en el mismo medio de cultivo y posteriormente 1/10 al adicionarlo a los tubos problema. De esta forma, el inóculo bacteriano queda ajustado a una concentración aproximada de  $10^5$  ufc/ml, que es la que se utilizará a lo largo del ensayo. No obstante, en cada experiencia se ha cuantificado el número de células viables mediante contaje en placa. El proceso para la preparación del inóculo puede observarse en la Figura 2.1.

#### 2.4.3.2. Medios de cultivo y concentraciones de quinolona estudiadas

La cinética de la actividad bactericida de ciprofloxacino, 4'-N-metilciprofloxacino, 4'-N-etilciprofloxacino y 97-101, se ha determinado sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Estos compuestos han sido seleccionados por ser los elementos que presentan mayor actividad sobre *S. aureus*.

El medio de cultivo utilizado para las experiencias ha sido el caldo de cultivo MHB. Este medio permite que el microorganismo se multiplique y lleve a término sus reacciones metabólicas características.

Las concentraciones de quinolona ensayadas han sido las correspondientes a  $\frac{1}{4}$  CMI, CMI, 4 CMI, 16 CMI, 64 CMI y 256 CMI.

#### 2.4.3.3. Preparación del antimicrobiano y de los tubos de ensayo

A partir de la solución madre de antibiótico, preparada en el momento del ensayo, se realizan las diluciones necesarias para conseguir las concentraciones especificadas en el apartado anterior. Como medio de dilución se utiliza el mismo en el que se van a llevar a cabo las curvas de letalidad.

Para la preparación, se toma una serie de tubos de vidrio Pyrex<sup>®</sup> estériles de 15x150 mm, se les añade medio de cultivo y se realizan las diluciones apropiadas para obtener la concentración deseada de quinolona. En todas las series se prepara un tubo adicional, que no contiene antimicrobiano, y que sirve como control de crecimiento bacteriano. El volumen final de todos los tubos es de 5 ml.

A continuación se añade el inóculo en proporción 1/10, con lo que queda ajustado a una concentración aproximada de  $10^5$  ufc/ml según se ha indicado en el apartado 2.4.3.1. Una vez inoculados, todos los tubos se incuban en estufa a 35 °C.

#### 2.4.3.4. Toma de muestras

La toma de muestras se ha realizado a las 0, 1, 2, 3 y 4 horas de incubación en MHB. El procedimiento es el siguiente:

En tiempo 0 se determina el número de células viables en el tubo control y a las 1, 2, 3 y 4 horas de incubación se toman muestras de los diferentes tubos con la ayuda de una micropipeta calibrada. Según el tiempo transcurrido y la concentración del antimicrobiano en el tubo problema, se realizan las diluciones decimales necesarias de las muestras en Ringer  $\frac{1}{4}$  para obtener un número adecuado de colonias por placa, con el fin de realizar, sin dificultad, el recuento de bacterias viables. Se considera como número adecuado entre 30 y 300 colonias por placa.

Una vez obtenidas las diluciones deseadas se siembran en placas de MHA y se incuban a 35 °C durante 18-24 horas. De cada tiempo y concentración se siembran dos diluciones y de cada dilución se siembran dos o más placas de MHA. Transcurrido este tiempo, se procede al recuento del número de unidades formadoras de colonias que han crecido por placa.

Con el fin de reducir al máximo la incidencia de las condiciones de ensayo en las curvas de letalidad, todas las concentraciones correspondientes a cada quinolona se realizaron el mismo día. Además, se comprobó el valor de la CMI.

#### 2.4.3.5. Cálculo de la curva de mortalidad-tiempo

A partir del número de colonias que han crecido en las placas de MHA se calcula, teniendo en cuenta las correspondientes diluciones efectuadas, el número de ufc/ml presentes en los tubos problema. Representando el número de ufc/ml frente al tiempo de incubación en papel semilogarítmico se obtienen las curvas de letalidad correspondientes a cada concentración de antimicrobiano en el medio de cultivo estudiado.

A continuación, se busca la función matemática que mejor se ajusta a los datos experimentales obtenidos con el fin de determinar la cinética y poder calcular la constante de letalidad. Según la bibliografía consultada, los antibióticos pueden mostrar distintas cinéticas, de las cuales las más frecuentes son la monoexponencial, y la biexponencial o bifásica, que se describen a continuación:

##### 1) Cinética monoexponencial

La ecuación representativa del proceso, en la que la letalidad aumenta proporcionalmente con el tiempo de incubación, es:

$$N_T = N_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

en la que:  $N_T$  representa el número de ufc/ml en un determinado tiempo  $t$  (h),  $N_0$  es el número de ufc/ml en tiempo cero,  $k$  corresponde a la constante de letalidad ( $h^{-1}$ ) y  $t$  al tiempo de incubación (h).

Aplicando logaritmos neperianos o decimales en la ecuación 2.1 se obtienen las siguientes transformaciones lineales de la misma:

$$\ln N_T = \ln N_0 - k \cdot t \quad \text{Ecuación 2.2}$$

$$\log N_T = \log N_0 - \frac{k}{2,303} \cdot t \quad \text{Ecuación 2.3}$$

que permiten estimar la constante  $k$  que corresponde a las condiciones de ensayo.

## 2) Cinética biexponencial o bifásica

La ecuación general en este caso, en la que hay dos velocidades de letalidad, una de ellas rápida ( $k_1$ ), y otra más lenta ( $k_2$ ), es:

$$N_T = N_0 \left[ \alpha e^{-k_1 t} + (1 - \alpha) e^{-k_2 t} \right] \quad \text{Ecuación 2.4}$$

en la que se han mantenido los símbolos anteriores y  $\alpha$  es un parámetro.

En las dos cinéticas, el número de ufc en un tiempo determinado ( $N_T$ ) depende del inóculo ( $N_0$ ) y de una serie de factores que se engloban en la constante de letalidad o crecimiento ( $k$ ), cuyo valor depende, entre otras variables, de las condiciones de incubación, del medio de cultivo, de la concentración de antibiótico y del inóculo.

En ambos casos es posible la existencia de un periodo de latencia en el comienzo de la acción bactericida ( $\Delta t$ ). En esta situación se obtienen las ecuaciones 2.5 y 2.6, según se trate de una cinética mono o biexponencial, respectivamente:

$$N_T = N_0 \cdot e^{-k \cdot (t - \Delta t)} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

$$N_T = N_0 \left[ \alpha e^{-k_1 (t - \Delta t)} + (1 - \alpha) e^{-k_2 (t - \Delta t)} \right] \quad \text{Ecuación 2.6}$$

en las que todos los símbolos son conocidos.

Los ajustados matemáticos se han realizado simultáneamente para todas las concentraciones de cada antibiótico con ayuda del programa SigmaPlot 4.0, basado en el algoritmo de Marquardt. El cálculo de las constantes se ha llevado a cabo mediante un análisis de regresión lineal de los logaritmos neperianos de las ufc/ml en función del tiempo (Ecuación 2.2). Esto corresponde al tratamiento de los datos por regresión no lineal utilizando una función de ponderación igual a  $1/y^2$ . Como criterio de la bondad del ajustado se emplea los parámetros que se describen a continuación:

➤ El coeficiente de correlación,  $r$ , se utiliza como criterio estadístico para evaluar la correlación lineal. Cuanto más se aproxima el valor de  $r^2$  a la unidad, en términos absolutos, tanto más fiable es el resultado (302).

➤ La desviación estándar de los parámetros,  $\sigma$ . Mediante el programa de ajuste de datos empleado se obtiene los parámetros de la ecuación utilizada, acompañados de sus desviaciones estándar. La desviación estándar constituye un buen indicador de la fiabilidad del ajustado obtenido, ya que expresa la precisión con la que se ha estimado el parámetro.

➤ La suma de cuadrados,  $SC$ , se utiliza para juzgar la calidad de los ajustados no lineales. Este parámetro estadístico equivale al sumatorio de los cuadrados de las diferencias entre los valores experimentales y los valores predichos por la ecuación obtenida tras el ajustado.

$$SC = \sum w_i \cdot (y_i - \bar{y}_i)^2 \quad \text{Ecuación 2.7}$$

en la que  $w_i$  representa el factor de ponderación empleado,  $y_i$  representa los valores experimentales e  $\bar{y}_i$  los valores predichos por el modelo. Cuanto menor es el valor obtenido, tanto más fiable se considera el ajustado (302).

Por otro lado, para comparar la bondad relativa de los ajustes de las distintas ecuaciones a los datos, se ha utilizado la ecuación:

$$F = \frac{SC_1 - SC_2}{SC_2} \cdot \frac{v_2}{v_1 - v_2} \quad \text{Ecuación 2.8}$$

en la que **F** corresponde al estadístico de Snedecor, **SC<sub>1</sub>** y **SC<sub>2</sub>** representan la suma de cuadrados del ajustado sencillo y complejo, respectivamente y **v** los grados de libertad.

Además, se utiliza el criterio AIC (Akaike Information Criterion) en el mismo sentido. Se define mediante la ecuación:

$$AIC = N \cdot \ln SC + 2p \quad \text{Ecuación 2.9}$$

donde **N** es el número de datos experimentales, **p** el número de parámetros de la ecuación que se analiza, y **SC** la suma de cuadrados. El ajustado con menor AIC es el más probable.

➤ La dispersión de los residuales. Los residuales son los valores obtenidos por diferencia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. La representación gráfica de los mismos frente a los valores predichos de la variable dependiente informa sobre la bondad del ajustado y permite detectar desviaciones sistemáticas (302). Se considera que el ajustado es tanto más fiable cuanto más se aproximen los valores residuales a cero. Por otro lado, la distribución de los puntos debe ser totalmente aleatoria y no mostrar tendencia a la ordenación.

#### 2.4.3.6. Parámetros obtenidos de las curvas de letalidad

A partir de la ecuación de la curva de letalidad se obtienen parámetros de interés para establecer el mecanismo de acción de los antibióticos en estudio. Entre ellos destacan, por su utilidad, los siguientes:

- el período de latencia ( $\Delta t$ ),
- el tiempo que tarda la población en reducirse a la mitad,  $T_{1/2}$ , que equivale a  $T_{1/2} = \ln 2/k$  cuando se trata de una cinética monoexponencial,
- el tiempo necesario para reducir la población viable en un 90%,  $T_{90}$ , que corresponde a  $T_{90} = 2,303/k$  en una cinética monoexponencial,
- el tiempo en que la concentración es bactericida, es decir el tiempo en el que el descenso de ufc es de tres logaritmos con respecto al tiempo inicial (210),  $T_{99,9}$ , que se calcula como  $T_{99,9} = 6,908/k$  cuando se trata de una cinética monoexponencial.

#### 2.4.3.7. Comparación de las curvas de letalidad

La constante de letalidad para cada antimicrobiano se cuantifica por la pendiente de la curva de mortalidad. La comparación de las pendientes de las distintas concentraciones ensayadas permite estudiar el efecto de la concentración en la letalidad. Esta comparación entre las diferentes concentraciones ensayadas de cada quinolona se realiza mediante un análisis de varianza de una vía de las constantes, con ayuda del paquete estadístico SPSS 10.0, para poder determinar si las diferencias encontradas se deben al azar o bien son el resultado de una diferente actividad. Se toma como valor

de significación  $\alpha < 0,05$  y el test de Scheffé para establecer las diferencias individuales.

La representación gráfica de las constantes en ordenadas frente a la concentración en abcisas, permite un análisis visual de estos resultados. La ordenada en el origen corresponde a la tasa de crecimiento del control.

## 2.5. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Los antibióticos estudiados en la presente Memoria pertenecen a dos series homólogas, lo que permite establecer relaciones entre la estructura y la actividad de estos compuestos. Este tipo de relaciones, denominadas abreviadamente en muchas ocasiones, QSAR (siglas anglosajonas de “quantitative structure-activity relationships”) son, en principio, de naturaleza no lineal y su expresión matemática admite varias formas.

En realidad, de todas las expresiones que se han propuesto y considerando los casos más generales, parece bien consolidada la teoría de que, para este tipo de relaciones, la lipofilia es, con mucho, el factor más importante como parámetro indicativo de la estructura. Así lo afirman los trabajos más representativos e incluso los más recientes sobre la materia (31, 120-122, 137, 157, 159, 241, 301, 317), aunque existen factores adicionales que satisfacen posibles interacciones fármaco-receptor, como por ejemplo, enlaces de hidrógeno, superficies polares y apolares de las moléculas y de otros tipos, que pueden modular y mejorar la correlación.

De todas las expresiones que se han propuesto, se ha elegido la ecuación bilineal, altamente funcional, cuya expresión es:

$$\frac{1}{\text{MG CMI}} = \frac{L \cdot P^m}{1 + R \cdot P^n} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

en la que la inversa de la media geométrica de las CMI's (**1/MG CMI**) representa la actividad antimicrobiana de cada compuesto estudiado; **P** es la constante estructural equivalente a la lipofilia de éste, en el caso que nos ocupa, el coeficiente de reparto en fases líquidas entre n-octanol (considerado como el disolvente más afín a los sustratos biológicos) y una solución reguladora de pH 7,0 (ambas fases saturadas por agitación previa durante un tiempo adecuado y consiguiente reposo ulterior); la solución acuosa intenta reproducir las condiciones que prevalecen durante el ensayo. Los términos **L**, **R**, **m**, y **n** son parámetros del ajustado.

Las correlaciones bilineales se caracterizan por la existencia de dos rectas convergentes unidas por un tramo parabólico y en éste un valor intermedio óptimo de lipofilia, denominado **P<sub>0</sub>**, en el cual la actividad es máxima para una serie dada. El ajustado de los datos (**P**, **1/MG CMI**) se ha llevado a término con ayuda del programa SigmaPlot 4.0.

Como criterio para juzgar la bondad de las correlaciones estructura-actividad se ha utilizado el coeficiente de correlación, **r**, de la recta entre los valores experimentales de actividad y los que predice el modelo; la inclinación, **b**; y la ordenada en el origen, **a**, de la misma. Asimismo se considera el error estándar de los parámetros como indicativo de la precisión con que se estiman.

Por último se ha calculado el poder predictivo de la ecuación mediante los valores correspondientes a los heterólogos estudiados.

## **2.6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS EN *Streptococcus pneumoniae***

Con el fin de explicar de un modo convincente cómo y a qué nivel actúan los compuestos homólogos del ciprofloxacino, si bien es cierto que el modo de acción de las quinolonas sigue hasta el momento sin estar totalmente esclarecido, se ha procedido al estudio microbiológico específico de los **mecanismos bioquímicos** de la acción antimicrobiana. El estudio se ha realizado incluyendo técnicas de tipo microbiológico, de biología molecular y enzimáticas tan necesarias en los estudios modernos sobre la acción de las fluoroquinolonas. En concreto, la investigación se ha centrado en *Streptococcus pneumoniae*, determinando los efectos de la formación del complejo ternario de las quinolonas ensayadas en la ADN girasa y topoisomerasa IV bacteriana *in vitro*, con el propósito de conocer la diana específica de estos derivados alquilados en comparación con el ciprofloxacino, proporcionar información acerca del modo de acción de estos compuestos y comprobar si ello permite explicar las diferencias en la actividad observadas sobre este microorganismo.

Esta parte del trabajo se ha desarrollado en el St. George's Hospital Medical School, University of London, bajo la dirección del Doctor L. M. Fisher.

### 2.6.1. Actividad antimicrobiana de los homólogos del ciprofloxacino frente a determinadas cepas de *Streptococcus pneumoniae*

En primer lugar, para tratar de averiguar si se produce o no un cambio de diana con estos compuestos, se ha procedido al cálculo de la CMI con cepas que presentan mutaciones en lugares conocidos de los genes que codifican la girasa, la topoisomerasa IV o en ambas enzimas. De este modo, según la CMI aumente o permanezca inalterada orienta sobre cual es la primera diana de estos derivados. Las cepas utilizadas en el estudio se muestran en el Cuadro 2.4.

#### Cepas de *Streptococcus pneumoniae*

Cepa	Descripción
7785*	Cepa procedente de aislamiento clínico sensible al ciprofloxacino y al esparfloxacino
1C1	Mutante de primer paso derivado de 7785 seleccionado <i>in vitro</i> por resistencias al ciprofloxacino
2C6, 2C7	Mutantes de segundo paso al ciprofloxacino derivado del de primer paso
3C4	Mutante de tercer paso al ciprofloxacino derivado del de segundo paso
1S1, 1S4	Mutante de primer paso derivado de 7785 seleccionado <i>in vitro</i> por resistencias al esparfloxacino
2S1, 2S4	Mutante de segundo paso al esparfloxacino derivado de 1S1

\* cepa clínica sensible a ciprofloxacino aislada en el St. George's Hospital Medical School, Londres, UK

**Cuadro 2.4.** Cepas utilizadas en el estudio de la CMI de las quinolonas. Estas cepas se obtuvieron según se describe en las referencias 226, 227 y 230.

Para el cálculo de la CMI, el medio de cultivo MHA se esteriliza en autoclave y se deja enfriar en baño termostático a 50 °C, se añade la sangre de caballo, se mezcla y se añade el antibiótico a una concentración diez veces superior a la que se quiere ensayar. La solución se vierte entonces sobre placas Petri estériles que se dejan solidificar. Se siembran las cepas y las placas se incuban a 37° C durante 18-24 h. Transcurrido ese tiempo se procede a la lectura de los resultados.

Todas las cepas de *Streptococcus pneumoniae* se han sembrado en MHA conteniendo un 5% (V/V) de sangre de caballo y se han incubado aeróbicamente a 37 °C durante 18-24 h. La CMI se ha determinado según el método de diluciones dobles seriadas recomendado por el NCCLS (209) conforme se ha descrito en el epígrafe 2.4.2.3.

### **2.6.2. Estudio *in vitro* de la formación del complejo ternario (“cleavage”) por las topoisomerasas de *Streptococcus pneumoniae***

Se ha procedido al estudio *in vitro* del complejo de unión producido por las quinolonas en estudio sobre el ADN. Se acepta que este método reproduce muy fielmente lo que ocurre en el interior de la célula bacteriana, puesto que parece ser que la formación de este complejo ternario es el proceso que inicia la acción antibacteriana de las quinolonas.

Las condiciones utilizadas para la purificación de la girasa y topoisomerasa IV de *S. pneumoniae* se han descrito previamente (229). Estas enzimas han sido proporcionadas por el grupo de trabajo del St. George’s Hospital Medical School para la realización de la presente Memoria. Los ensayos del “cleavage” sobre el ADN también se han llevado a cabo según un

## **Materiales y métodos 120**

método establecido por el grupo de trabajo mencionado que se encuentra descrito en la bibliografía (229).

### 2.6.2.1. Reactivos y tampones

#### ➤ Tampón Tris-Borato-EDTA (TBE)

Se prepara mezclando los componentes en las siguientes concentraciones:

- 90 mM Tris base
- 90 mM Tris ácido bórico
- 2 mM EDTA

El TBE se utiliza para preparar el gel de agarosa y como tampón en el que se lleva a cabo la electroforesis.

#### ➤ Tampón de carga de la muestra de ADN

- 0,25 % (P/V) azul de bromofenol
- 15% (P/V) Ficoll tipo 400

Este tampón se añade a las muestras de ADN y se utiliza para cargarlas en el gel previo a la electroforesis. Este tampón se añade porque confiere color azul y además tiene un peso molecular elevado con lo que ayuda a que la muestra sedimente en el pocillo al cargar el gel para llevar a cabo la electroforesis.

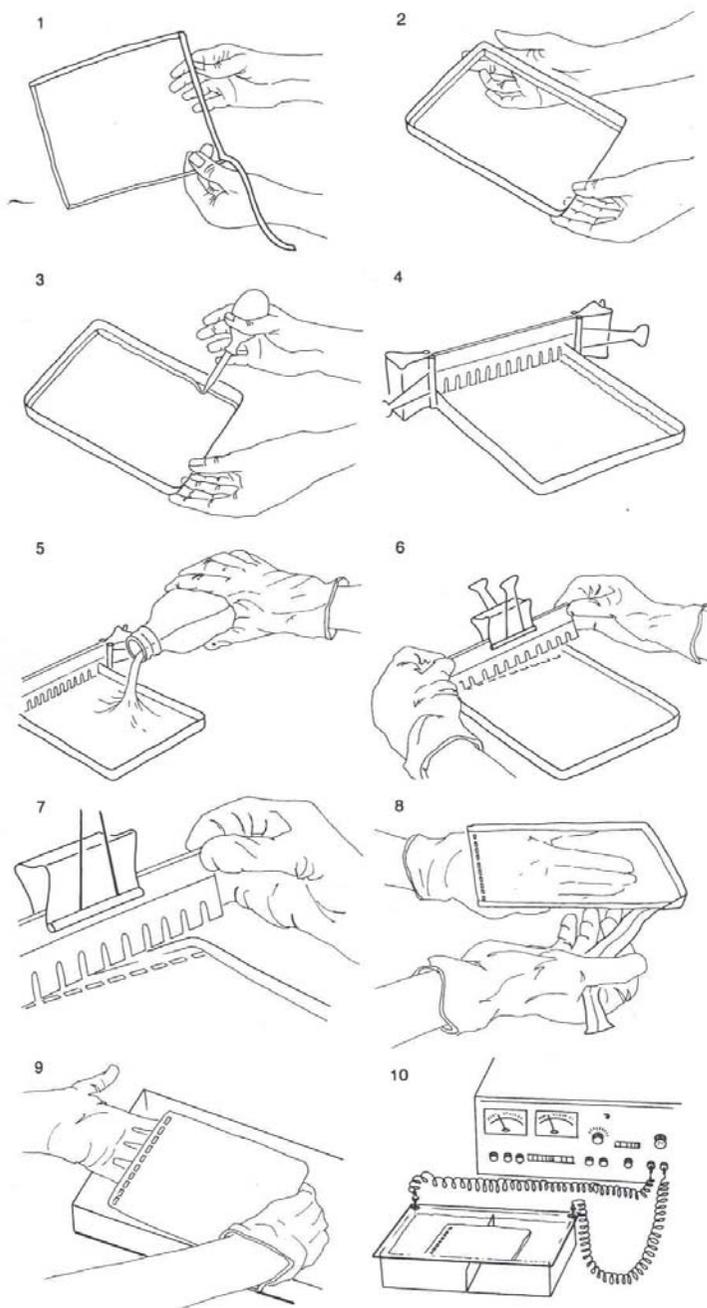
#### ➤ Electroforesis en gel de agarosa (1%)

La agarosa es un polisacárido neutro, adecuado para separar un amplio ámbito de moléculas según su tamaño, lo que se consigue al variar el tamaño del poro a través de cambios en la concentración del gel. La agarosa

tiene la propiedad de fundir en presencia del tampón deseado hasta obtener una solución transparente y clara. La solución se vierte en un molde y forma una matriz cuya densidad depende de la concentración de agarosa. Cuando se aplica un campo eléctrico a través del gel, el ADN que está cargado negativamente a pH neutro, migra hacia el ánodo. La tasa de migración está determinada por varios factores, entre ellos el tamaño y la conformación de la molécula de ADN, de forma que a mayor tamaño, el ADN migra más lentamente. En nuestro caso, el ADN lineal migra con mayor lentitud que el ADN superenrollado. Un esquema de este proceso se muestra en la Figura 2.6.

Las muestras de ADN obtenidas se han analizado por electroforesis en gel de agarosa 1% (P/V). El gel se prepara calentando la agarosa en tampón TBE en microondas hasta que el polvo queda completamente disuelto. La solución se deja enfriar y se vierte en los moldes colocando el peine para formar los pocillos, con cuidado de no formar burbujas de aire. El gel debe tener entre 3 y 5 mm de grosor, se deja solidificar a temperatura ambiente aproximadamente 30 minutos, se retira el peine, se separa del molde y se sumerge en tampón TBE antes del uso. Las muestras de ADN se cargan en los pocillos y se utilizan marcadores del tamaño de ADN para asegurar el tamaño de los fragmentos de ADN en el gel. La electroforesis se lleva a cabo a un voltaje constante de 80 V durante dos horas. Tras la electroforesis, el gel se tiñe sumergiéndolo en tampón TBE conteniendo 1  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio durante 30 minutos en agitación. A continuación, se lava en agua durante diez minutos y se visualiza. Las bandas de ADN se pueden observar en un transiluminador UV y se fotografían utilizando un filtro rojo y una película Polaroid 665.

Materiales y métodos 122



**Figura 2.6.** Esquema del proceso llevado a cabo para la preparación del gel de agarosa utilizado durante la electroforesis de las muestras de ADN.

### 2.6.2.2. Estudio del “cleavage” en la topoisomerasa IV

Para estudiar el “cleavage” que producen los antibióticos y establecer el efecto de la concentración de antibiótico utilizada, se lleva a cabo la siguiente reacción:

1. Se colocan en un baño de hielo varios tubos eppendorf estériles con 2  $\mu\text{l}$  de la quinolona a concentración 10 veces superior al ámbito que se quiere estudiar, pues en los pasos sucesivos se produce una dilución 1/10.

2. Se añade a cada tubo con el antibiótico 18  $\mu\text{l}$  de la mezcla siguiente:

➤ 5  $\mu\text{l}$  del tampón 4x T4, que contiene:

- 1 M Tris 7,5
- 1 M  $\text{MgCl}_2$
- 1 M DTT
- 2 M Glucamato potásico
- 20 mg/ml BSA
- 1M NaCl

➤ 0,4  $\mu\text{l}$  del plásmido PBR322 (0,1  $\mu\text{g/ml}$ )

➤ volumen necesario de la mezcla ParC y ParE para tener 0,45  $\mu\text{g}$  y 1,7  $\mu\text{g}$  de las proteínas ParC y ParE, respectivamente. Esta mezcla debe permanecer previamente en hielo durante 10 minutos, para asegurar la polimerización de ambas subunidades de la topoisomerasa IV.

➤ Agua destilada hasta ajustar el volumen a 18  $\mu\text{l}$ .

3. Se centrifugan los tubos unos segundos para asegurar que los componentes se mezclan y se incuban en un baño a 37 °C durante una hora.

#### **Materiales y métodos 124**

4. Se sacan los tubos del baño y se añade 2  $\mu$ l de LSS 2% (dodecil sulfato sódico). Este compuesto atrapa al complejo fármaco-ADN-enzima.
5. Se añade 2,5  $\mu$ l de proteinasa K (1 mg/ml), se centrifuga unos segundos y se lleva al baño a 37 °C durante 30 minutos para que ésta actúe.
6. Se sacan los tubos del baño y se añade 5  $\mu$ l de 5x tampón de carga.
7. Se cargan las muestras en el gel de agarosa, junto con dos controles de ADN, uno superenrollado y otro lineal.
8. Se realiza la electroforesis a 80 V durante un par de horas.
9. Se tiñe el gel con bromuro de etidio durante 30 minutos en agitación. Este compuesto se une al ADN y hace que al observar el gel bajo luz ultravioleta, las bandas de ADN se vean brillantes. Transcurridos los 30 minutos, se lava el gel unos 10 minutos con agua para eliminar el exceso de colorante.
10. Se observan las bandas de ADN en el transiluminador y se calcula la  $CC_{25}$  que se define como la concentración de fluoroquinolona que convierte el 25% del ADN superenrollado PBR322 a la forma lineal en presencia de la topoisomerasa IV.

#### **2.6.2.3. Estudio del “cleavage” en la girasa**

Para estudiar el “cleavage” que producen los antibióticos y establecer si éste depende de la concentración de antibiótico utilizada, se lleva a cabo la siguiente reacción:

1. Se colocan en un baño de hielo varios tubos eppendorf estériles con 3  $\mu\text{l}$  de la quinolona a concentración 10 veces superior al rango que se quiere estudiar, puesto que en los pasos sucesivos se produce una dilución 1/10.

2. Se añade a cada tubo con el antibiótico 18  $\mu\text{l}$  de la mezcla siguiente:

➤ 10  $\mu\text{l}$  del tampón 3x GAM<sup>ATP</sup>, que contiene:

- 35 mM Tris 7,5
- 6 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1,8 mM espermidina
- 24 mM KCl
- 5 mM DTT
- 0,36 mg/ml BSA
- 6,5% glicerol

➤ 0,4  $\mu\text{l}$  del plásmido PBR322 (0,1  $\mu\text{g/ml}$ )

➤ volumen necesario de la mezcla GyrA y GyrB para tener 0,45  $\mu\text{g}$  y 1,7  $\mu\text{g}$  de las proteínas GyrA y GyrB, respectivamente. Esta mezcla debe permanecer previamente en hielo durante 10 minutos, para asegurar la polimerización de ambas subunidades de la girasa.

➤ Agua destilada hasta ajustar el volumen a 27  $\mu\text{l}$ .

3. Se centrifugan los tubos unos segundos para asegurar que los componentes se mezclan y se incuban en un baño a 25 °C durante una hora.

4. Se sacan los tubos del baño y se añade 3  $\mu\text{l}$  de LSS 2%.

5. Se añade 3  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (1 mg/ml), se centrifuga unos segundos y se lleva al baño a 37 °C durante 30 minutos para que ésta actúe.

6. Se sacan los tubos del baño y se añade 7  $\mu$ l de 5x tampón de carga.
7. Se cargan las muestras en el gel de agarosa, junto con dos controles de ADN, uno superenrollado y otro lineal.
8. Se realiza la electroforesis a 80 V durante un par de horas.
9. Se tiñe el gel con bromuro de etidio durante 30 minutos en agitación. Finalmente, se lava el gel unos 10 minutos con agua para eliminar el exceso de colorante.
10. Se observan las bandas de ADN en el transiluminador y se calcula la  $CC_{25}$  en presencia de la girasa.

### **2.7. BALANCE ACTIVIDAD-BIODISPONIBILIDAD**

Se trata de un criterio aplicable a la relación de candidatos en una serie homóloga dada, que intenta complementar los estudios de actividad con el aprovechamiento del medicamento cuando se desea administrar éste por vía oral (260).

Utiliza, por una parte, la actividad antibacteriana *in vitro* (1/GM CMI) y, por otra, la biodisponibilidad absoluta, calculada mediante estudios de absorción *in situ* ( $F_{calc}$ ) (24, 193, 260), ambos comparados con los valores de la quinolona modelo o patrón de la serie estudiada.

Estos dos valores, en conjunto, generan una escala de balance actividad-biodisponibilidad (BAB) muy útil para la selección de candidatos a

fármacos merecedores de ulterior estudio en fases ya más avanzadas de desarrollo.

### 2.7.1. Ecuación de trabajo

El balance actividad-biodisponibilidad se expresa matemáticamente como sigue:

$$BAB = CA \cdot CF = \frac{1/GM\ CMI_{(candidato)}}{1/GM\ CMI_{(patrón)}} \cdot \frac{F_{calc\ (candidato)}}{F_{calc\ (patrón)}} \quad \text{Ecuación 2.11}$$

expresión en la cual CA considera las medias geométricas de actividad y CF las biodisponibilidades orales, ambas relativas, es decir, respecto al patrón, para cada compuesto y cada especie ensayados.

Respecto a los parámetros de actividad, CA se calcula, simplemente, haciendo el cociente entre el valor 1/GM CMI obtenido para cada compuesto que se estudia y el hallado para el patrón o compuesto de referencia en cada especie ensayada.

Por su parte, dado que queda fuera de los objetivos de la Tesis, la biodisponibilidad oral absoluta no se ha determinado experimentalmente. Para su utilización se predicen los valores de los distintos compuestos mediante la ecuación:

$$F_{calc} = 1 - e^{-T \cdot k_a} \quad \text{Ecuación 2.12}$$

que ha demostrado su utilidad para este grupo terapéutico (260), ya que presenta errores de predicción inferiores al 20% en un amplio margen de lipofilia. En la ecuación  $F_{calc}$  representa la biodisponibilidad intrínseca que se predice para un candidato dado en la rata (y, por extensión, en el hombre,

aunque se trate de cifras aproximativas),  $k_a$  es la constante de absorción *in situ* determinada experimentalmente en animales y  $T$  es el tiempo de tránsito intestinal necesario para la absorción *in vivo*, es decir, el periodo de tiempo durante el cual permanece en la zona útil para la absorción (intestino delgado completo) la solución acuosa del compuesto administrada por vía oral, que equivale a  $0,93 \pm 0,06$  horas para el tipo de compuestos ensayados.

CF se calcula, a partir de los valores de biodisponibilidad absoluta predichos a través de la ecuación 2.12, mediante el cociente entre  $F_{calc}$  hallado para cada compuesto en estudio y el obtenido para el patrón.

## *Capítulo III: Resultados*

---

### **3.1. ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

#### **3.1.1. Cepas de referencia**

Se han utilizado 21 cepas de referencia de la colección americana de cultivos tipo (ATCC) para el cálculo de la CMI, con el fin de obtener una primera aproximación de resultados en las nuevas series de homólogos. Los resultados obtenidos para la serie 4'-N-alquilciprofloxacino completa se muestran en el Cuadro 3.1. Los datos correspondientes a la serie 3'-metil,4'-N-alquilciprofloxacino se obtuvieron en un trabajo previo (286).

## Resultados 130

Como se observa, para algunos microorganismos la CMI se mantiene en valores similares a los del ciprofloxacino, para otros se mejora y, sin embargo, en otros casos el valor obtenido es mayor. Frente a algunas cepas los distintos homólogos se comportan de forma diferente. Finalmente, de un modo general, se puede afirmar que la actividad de los homólogos con un grupo pentil y hexil es mucho menor que la que presenta el resto de las sustancias, por lo que se han omitido las pruebas subsiguientes con estos dos compuestos.

Con objeto de comprobar si los resultados preliminares obtenidos son característica de cepa o de género, se ha ampliado el estudio a los microorganismos que presentan mayor sensibilidad a los derivados que al fármaco patrón, es decir, Gram positivos en general y algunas especies de Gram negativos. De este modo, se han ensayado más cepas de microorganismos Gram positivos, incluyendo varios géneros y cepas resistentes a meticilina y/o ciprofloxacino. En el Cuadro 3.2 se muestran los resultados obtenidos para la serie 4'-N-alkilciprofloxacino.

Los resultados expuestos en el Cuadro 3.2 dieron paso a un estudio exhaustivo sobre cepas de *S. aureus* resistentes a ciprofloxacino y/o meticilina, para poder investigar si estos homólogos podrían ser una solución ante el importante problema de resistencias. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 3.3.

Se puede comprobar no obstante, que las CMIs de los homólogos, siendo inferiores a las de ciprofloxacino en las cepas resistentes, no mejoran de manera significativa la actividad del compuesto de referencia.

Microorganismo	CMI (µg/ml)						
	CIP	Metil-CIP	Etil-CIP	Propil-CIP	Butil-CIP	Pentil-CIP	Hexil-CIP
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,001	≤ 0,001	0,007	0,007	0,12	0,06	0,12
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	0,004	0,004	0,06	0,06	0,5	0,25	0,5
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	0,004	0,004	0,03	0,06	0,25	0,12	0,5
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	0,002	0,004	0,03	0,03	0,25	0,12	0,5
<i>Klebsiella neumoniae</i> ATCC 18883	0,007	0,004	0,015	0,06	0,25	0,12	0,5
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	0,004	0,004	0,06	0,06	0,5	0,25	1
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	≤ 0,001	≤ 0,001	0,007	0,007	0,06	0,03	0,12
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	0,004	0,002	0,007	0,015	0,25	0,06	0,12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9721	0,06	0,25	0,5	1	8	4	16
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 19606	0,5	0,03	0,12	0,25	1	0,5	4
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	0,06	0,004	0,03	0,06	0,25	0,25	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,004	0,004	0,06	0,06	0,5	0,25	1
<i>Morganella morganii</i> NCTC 235	≤ 0,001	≤ 0,001	0,015	0,015	0,12	0,06	0,12
<i>Yersinia enterocolitica</i> CECT 559	0,25	0,015	0,25	0,12	4	2	4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,25	0,015	0,06	0,06	0,5	0,25	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,5	0,015	0,06	0,12	0,5	0,25	0,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 144990	0,12	0,007	0,03	0,06	0,25	0,25	0,25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	0,12	0,015	0,03	0,12	0,5	0,25	0,5
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341A	0,06	0,004	0,015	0,03	0,12	0,06	0,25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 1904E	0,03	0,004	0,015	0,03	0,12	0,06	0,12
<i>Bacillus cereus</i> HLF 55	0,12	0,015	0,06	0,12	0,5	0,12	0,5
Media geométrica	0,020	0,006	0,035	0,054	0,368	0,182	0,512
Valor máximo	0,5	0,25	0,5	1	8	4	16
Valor mínimo	0,001	0,001	0,007	0,007	0,06	0,03	0,12

**Cuadro 3.1.** CMIs de la serie 4'-N-alquilciprofloxacino para las cepas de referencia ensayadas.

## Resultados 132

Microorganismo	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	CIP	Metil-CIP	Etil-CIP	Propil-CIP	Butil-CIP
<i>Staphylococcus</i> Cip <sup>R</sup> SE-104	$\geq 16$	16	16	16	$\geq 16$
<i>Staphylococcus aureus</i> Cip <sup>R</sup> M <sup>R</sup> SaMR-10	$\geq 16$	8	4	8	$\geq 16$
<i>Streptococcus faecium</i> SF-1	$\geq 16$	16	16	16	$\geq 16$
<i>Streptococcus faecium</i> SF-2	$\geq 16$	16	16	16	$\geq 16$
<i>Streptococcus faecium</i> SF-4	$\geq 16$	16	16	8	$\geq 16$
<i>Streptococcus faecalis</i> SD-1	0,5	1	0,5	1	2
<i>Streptococcus faecalis</i> SD-2	0,5	1	0,5	1	2
<i>Streptococcus viridans</i> SV-1	0,5	1	0,5	1	2
<i>Streptococcus viridans</i> SV-2	0,5	1	0,5	1	2
<i>Streptococcus viridans</i> SV-3	1	2	2	4	4
<i>Streptococcus viridans</i> SV-4	1	2	2	4	4
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,25	0,06	0,06	0,12	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6558-P	0,12	0,06	0,03	0,06	0,12
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0,25	0,06	0,06	0,12	0,12
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,25	0,06	0,06	0,12	0,25
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,5	1	0,5	1	2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 12432	0,03	0,015	0,03	0,06	0,06
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 14884	0,25	0,03	0,03	0,06	0,06
Media geométrica	0,958	0,783	0,621	1,025	1,514
Valor máximo	16	16	16	16	16
Valor mínimo	0,03	0,015	0,03	0,06	0,06

Cip<sup>R</sup>: cepa resistente a ciprofloxacino; M<sup>R</sup>: cepa resistente a meticilina

**Cuadro 3.2.** CMI de la serie 4'-N-alquilciprofloxacino para los microorganismos Gram positivos.

Microorganismo	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	CIP	Metil-CIP	Etil-CIP	Propil-CIP	Butil-CIP
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,25	0,06	0,06	0,12	0,25
<i>Staphylococcus capitis</i> SE-83	0,25	0,12	0,12	0,25	0,5
<i>Staphylococcus luganensis</i> SE-93	0,12	0,06	0,06	0,12	0,25
<i>Staphylococcus warnerii</i> SE-94	0,12	0,06	0,06	0,12	0,25
<i>Staphylococcus haemoliticus</i> SE-95	0,25	0,06	0,06	0,12	0,25
<i>Staphylococcus saprofiticus</i> SP-1	1	0,5	0,5	1	2
<i>Staphylococcus saprofiticus</i> SP-2	0,25	0,25	0,25	0,5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> SEM-90	2	1	0,5	0,25	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> SEM-91	2	1	0,5	0,25	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> SEM-93	0,5	0,5	0,5	1	1
<i>Streptococcus faecium</i> SF-4	64	32	32	64	128
<i>Staphylococcus</i> Cip <sup>R</sup> SE-103	32	32	16	32	64
<i>Staphylococcus</i> Cip <sup>R</sup> SE-104	32	32	16	32	32
<i>Staphylococcus</i> Cip <sup>R</sup> SE-105	32	32	32	32	64
<i>Staphylococcus haemoliticus</i> Cip <sup>R</sup> M <sup>R</sup> SE-90	16	8	2	8	16
<i>Staphylococcus hominis</i> Cip <sup>R</sup> M <sup>R</sup> SE-92	256	32	16	32	64
<i>Staphylococcus haemoliticus</i> Cip <sup>R</sup> M <sup>R</sup> SE-97	256	16	32	64	128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Cip <sup>R</sup> M <sup>R</sup> SEMR-92	64	32	16	64	128
<i>Staphylococcus aureus</i> Cip <sup>R</sup> M <sup>R</sup> SaMR-10	16	8	4	8	32
<i>Staphylococcus aureus</i> Cip <sup>R</sup> M <sup>R</sup> SaMR-11	16	8	4	8	32
<i>Staphylococcus aureus</i> Cip <sup>R</sup> M <sup>R</sup> SaMR-14	16	8	4	8	32
Media geométrica	4,547	2,116	1,521	2,761	6,783
Valor máximo	256	32	32	64	128
Valor mínimo	0,12	0,06	0,06	0,12	0,25

**Cip<sup>R</sup>**: cepa resistente a ciprofloxacino; **M<sup>R</sup>**: cepa resistente a meticilina

**Cuadro 3.3.** CMI de la serie 4'-N-alkilciprofloxacino para los microorganismos Gram positivos.

## Resultados 134

En conjunto y teniendo en cuenta los estudios previos (286), estos resultados preliminares han definido tanto la serie de compuestos a ensayar como los géneros más representativos que puedan dar información general acerca de la actividad de estas sustancias. De esta forma, las sustancias en estudio son:

- Homólogos de la serie 4’N-alkilciprofloxacino (serie A): desde el compuesto con un grupo metilo hasta el derivado con un radical butilo.
- Homólogos de la serie 3’metil,4’N-alkilciprofloxacino (Serie B): desde el derivado no sustituido hasta el hasta el compuesto con un grupo butilo.
- Heterólogos de referencia: grepafloxacino, ofloxacino, flumequino, esparfloxacino y sarafloxacino.

Los géneros microbianos seleccionados son:

- Gram negativos {
  - Escherichia coli*
  - Acinetobacter calcoaceticus*
  - Achromobacter spp.*
  - Moraxella catarrhalis*
- Gram positivos {
  - Staphylococcus aureus*
  - Staphylococcus coagulasa negativos*
  - Enterococcus faecalis*
  - Streptococcus pneumoniae*

### 3.1.2. Microorganismos Gram negativos

#### 3.1.2.1. *Escherichia coli*

Los resultados del ciprofloxacino y de los compuestos de las series homólogas y de la serie de los heterólogos sobre 20 cepas de *Escherichia coli* se resumen en el Cuadro 3.4. Este cuadro permite comparar los principales parámetros de actividad de cada una de las quinolonas ensayadas.

Serie	Quinolona	Intervalo de CMI	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Moda	MG
Homólogos 4'N-alquil- ciprofloxacino	CIP	0,004 - 0,5	0,007	0,25	0,007	0,014
	Metil-CIP	0,015 - 0,5	0,03	0,25	0,015	0,041
	Etil-CIP	0,007 - 0,5	0,015	0,25	0,015	0,029
	Propil-CIP	0,03 - 1	0,06	0,5	0,06	0,090
	Butil-CIP	0,12 - 4	0,25	1	0,12	0,343
Homólogos 3'metil,4'N-alquil- ciprofloxacino	97-100	0,004 - 0,5	0,007	0,25	0,007	0,017
	97-101	0,007 - 1	0,03	0,5	0,015	0,043
	97-102	0,03 - 1	0,06	1	0,03	0,087
	97-103	0,06 - 2	0,12	2	0,12	0,187
	97-104	0,12 - 4	0,25	2	0,12	0,321
Heterólogos	GRX	0,002 - 0,5	0,015	0,5	0,015	0,025
	OFX	0,015 - 0,5	0,03	0,5	0,03	0,063
	FLQ	0,25 - 16	0,5	8	0,5	0,968

**MG:** Media geométrica; **CMI<sub>50</sub>:** Concentración que inhibe el 50% de las cepas; **CMI<sub>90</sub>:** Concentración que inhibe el 90% de las cepas.

**Cuadro 3.4.** Parámetros de la actividad antimicrobiana ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las sustancias estudiadas en *Escherichia coli* ( $n=20$ ).

A la luz de los resultados se puede comprobar que sólo el 97-100 presenta parámetros muy similares a los del ciprofloxacino. El resto de homólogos muestran valores superiores a los del patrón, de forma que la diferencia aumenta con la lipofilia. Es decir, la actividad de los homólogos disminuye al aumentar su lipofilia. Tampoco ningún compuesto heterólogo muestra un aumento de actividad significativo con respecto al ciprofloxacino.

En el Cuadro 3.5 se puede observar la concordancia existente entre las CMI's de los compuestos homólogos y heterólogos estudiados y el ciprofloxacino para las 20 cepas ensayadas de *E. coli*. Si se consideran los resultados cepa a cepa se aprecia que los derivados 4'-N-metil, 4'-N-etilciprofloxacino, 97-100 y 97-101 presentan valores de CMI cercanos a los del ciprofloxacino, lo que indica una actividad muy similar a la del patrón. De hecho, las CMI's se sitúan entre una dilución menor a dos diluciones  $\log_2$  mayor que las CMI's del ciprofloxacino. El resto de los compuestos homólogos presentan valores de CMI una o más diluciones superiores a las del ciprofloxacino, por lo que se puede afirmar que su actividad es inferior.

Respecto a los heterólogos, el grepafloxacino presenta una actividad muy similar a la del patrón, el ofloxacino muestra una actividad ligeramente inferior y el flumequino es la quinolona menos activa de todas las estudiadas puesto que sus CMI's son siempre tres o más diluciones mayores.

En la Figura 3.1 se representa gráficamente la distribución de las CMI's de las quinolonas estudiadas en las 20 cepas ensayadas de *E. coli*. Esta figura permite comparar los resultados de las dos series homólogas y de los heterólogos con los del ciprofloxacino. Se puede observar que los primeros compuestos de cada serie, es decir, los menos lipófilos, presentan una distribución de CMI más parecida a la del patrón; mientras que los demás

compuestos se desplazan hacia la derecha, lo que indica mayor valor de CMI o menor actividad.

En la Figura 3.2, se representan los porcentajes acumulados de la CMI de cada uno de los compuestos en las 20 cepas de *E. coli*.

Serie	Quinolona	Número de cepas								
		-1 log <sub>2</sub>	mismo resultado	+1 log <sub>2</sub>	+2 log <sub>2</sub>	+3 log <sub>2</sub>	+4 log <sub>2</sub>	+5 log <sub>2</sub>	+6 log <sub>2</sub>	+7 log <sub>2</sub>
	Metil-CIP	1	0	5	14					
Homólogos 4'N-alkuil- ciprofloxacino	Etil-CIP	2	1	11	6					
	Propil-CIP		2	0	3	13	2			
	Butil-CIP			2	0	0	5	10	1	
	97-100		16	3	0	1				
Homólogos 3'metil, 4'N-alkuil- ciprofloxacino	97-101	1	2	7	9	1				
	97-102			2	4	14				
	97-103				2	3	14	1		
	97-104				2	1	3	14		
	GRX		6	9	5					
Heterólogos	OFX		2	1	9	8				
	FLQ					2	0	0	12	6

**Cuadro 3.5.** Concordancia de las CMIs de las quinolonas estudiadas con la CMI del ciprofloxacino en *Escherichia coli* (n=20).

Resultados 138

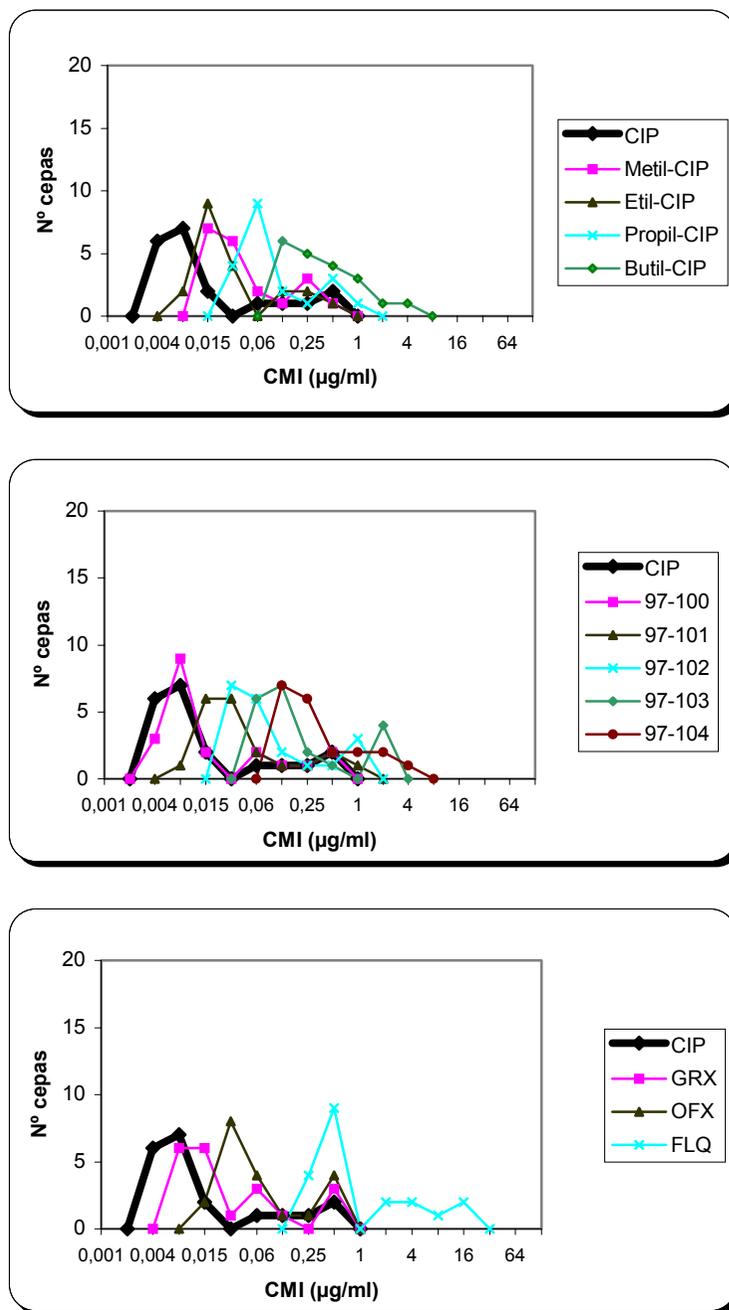


Figura 3.1. Distribución de la CMI de los compuestos estudiados en 20 cepas de *Escherichia coli*.

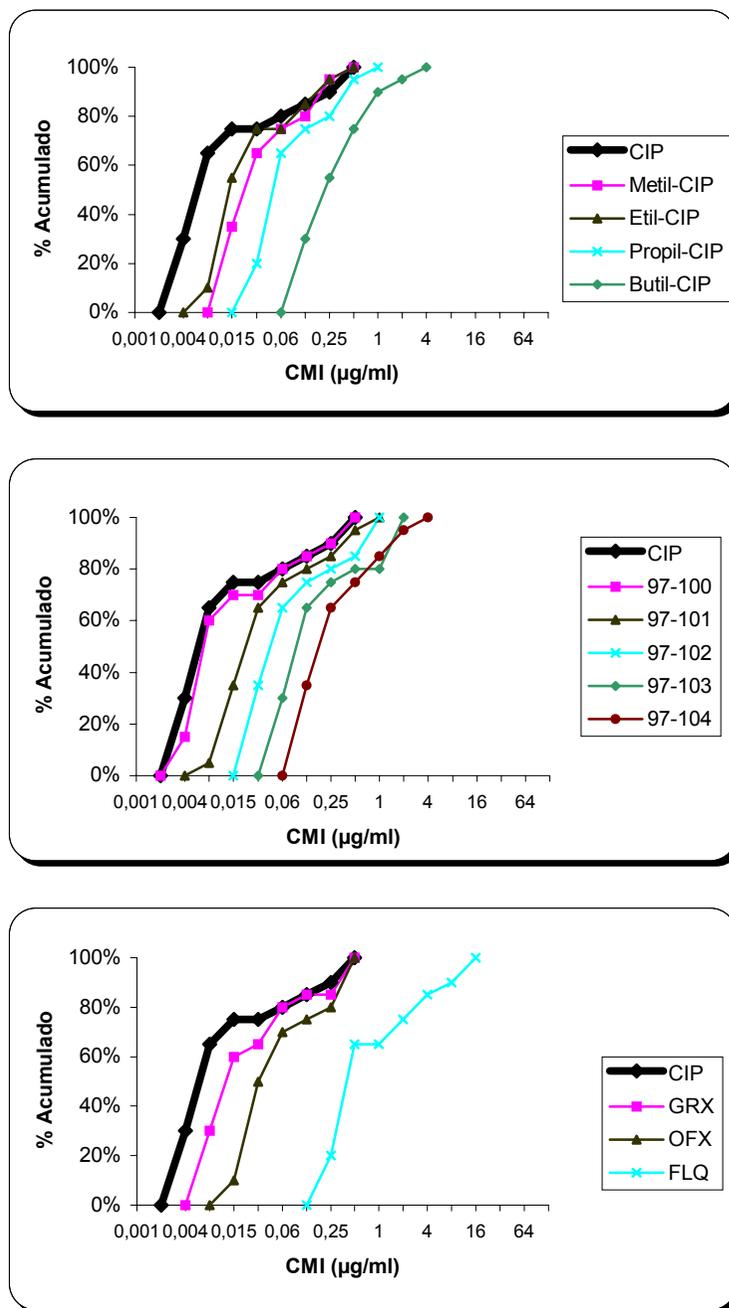


Figura 3.2. Porcentaje acumulado de la CMI para las quinolonas estudiadas en 20 cepas de *Escherichia coli*.

## Resultados 140

### 3.1.2.2. *Acinetobacter calcoaceticus*

Los resultados del ciprofloxacino, de los compuestos de las dos series homólogas y de la serie de los heterólogos sobre 20 cepas de *Acinetobacter calcoaceticus* se resumen en el Cuadro 3.6. Este cuadro presenta los principales parámetros de actividad de cada una de las quinolonas ensayadas.

Serie	Quinolona	Intervalo de CMI	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Moda	MG
Homólogos 4'N-alkil- ciprofloxacino	CIP	0,12 - 2	0,5	0,5	0,5	0,378
	Metil-CIP	0,03 - 0,06	0,06	0,06	0,06	0,046
	Etil-CIP	0,06 - 0,12	0,12	0,12	0,12	0,091
	Propil-CIP	0,12 - 0,25	0,25	0,25	0,25	0,208
	Butil-CIP	0,5 - 1	0,5	1	0,5	0,660
Homólogos 3'metil,4'N-alkil- ciprofloxacino	97-100	0,06 - 0,25	0,25	0,25	0,25	0,180
	97-101	0,06 - 0,12	0,06	0,12	0,06	0,071
	97-102	0,12 - 0,25	0,12	0,25	0,12	0,161
	97-103	0,25 - 0,5	0,25	0,5	0,5	0,354
	97-104	0,5 - 1	0,5	1	1	0,707
Heterólogos	GRX	0,015 - 0,12	0,06	0,12	0,12	0,058
	OFX	0,25 - 0,5	0,25	0,5	0,5	0,354
	FLQ	1 - 2	1	1	1	1,072

**MG:** Media geométrica; **CMI<sub>50</sub>:** Concentración que inhibe el 50% de las cepas; **CMI<sub>90</sub>:** Concentración que inhibe el 90% de las cepas.

**Cuadro 3.6.** Parámetros de la actividad antimicrobiana ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las sustancias estudiadas en *Acinetobacter calcoaceticus* ( $n=20$ ).

Todos los elementos homólogos de ambas series, a excepción de 4'-N-butilciprofloxacino y 97-104, presentan parámetros inferiores a los del patrón. Si la atención se centra en la media geométrica, conviene destacar los derivados 4'-N-metilciprofloxacino y 97-101 cuyo valor es 8,31 y 5,30 veces inferior al del ciprofloxacino, respectivamente. También otros homólogos presentan valores de media geométrica inferiores a la del patrón: en 4'-N-etilciprofloxacino es 4,16 veces inferior y 97-102, 97-100 y 4'-N-propilciprofloxacino son aproximadamente la mitad (2,35, 2,10 y 1,82 veces menor, respectivamente). Respecto a los heterólogos, sólo el grepafloxacino muestra mayor actividad que el patrón, con una media geométrica 6,52 veces inferior.

En el Cuadro 3.7 se observa la concordancia de las CMI's entre los compuestos estudiados y el ciprofloxacino para las 20 cepas de *Acinetobacter calcoaceticus*. Destaca que los compuestos con un grupo metil, etil y propil de la serie 4'-N-alkilciprofloxacino y los derivados 97-100, 97-101 y 97-102 de la serie 3'-metil,4'-N-alkilciprofloxacino, presentan valores de CMI inferiores a los del ciprofloxacino. De hecho, la mayoría de las cepas difieren más de  $1 \log_2$  siempre inferior, e incluso se obtienen CMI's 3 y 4  $\log_2$  inferiores en el derivado 4'-N-metilado de ambas series. El resto de los compuestos homólogos, 4'-N-butilciprofloxacino, 97-103 y 97-104, presentan valores de CMI una o dos diluciones superior o inferior a las del patrón. Respecto a los heterólogos, se observa que el grepafloxacino presenta una actividad superior a la del ciprofloxacino, si bien es inferior a la de los derivados metilados de ambas series. El ofloxacino muestra una actividad igual y el flumequino es la quinolona menos activa de todas las estudiadas.

En la Figura 3.3 se representa la distribución de las CMI's de las quinolonas estudiadas en las 20 cepas ensayadas de *A. calcoaceticus*. Se

**Resultados 142**

observa que los dos primeros compuestos de cada serie, presentan una distribución de CMI muy inferior a la del patrón, mientras que en los demás compuestos ésta se solapa con la de aquél. Sólo el último derivado de cada serie homóloga se sitúa ligeramente desplazado a la derecha del patrón.

En la Figura 3.4 se representan los porcentajes acumulados de la CMI de cada uno de los compuestos en las 20 cepas de *A. calcoaceticus*. En ella se corroboran las conclusiones expuestas.

Serie	Quinolona	Número de cepas							
		-4 log <sub>2</sub>	-3 log <sub>2</sub>	-2 log <sub>2</sub>	-1 log <sub>2</sub>	mismo resultado	+1 log <sub>2</sub>	+2 log <sub>2</sub>	+3 log <sub>2</sub>
Homólogos 4 <sup>o</sup> N-alkil- ciprofloxacino	Metil-CIP	2	16	2					
	Etil-CIP		2	16	2				
	Propil-CIP			2	13	5			
	Butil-CIP					5	14	1	
Homólogos 3 <sup>o</sup> metil, 4 <sup>o</sup> N-alkil- ciprofloxacino	97-100			2	17	1			
	97-101	1	6	12	1				
	97-102			5	14	1			
	97-103				3	16	1		
	97-104					3	16	1	
Heterólogos	GRX		13	7					
	OFX				3	16	1		
	FLQ						11	8	1

**Cuadro 3.7.** Concordancia de las CMIs de las quinolonas estudiadas con la CMI del ciprofloxacino en *Acinetobacter calcoaceticus* (n=20).

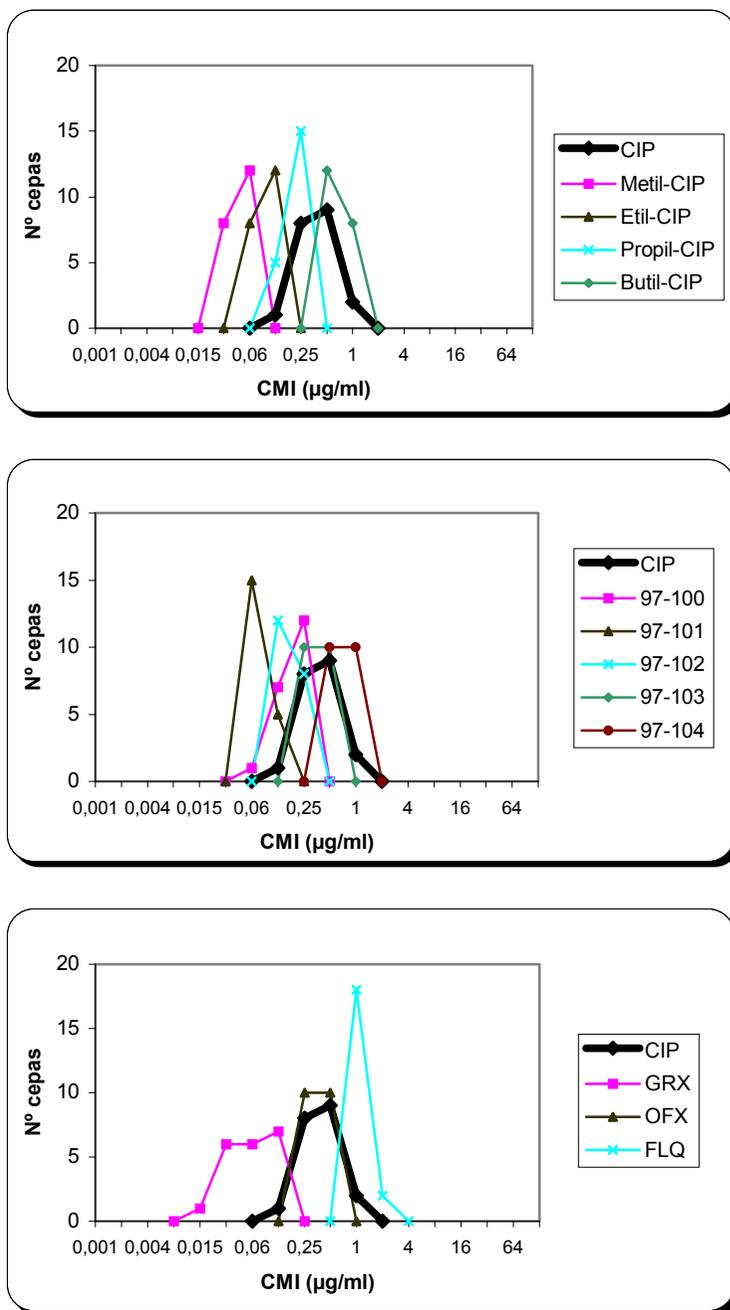


Figura 3.3. Distribución de la CMI de los compuestos estudiados en 20 cepas de *Acinetobacter calcoaceticus*.

Resultados 144

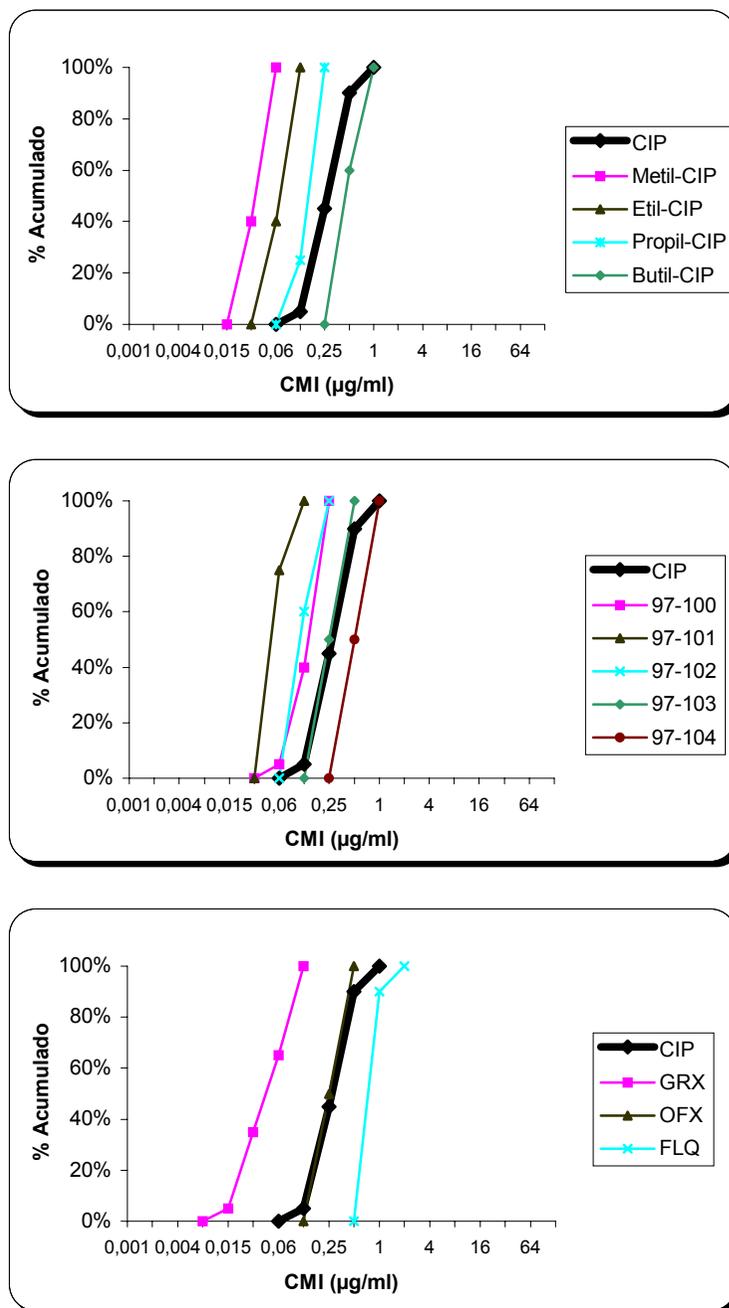


Figura 3.4. Porcentaje acumulado de la CMI para las quinolonas estudiadas en 20 cepas de *Acinetobacter calcoaceticus*.

3.1.2.3. *Achromobacter spp.*

Los resultados del ciprofloxacino, de los compuestos de las dos series homólogas y de la serie de los heterólogos sobre 18 cepas de *Achromobacter spp.* se resumen en el Cuadro 3.8, que permite comparar los principales parámetros de actividad de cada una de las quinolonas ensayadas.

Serie	Quinolona	Intervalo de CMI	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Moda	MG
Homólogos 4’N-alquil- ciprofloxacino	CIP	1 - 4	2	4	4	2,619
	Metil-CIP	1 - 4	2	4	2	2,245
	Etil-CIP	0,5 - 8	2	8	2	2,828
	Propil-CIP	1 - 8	4	8	4	4,666
	Butil-CIP	2 - 32	16	32	16	12,699
Homólogos 3’metil,4’N-alquil- ciprofloxacino	97-100	1 - 4	2	4	1	1,852
	97-101	1 - 8	4	8	4	4,320
	97-102	2 - 16	8	16	8	8,314
	97-103	4 - 32	16	32	16	18,665
	97-104	4 - 64	32	64	64	33,256
Heterólogos	GRX	0,5 - 4	2	4	2	2,333
	OFX	1 - 16	4	16	2	4,000
	FLQ	8 - 64	32	64	32	34,562

**MG:** Media geométrica; **CMI<sub>50</sub>:** Concentración que inhibe el 50% de las cepas; **CMI<sub>90</sub>:** Concentración que inhibe el 90% de las cepas.

**Cuadro 3.8.** Parámetros de la actividad antimicrobiana ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las sustancias estudiadas en *Achromobacter spp.* ( $n=18$ ).

## Resultados 146

Los dos primeros elementos de cada serie homóloga presentan parámetros similares a los del ciprofloxacino. No obstante, la media geométrica de los derivados 4'-N-metilciprofloxacino y 97-100 muestran valores ligeramente inferiores (1,17 y 1,41 veces menor, respectivamente) al del ciprofloxacino. 4'-N-etilciprofloxacino presenta valores muy similares a los del patrón y el resto de elementos homólogos muestran peor actividad.

En el Cuadro 3.9 se presenta la concordancia de las CMI's entre los compuestos estudiados y el ciprofloxacino para las 18 cepas utilizadas de *Achromobacter spp.* Destacan los primeros compuestos de ambas series homólogas por su mayor actividad, ya que la mayoría de las cepas presentan igual resultado ó 1 ó 2  $\log_2$  inferiores a ciprofloxacino. Los derivados 4'-N-etil, 4'-N-propilciprofloxacino, 97-101 y 97-102 tienen la misma actividad. El resto de los compuestos homólogos presentan valores de CMI varias diluciones superiores a las de ciprofloxacino. En cuanto a los heterólogos, el grepafloxacino presenta una actividad muy similar a la del ciprofloxacino. De igual modo, la actividad del ofloxacino coincide con la del patrón si se utiliza un criterio de  $\pm 2 \log_2$ , pero es algo inferior con un criterio más estricto. Flumequino es menos activo y muestra una actividad similar a la del 97-104.

En la Figura 3.5 se representa la distribución de las CMI's de las quinolonas estudiadas en las 18 cepas de *Achromobacter spp.* Las curvas en esta figura se encuentran más desplazadas a la derecha que en anteriores microorganismos, es decir las CMI's son más elevadas en conjunto. Por otra parte, todos los homólogos presentan una distribución de CMI muy similar a la del patrón, a excepción de los derivados más lipófilos (97-103, 97-104 y 4'-N-butilciprofloxacino) cuyas distribuciones se desplazan a la derecha. Respecto a los heterólogos, tanto el grepafloxacino como el ofloxacino

muestran una distribución muy similar a la del patrón, mientras que el flumequino se sitúa muy a la derecha del resto de compuestos.

En la Figura 3.6 se representan los porcentajes acumulados de la CMI de cada compuesto en las 18 cepas de *Achromobacter spp.* Se comprueba, de nuevo, que 4’N-metil y 4’N-etilciprofloxacino se asemejan al ciprofloxacino. Los compuestos más lipófilos de esta serie, con una distribución más sesgada a la derecha, confirman su menor actividad. En la serie 3’metil,4’N-alquilciprofloxacino sólo el compuesto 97-100 se encuentra a la izquierda del patrón.

Serie	Quinolona	Número de cepas							
		-2 log <sub>2</sub>	-1 log <sub>2</sub>	mismo resultado	+1 log <sub>2</sub>	+2 log <sub>2</sub>	+3 log <sub>2</sub>	+4 log <sub>2</sub>	+5 log <sub>2</sub>
Homólogos 4’N-alquil- ciprofloxacino	Metil-CIP	1	3	13	1				
	Etil-CIP		4	8	6				
	Propil-CIP			5	11	2			
	Butil-CIP				3	7	8		
Homólogos 3’metil, 4’N-alquil- ciprofloxacino	97-100		9	9					
	97-101		1	4	12	1			
	97-102			1	4	13			
	97-103					5	11	2	
	97-104					3	2	11	2
Heterólogos	GRX		4	13	1				
	OFX			10	5	3			
	FLQ				1		3	13	1

**Cuadro 3.9.** Concordancia de las CMIs de las quinolonas estudiadas con la CMI del ciprofloxacino en *Achromobacter spp.* (n=18).

Resultados 148

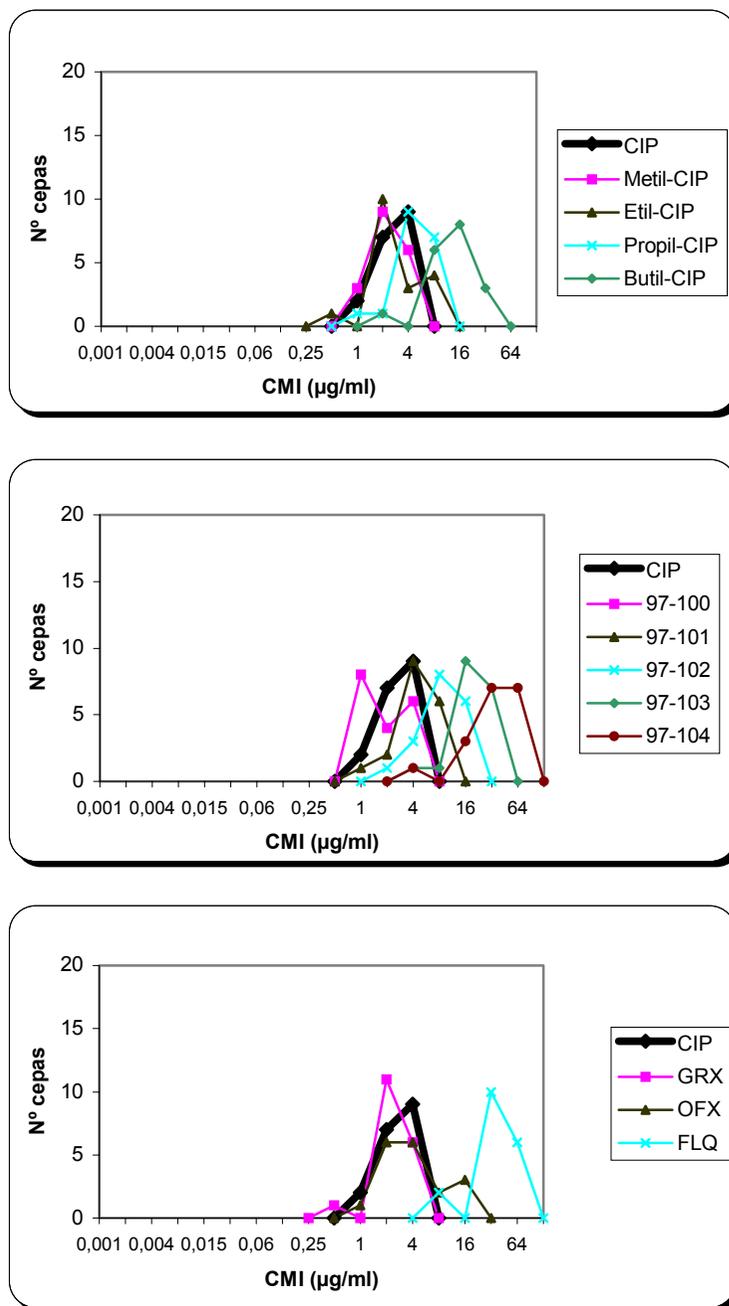


Figura 3.5. Distribución de la CMI de los compuestos estudiados en 18 cepas de *Achromobacter* spp.

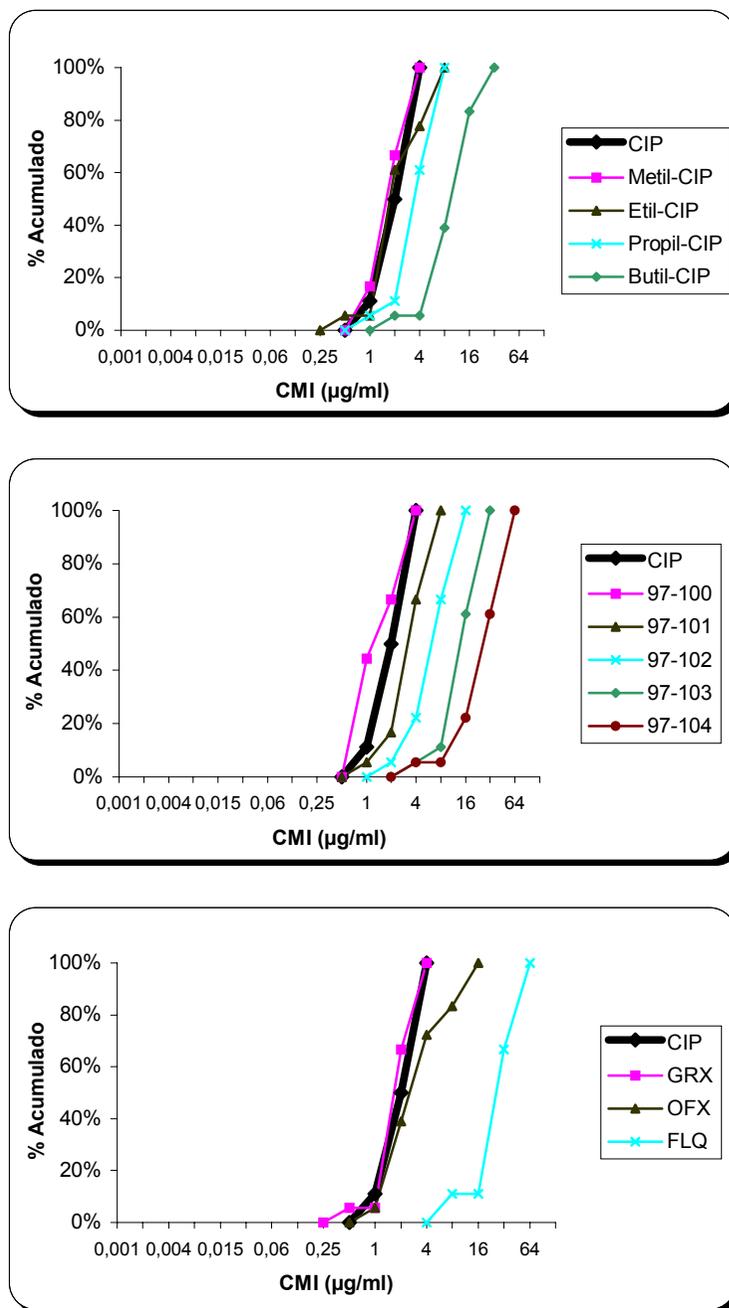


Figura 3.6. Porcentaje acumulado de la CMI para las quinolonas estudiadas en 18 cepas de *Achromobacter* spp.

**Resultados 150**

3.1.2.4. *Moraxella catarrhalis*

Los resultados del ciprofloxacino, de los compuestos de las dos series homólogas y de la serie de los heterólogos sobre 20 cepas de *Moraxella catarrhalis* se resumen en el Cuadro 3.10. Este cuadro permite comparar los principales parámetros de actividad de cada una de las quinolonas ensayadas.

Serie	Quinolona	Intervalo de CMI	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Moda	MG
Homólogos 4’N-alkil ciprofloxacino	CIP	0,015 - 0,25	0,03	0,06	0,03	0,037
	Metil-CIP	0,007 - 0,12	0,015	0,03	0,015	0,021
	Etil-CIP	0,015 - 0,12	0,03	0,06	0,03	0,033
	Propil-CIP	0,03 - 0,25	0,06	0,12	0,06	0,062
	Butil-CIP	0,06 - 0,5	0,12	0,25	0,12	0,126
Homólogos 3’metil,4’N-alkil- ciprofloxacino	97-100	0,015 – 0,25	0,03	0,06	0,03	0,035
	97-101	0,015 – 0,12	0,03	0,06	0,015	0,029
	97-102	0,015 – 0,25	0,06	0,12	0,06	0,054
	97-103	0,03 – 0,5	0,06	0,12	0,03	0,060
	97-104	0,06 - 1	0,12	0,25	0,06	0,121
Heterólogos	GRX	0,007 - 0,12	0,007	0,03	0,007	0,014
	OFX	0,03 - 0,5	0,06	0,12	0,06	0,082
	SAR	0,015 - 0,25	0,03	0,06	0,03	0,038
	SPA	0,004 - 0,12	0,007	0,03	0,007	0,011

**MG:** Media geométrica; **CMI<sub>50</sub>:** Concentración que inhibe el 50% de las cepas; **CMI<sub>90</sub>:** Concentración que inhibe el 90% de las cepas.

**Cuadro 3.10.** Parámetros de la actividad antimicrobiana ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las sustancias estudiadas en *Moraxella catarrhalis* ( $n=20$ ).

Aunque los dos primeros elementos de cada serie presentan parámetros muy similares a los del patrón, si se atiende a la media geométrica, los derivados 4'N metilados muestran mejor actividad, ya que ésta es exactamente 1,76 (4'N-metilciprofloxacino) y 1,28 (97-101) veces menor.

En el Cuadro 3.11 se presenta el comportamiento cepa a cepa, y con ello, la concordancia de las CMI's entre los compuestos estudiados para las 20 cepas de *M. catarrhalis*. Destaca que los dos derivados más hidrófilos de ambas series presentan para la mayoría de las cepas la misma CMI o bien uno o dos  $\log_2$  inferior a la del patrón. 4'N-propilciprofloxacino, 97-102 y 97-103 poseen la misma actividad. Los dos compuestos más lipófilos, 4'N-butilciprofloxacino y 97-104, exhiben una actividad similar o inferior a la del ciprofloxacino, puesto que la mayoría de CMI's son dos diluciones  $\log_2$  superiores a las de aquél. Respecto a los heterólogos, el grepafloxacino, el sarafloxacino y el esparfloxacino presentan una actividad superior a la del ciprofloxacino. La quinolona más activa es el esparfloxacino, en la que las CMI's de 11 cepas son dos diluciones inferiores a las del patrón. El ofloxacino presenta un ámbito de CMI's muy similar al del ciprofloxacino.

En la Figura 3.7 se representa la distribución de las CMI's de las quinolonas estudiadas en las 20 cepas de *M. catarrhalis*. En este caso, todos los homólogos presentan distribuciones similares a la del patrón. Únicamente destaca el 4'N-metilciprofloxacino cuya distribución está desplazada a la izquierda y los derivados más lipófilos que se sitúan a la derecha del patrón. Respecto a los heterólogos, el grepafloxacino y el esparfloxacino, presentan distribuciones a valores muy inferiores al ciprofloxacino, el sarafloxacino es similar y el ofloxacino es el heterólogo con menor actividad, si bien del mismo orden que la del patrón.

**Resultados 152**

En la Figura 3.8 se representa los porcentajes acumulados de la CMI de cada compuesto en las 20 cepas de *M. catarrhalis*. Los compuestos más activos son grepafloxacino y esparfloxacino, seguido de 4’N metilciprofloxacino que es el homólogo más activo. El 97-101 también presenta una actividad ligeramente superior a la del ciprofloxacino, mientras que 97-100, 4’N-etilciprofloxacino y sarafloxacino se asemejan al patrón. Los demás elementos poseen una actividad inferior.

Serie	Quinolona	Número de cepas							
		-4 log <sub>2</sub>	-3 log <sub>2</sub>	-2 log <sub>2</sub>	-1 log <sub>2</sub>	mismo resultado	+1 log <sub>2</sub>	+2 log <sub>2</sub>	+3 log <sub>2</sub>
	Metil-CIP			2	12	6			
Homólogos 4’N-alkil- ciprofloxacino	Etil-CIP			1	2	16	1		
	Propil-CIP				1	4	14	1	
	Butil-CIP					1	4	15	
	97-100			1	1	17	1		
Homólogos 3’metil, 4’N-alkil- ciprofloxacino	97-101			1	6	12	1		
	97-102			1	0	7	11	1	
	97-103				1	5	13	1	
	97-104					1	5	13	1
Heterólogos	GRX		1	7	10	2			
	OFX					1	15	4	
	SAR			1	1	14	4		
	SPA	1	1	11	5	2			

**Cuadro 3.11.** Concordancia de las CMIs de las quinolonas estudiadas con la CMI del ciprofloxacino en *Moraxella catarrhalis* (n=20).

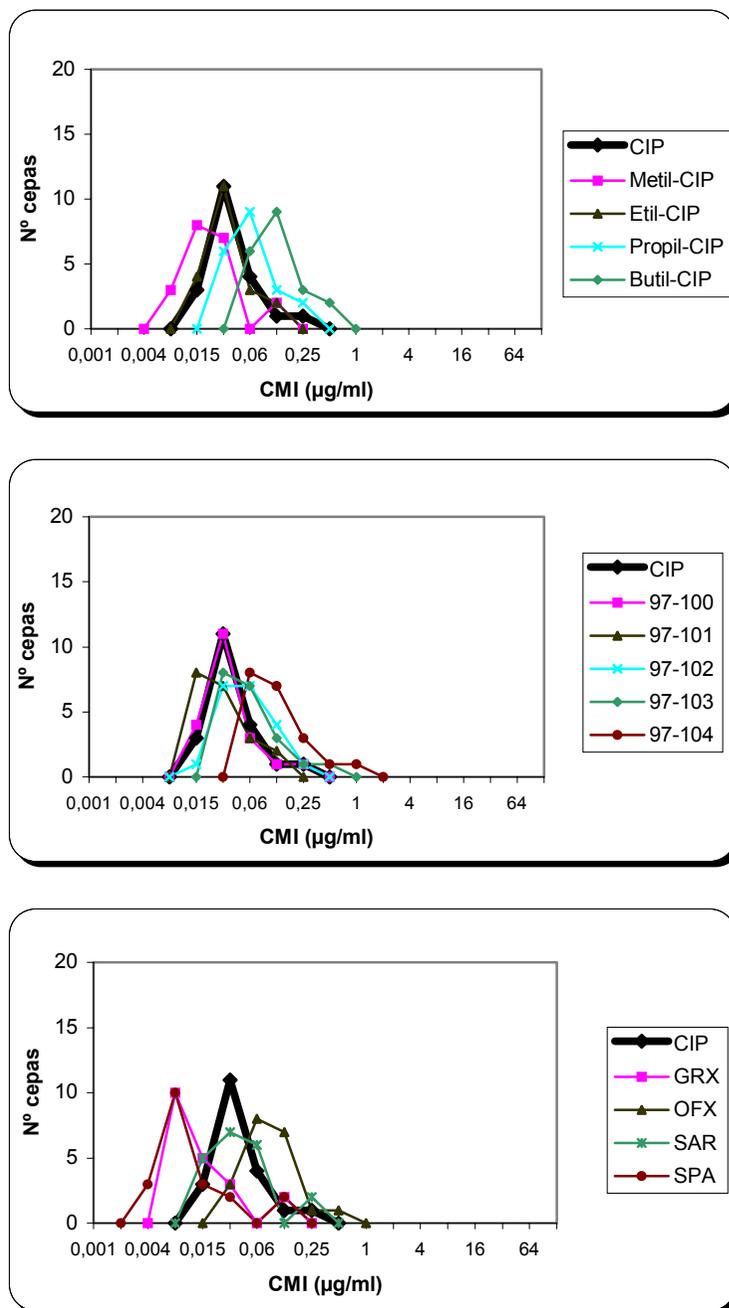


Figura 3.7. Distribución de la CMI de los compuestos estudiados en 20 cepas de *Moraxella catarrhalis*.

Resultados 154

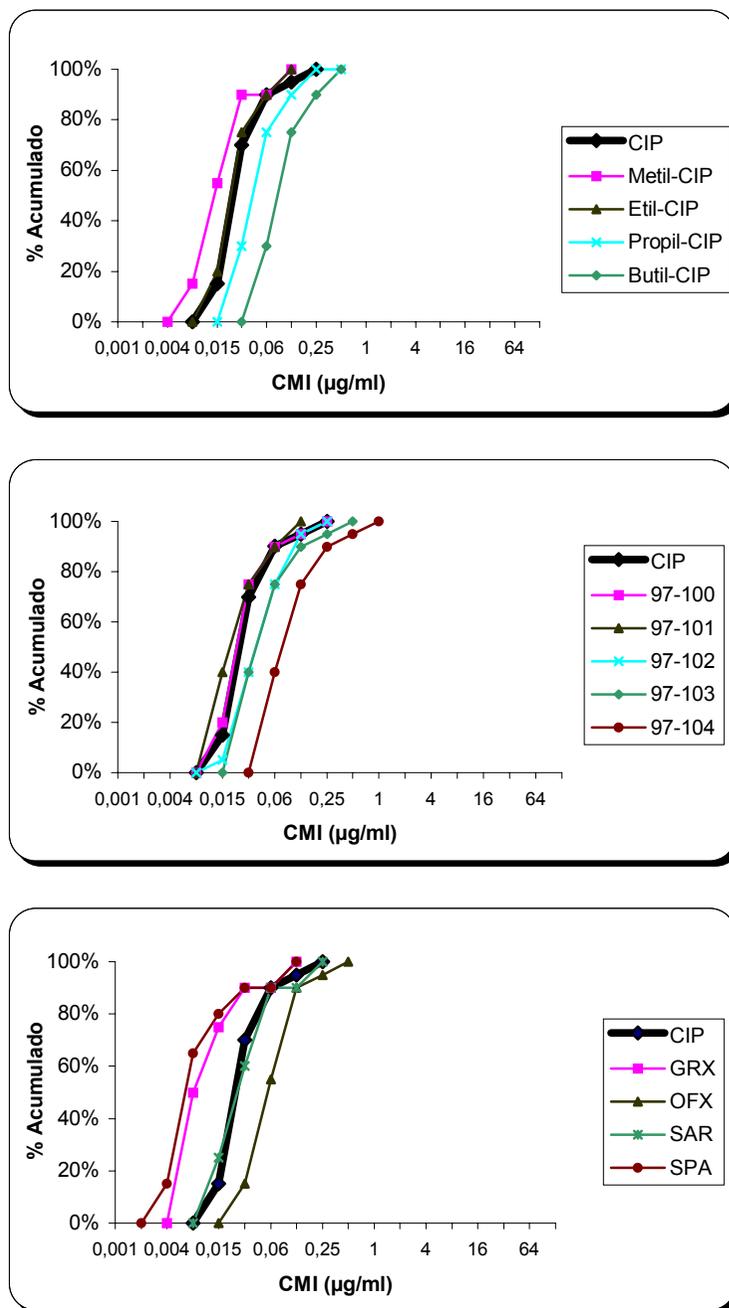


Figura 3.8. Porcentaje acumulado de la CMI para las quinolonas estudiadas en 20 cepas de *Moraxella catarrhalis*.

### 3.1.3. Microorganismos Gram positivos

#### 3.1.3.1. *Staphylococcus aureus*

Los resultados del ciprofloxacino y de los compuestos de las series homólogas y de la serie de los heterólogos sobre 20 cepas de *Staphylococcus aureus* se detallan en el Cuadro 3.12. Este cuadro permite comparar los principales parámetros de actividad de cada una de las quinolonas ensayadas.

Serie	Quinolona	Intervalo de CMI	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Moda	MG
Homólogos 4’N-alquil- ciprofloxacino	CIP	0,25 - 0,5	0,25	0,5	0,25	0,305
	Metil-CIP	0,06 - 0,12	0,06	0,12	0,06	0,071
	Etil-CIP	0,06 - 0,12	0,06	0,12	0,06	0,066
	Propil-CIP	0,12 - 0,25	0,12	0,25	0,12	0,138
	Butil-CIP	0,25 - 0,5	0,25	0,5	0,25	0,305
Homólogos 3’metil,4’N-alquil- ciprofloxacino	97-100	0,12 - 0,5	0,25	0,25	0,12	0,188
	97-101	0,06 - 0,25	0,12	0,12	0,12	0,105
	97-102	0,12 - 0,25	0,12	0,25	0,12	0,143
	97-103	0,12 - 0,5	0,12	0,25	0,12	0,176
	97-104	0,25 - 0,5	0,25	0,5	0,25	0,337
Heterólogos	GRX	0,03 - 0,12	0,06	0,12	0,06	0,073
	OFX	0,25 - 1	0,5	1	0,5	0,276
	FLQ	1 - 2	1	2	1	1,179

**MG:** Media geométrica; **CMI<sub>50</sub>:** Concentración que inhibe el 50% de las cepas; **CMI<sub>90</sub>:** Concentración que inhibe el 90% de las cepas.

**Cuadro 3.12.** Parámetros de la actividad antimicrobiana ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las sustancias estudiadas en *Staphylococcus aureus* (n=20).

Todos los elementos de ambas series presentan parámetros similares o inferiores a los del ciprofloxacino. Si se considera la media geométrica, todos los compuestos, a excepción de los derivados butílicos que tienen el mismo resultado, muestran un valor inferior al del patrón. En concreto para 4’N-metil, 4’N-etil y 4’N-propilciprofloxacino es 4,31, 4,60 y 2,21 veces menor a la del ciprofloxacino, respectivamente. De la serie homóloga 3’metil,4’N-alquilciprofloxacino: 97-100, 97-101, 97-102 y 97-103, muestran una media geométrica 1,62, 2,89, 2,13 y 1,73 veces inferior al patrón, respectivamente.

El Cuadro 3.13 muestra la concordancia de las CMI’s para las 20 cepas estudiadas de *S. aureus*. Todos los homólogos presentan valores de CMI iguales o inferiores a los del ciprofloxacino y sólo el derivado 97-104 tiene tres cepas a una dilución  $\log_2$  mayor al patrón. Conviene señalar que la mayoría de cepas presentan CMI’s 1, 2 ó 3 diluciones  $\log_2$  inferiores a las del ciprofloxacino, a excepción de los dos derivados butílicos cuyas CMI’s coinciden. Respecto a los heterólogos, el grepafloxacino tiene una actividad superior a la del ciprofloxacino pues la mayoría de CMI’s se sitúan entre una y tres diluciones  $\log_2$  inferiores. La actividad del ofloxacino es ligeramente superior y el flumequino es la quinolona menos activa pues presenta la mayoría de CMI’s dos diluciones superiores a las del ciprofloxacino.

En la Figura 3.9 se representa gráficamente la distribución de las CMI’s de las quinolonas en las 20 cepas de *S. aureus* estudiadas. Todos los homólogos presentan una distribución desplazada a la izquierda de la del patrón, a excepción de los dos compuestos butílicos, cuya distribución es igual. Respecto a los heterólogos, se observa que el grepafloxacino tiene una distribución a valores inferiores al patrón, la del ofloxacino es similar y la del flumequino, se encuentra desplazada a la derecha.

En la Figura 3.10, se representa los porcentajes acumulados de la CMI de cada uno de los compuestos en las 20 cepas ensayadas de *S. aureus*. Los compuestos más activos son el grepafloxacino y el esparfloxacino, seguido del 4’N-metilciprofloxacino que es el homólogo más activo. 4’N-etil, 4’N-propilciprofloxacino, y los derivados 3’metil,4’N-alquilciprofloxacino también son ligeramente más activos que el patrón, mientras que el ofloxacino y los derivados butílicos muestran la misma actividad. El flumequino es el único compuesto con menor actividad que el ciprofloxacino.

Serie	Quinolona	Número de cepas					
		-3 log <sub>2</sub>	-2 log <sub>2</sub>	-1 log <sub>2</sub>	mismo resultado	+1 log <sub>2</sub>	+2 log <sub>2</sub>
Homólogos 4’N-alquil- ciprofloxacino	Metil-CIP	1	19				
	Etil-CIP	3	17				
	Propil-CIP		2	18			
	Butil-CIP				20		
Homólogos 3’metil, 4’N-alquil- ciprofloxacino	97-100			13	7		
	97-101		10	10			
	97-102		2	17	1		
	97-103			16	4		
	97-104			1	16	3	
Heterólogos	GRX	2	16	2			
	OFX			3	17		
	FLQ					2	17

**Cuadro 3.13.** Concordancia de las CMIs de las quinolonas estudiadas con la CMI del ciprofloxacino en *Staphylococcus aureus* (n=20).

Resultados 158

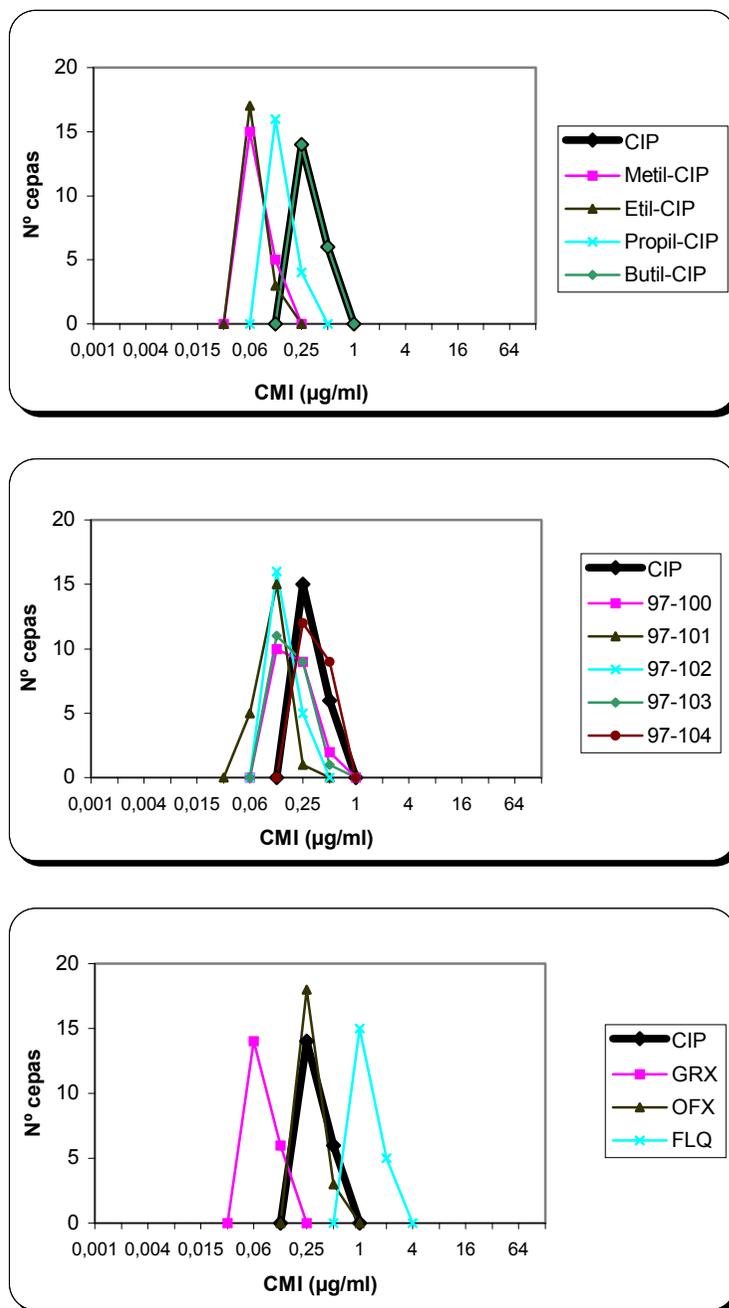


Figura 3.9. Distribución de la CMI de los compuestos estudiados en 20 cepas de *Staphylococcus aureus*.

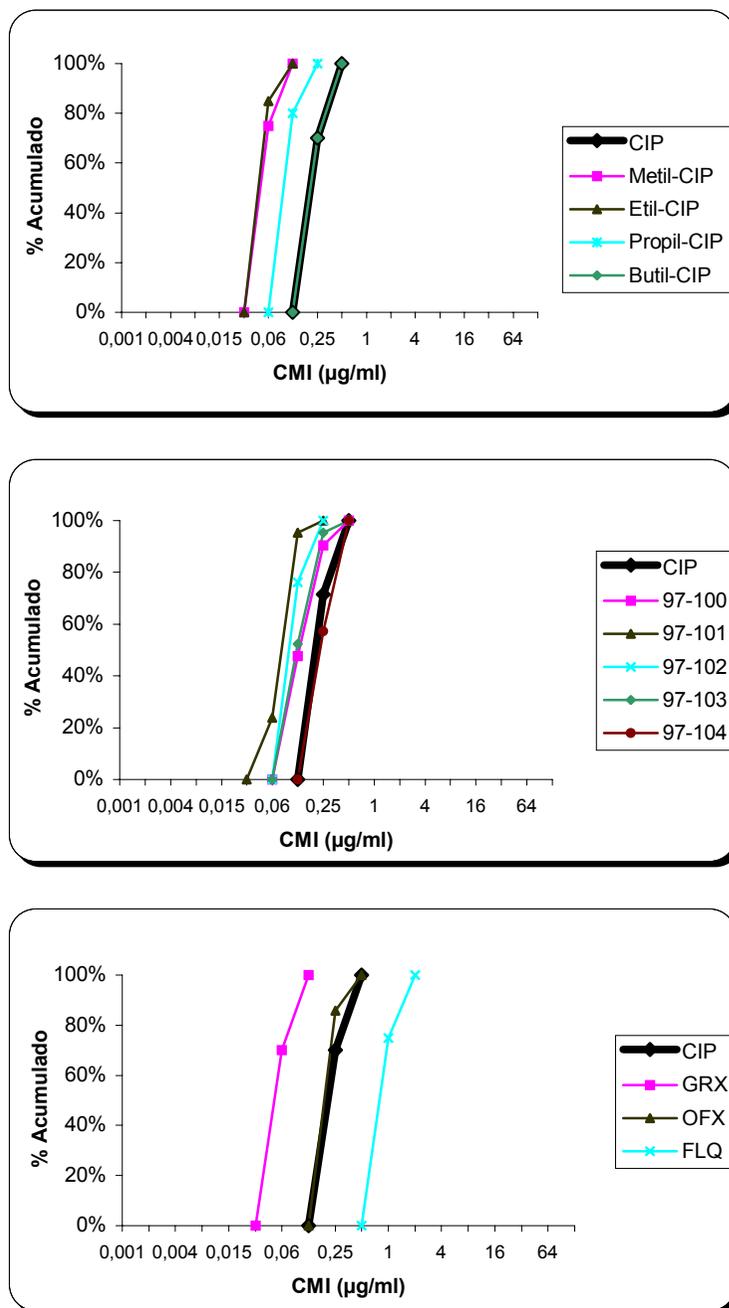


Figura 3.10. Porcentaje acumulado de la CMI para las quinolonas estudiadas en 20 cepas de *Staphylococcus aureus*.

**Resultados 160**

3.1.3.2. *Staphylococcus coagulasa* negativos

Los resultados obtenidos con el ciprofloxacino, sus homólogos y los heterólogos seleccionados sobre 20 cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativos se resumen en el Cuadro 3.14. Se detallan también los principales parámetros de actividad de cada una de las quinolonas ensayadas.

Serie	Quinolona	Intervalo de CMI	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Moda	MG
Homólogos 4’N-alkil- ciprofloxacino	CIP	0,12 - 0,25	0,12	0,25	0,12	0,155
	Metil-CIP	0,06 - 0,12	0,12	0,12	0,12	0,108
	Etil-CIP	0,06 - 0,12	0,06	0,12	0,06	0,077
	Propil-CIP	0,12 - 0,25	0,12	0,25	0,12	0,134
	Butil-CIP	0,25 - 0,5	0,25	0,5	0,25	0,277
Homólogos 3’metil,4’N-alkil- ciprofloxacino	97-100	0,06 - 0,12	0,12	0,12	0,12	0,112
	97-101	0,06 - 0,12	0,12	0,12	0,12	0,098
	97-102	0,12 - 0,25	0,12	0,25	0,12	0,144
	97-103	0,12 - 0,5	0,25	0,5	0,25	0,258
	97-104	0,25 - 1	0,5	1	0,5	0,518
Heterólogos	GRX	0,03 - 0,12	0,03	0,12	0,03	0,046
	OFX	0,25 - 0,5	0,25	0,25	0,25	0,268
	FLQ	4 - 8	4	8	4	4,438
	SAR	0,12 - 0,25	0,12	0,25	0,12	0,139
	SPA	0,06 - 0,25	0,06	0,12	0,06	0,074

**MG:** Media geométrica; **CMI<sub>50</sub>:** Concentración que inhibe el 50% de las cepas; **CMI<sub>90</sub>:** Concentración que inhibe el 90% de las cepas.

**Cuadro 3.14.** *Parámetros de la actividad antimicrobiana (µg/ml) de las sustancias estudiadas en los Staphylococcus coagulasa negativos (n=20).*

Los homólogos presentan parámetros similares o inferiores a los del ciprofloxacino. En cuanto a la media geométrica, todos los derivados (a excepción de 4'-N-butilciprofloxacino, 97-103 y 97-104) muestran un valor inferior al del patrón. Destacan 4'-N-etilciprofloxacino y 97-101 con medias geométricas 2,03 y 1,59 veces inferiores, respectivamente.

En el Cuadro 3.15 se observa la concordancia de las CMI's entre los compuestos ensayados para las 20 cepas de SCN. Se comprueba que todos los homólogos presentan valores de CMI iguales o inferiores a los del patrón, a excepción de los derivados más lipófilos (4'-N-butilciprofloxacino, 97-103 y 97-104) en los que la mayoría de las CMI's son iguales o una o dos diluciones  $\log_2$  superiores a las del ciprofloxacino. Respecto a los heterólogos, para el grepafloxacino y el esparfloxacino, la mayoría de CMI's se sitúan entre una y tres diluciones  $\log_2$  inferiores. El ofloxacino y el sarafloxacino prácticamente tienen la misma actividad que el patrón y flumequino es la quinolona menos activa, con CMI's cuatro y cinco diluciones  $\log_2$  superiores al ciprofloxacino.

En la Figura 3.11 se representa la distribución de las CMI's de las quinolonas en las 20 cepas de SCN. El 4'-N-etilciprofloxacino es el homólogo con una distribución más desplazada a la izquierda. El resto muestran una distribución muy cercana a la del ciprofloxacino, a excepción de los compuestos más lipófilos que se sitúan a la derecha del patrón. Respecto a los heterólogos, el grepafloxacino y el esparfloxacino presentan una distribución inferior a la del patrón, mientras que las del ofloxacino y sarafloxacino son similares y la del flumequino desplazada muy a la derecha del ciprofloxacino.

En la Figura 3.12 se representa los porcentajes acumulados de la CMI de cada uno de los compuestos en las 20 cepas ensayadas de SCN. Los

**Resultados 162**

compuestos más activos son los heterólogos grepafloxacino y esparfloxacino, seguidos de 4’N etilciprofloxacino y 97-101 que son los derivados homólogos más activos. Los compuestos 4’N-metilciprofloxacino, 97-100, 4’N-propilciprofloxacino, sarafloxacino y 97-102 son también ligeramente más activos que ciprofloxacino. El ofloxacino, 4’N-butilciprofloxacino, 97-103 y 97-104 tienen menor actividad que el patrón. Flumequino es, con diferencia, el compuesto con menor actividad de los estudiados.

Serie	Quinolona	Número de cepas								
		-3 log <sub>2</sub>	-2 log <sub>2</sub>	-1 log <sub>2</sub>	mismo resultado	+1 log <sub>2</sub>	+2 log <sub>2</sub>	+3 log <sub>2</sub>	+4 log <sub>2</sub>	+5 log <sub>2</sub>
	Metil-CIP			10	10					
Homólogos 4’N-alkil- ciprofloxacino	Etil-CIP	3	14		3					
	Propil-CIP		4		16					
	Butil-CIP				4	16				
	97-100			9	11					
Homólogos 3’metil, 4’N-alkil- ciprofloxacino	97-101	2	9		9					
	97-102		4		14	2				
	97-103				6	14				
	97-104					6	14			
Heterólogos	GRX	4	9	5	2					
	OFX				5	15				
	FLQ							4	16	
	SAR			4	15	1				
	SPA		4	13	3					

**Cuadro 3.15.** Concordancia de las CMI de las quinolonas estudiadas con la CMI del ciprofloxacino en los *Staphylococcus coagulasa* negativos (n=20).

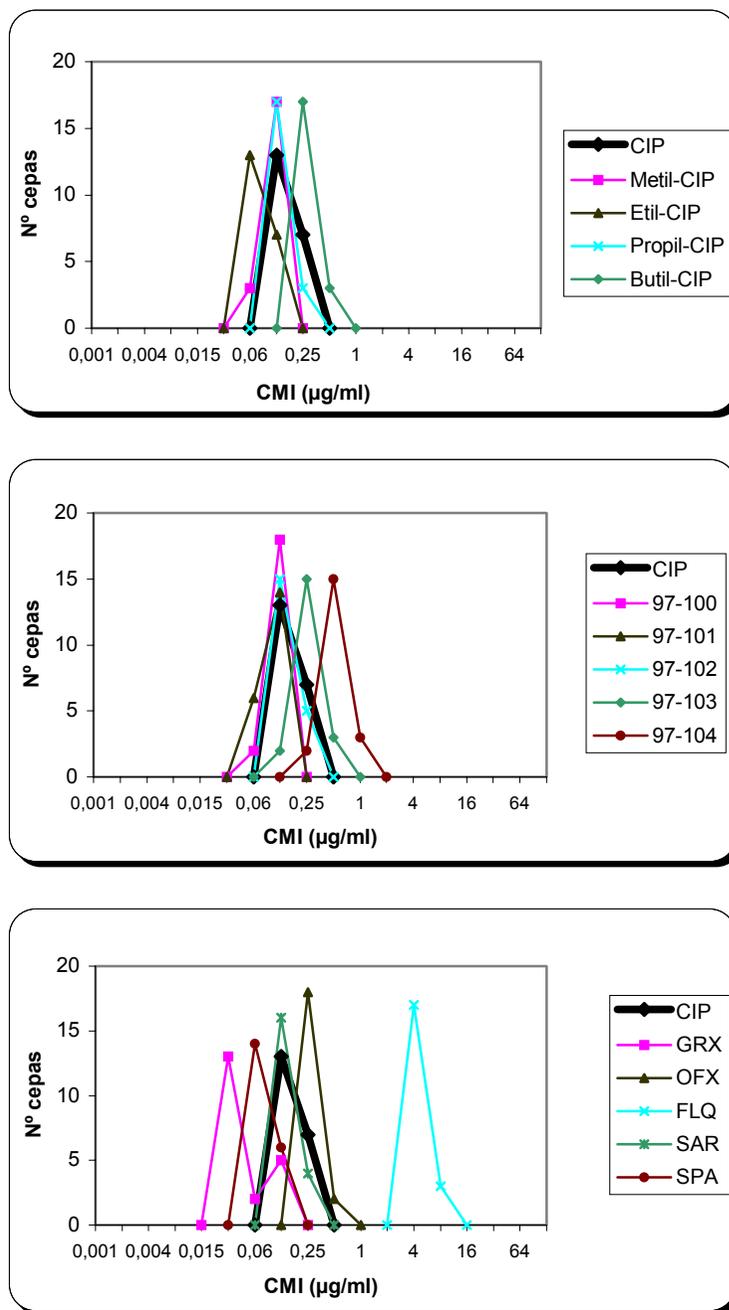


Figura 3.11. Distribución de la CMI de los compuestos estudiados en 20 cepas de *Staphylococcus coagulans* negativos.

Resultados 164

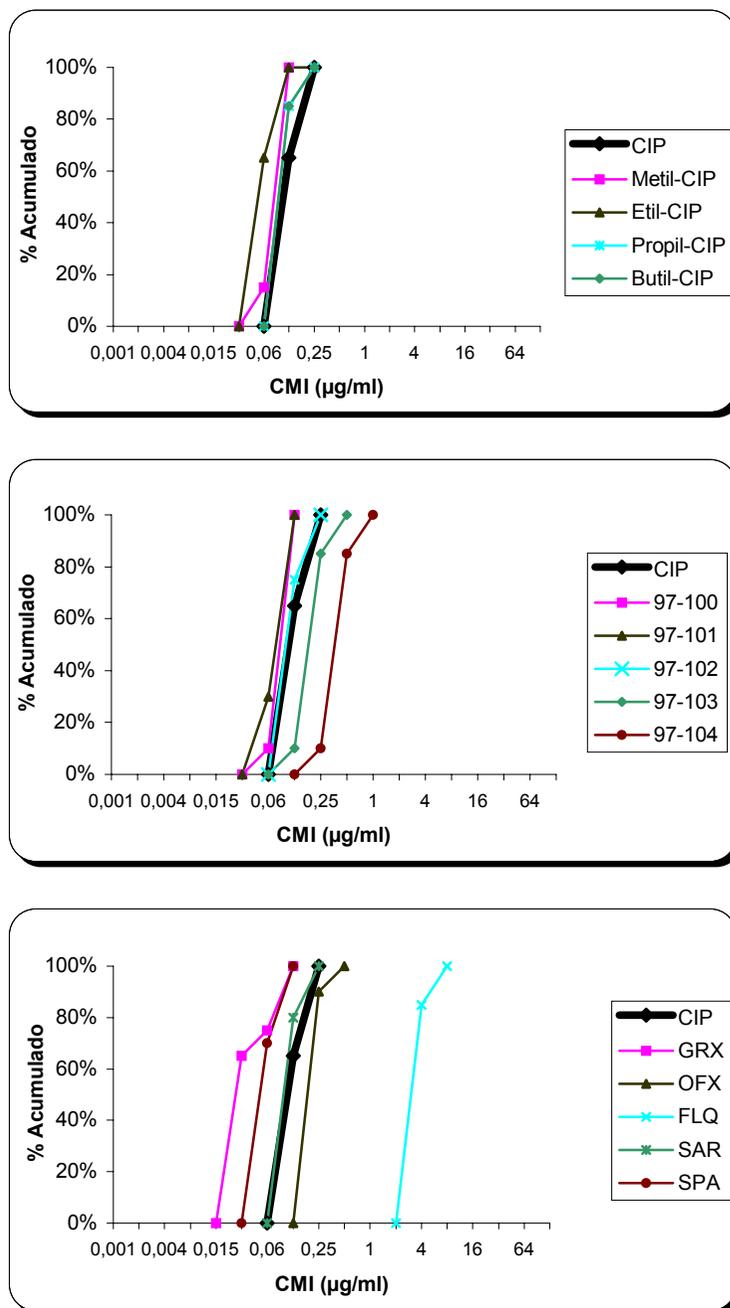


Figura 3.12. Porcentaje acumulado de la CMI para las quinolonas estudiadas en 20 cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativos.

3.1.3.3. *Enterococcus faecalis*

Los resultados del ciprofloxacino, de los compuestos pertenecientes a las dos series homólogas y a la serie de los heterólogos sobre 20 cepas de *Enterococcus faecalis* se presentan en el Cuadro 3.16, para facilitar la comparación de los principales parámetros de actividad de las sustancias ensayadas.

Serie	Quinolona	Intervalo de CMI	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Moda	MG
Homólogos 4'N-alkil- ciprofloxacino	CIP	0,25 - 1	0,5	1	0,5	0,637
	Metil-CIP	0,25 - 1	0,5	1	1	0,660
	Etil-CIP	0,25 - 1	0,5	1	1	0,683
	Propil-CIP	0,5 - 2	1	2	1	1,110
	Butil-CIP	1 - 4	2	4	2	2,144
Homólogos 3'metil,4'N-alkil- ciprofloxacino	97-100	0,12 - 1	0,5	1	1	0,637
	97-101	0,25 - 1	1	1	1	0,758
	97-102	0,25 - 2	1	2	1	1,035
	97-103	0,5 - 2	1	2	2	1,366
	97-104	1 - 4	2	4	4	2,732
Heterólogos	GRX	0,06 - 0,5	0,25	0,5	0,25	0,248
	OFX	1 - 2	2	2	2	1,625
	FLQ	0,5 - 2	4	8	4	4,438
	SAR	0,12 - 1	2	2	2	1,464
	SPA	0,06 - 0,25	0,5	0,5	0,5	0,377

**MG:** Media geométrica; **CMI<sub>50</sub>:** Concentración que inhibe el 50% de las cepas; **CMI<sub>90</sub>:** Concentración que inhibe el 90% de las cepas.

**Cuadro 3.16.** Parámetros de la actividad antimicrobiana ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las sustancias estudiadas en *Enterococcus faecalis* ( $n=20$ ).

Los dos primeros elementos de cada serie homóloga presentan parámetros similares a los del ciprofloxacino y el resto de elementos homólogos muestran peor actividad.

En el cuadro 3.17 se presentan los valores de concordancia para facilitar el análisis de la actividad cepa a cepa de los compuestos ensayados en *E. faecalis*. Todos los compuestos de ambas series homólogas a excepción de los más lipófilos (4'-N-butilciprofloxacino, 97-103 y 97-104) presentan la misma CMI o bien una dilución  $\log_2$  superior o inferior a la del patrón. Respecto a los heterólogos, se observa que el grepafloxacino y el esparfloxacino presentan una actividad superior a la del ciprofloxacino. La quinolona más activa de entre las ensayadas es el grepafloxacino, en el que las CMIs para 13 y 7 cepas son una o dos diluciones inferiores a las del patrón, respectivamente. El ofloxacino y el sarafloxacino presentan la mayoría de las cepas a una o dos diluciones superiores a las del ciprofloxacino. El flumequino es el compuesto menos activo, con las CMIs entre dos y cuatro diluciones  $\log_2$  superiores a las del patrón.

En la Figura 3.13 se representa gráficamente la distribución de las CMIs de las quinolonas en las 20 cepas de *E. faecalis*. Los dos compuestos más hidrófilos de cada serie presentan una distribución similar a la del patrón. El resto muestra una distribución sesgada a la derecha del mismo. Respecto a los heterólogos, tanto el grepafloxacino como el esparfloxacino muestran una distribución algo desplazada a la izquierda de la del patrón. Los demás heterólogos se sitúan a la derecha del resto de compuestos.

En la Figura 3.14 se representan los porcentajes acumulados de la CMI de cada uno de los compuestos en las 20 cepas de *E. faecalis*. Se

comprueba, de nuevo, que los homólogos 4’N-metil, 4’N-etilciprofloxacino, 97-100 y 97-101 se asemejan al patrón. Los compuestos más lipófilos, con una distribución más sesgada a la derecha, confirman su menor actividad.

El grepafloxacino y el esparfloxacino son pues, los compuestos más activos de entre los estudiados para este microorganismo. Por otro lado, los homólogos 4’N-metilciprofloxacino, 4’N-etilciprofloxacino, 97-100 y 97-101 presentan una actividad similar al patrón. El resto son menos activos.

Serie	Quinolona	Número de cepas						
		-2 log <sub>2</sub>	-1 log <sub>2</sub>	mismo resultado	+1 log <sub>2</sub>	+2 log <sub>2</sub>	+3 log <sub>2</sub>	+4 log <sub>2</sub>
Homólogos 4’N-alquil- ciprofloxacino	Metil-CIP		1	17	2			
	Etil-CIP			18	2			
	Propil-CIP			4	16			
	Butil-CIP				5	15		
Homólogos 3’metil, 4’N-alquil- ciprofloxacino	97-100		1	18	1			
	97-101			15	5			
	97-102			6	14			
	97-103				18	2		
	97-104					18	2	
Heterólogos	GRX	7	13					
	OFX			1	11	8		
	FLQ					7	10	3
	SAR				16	4		
	SPA	1	13	6				

**Cuadro 3.17.** Concordancia de las CMI de las quinolonas estudiadas con la CMI del ciprofloxacino en *Enterococcus faecalis* (n=20).

Resultados 168

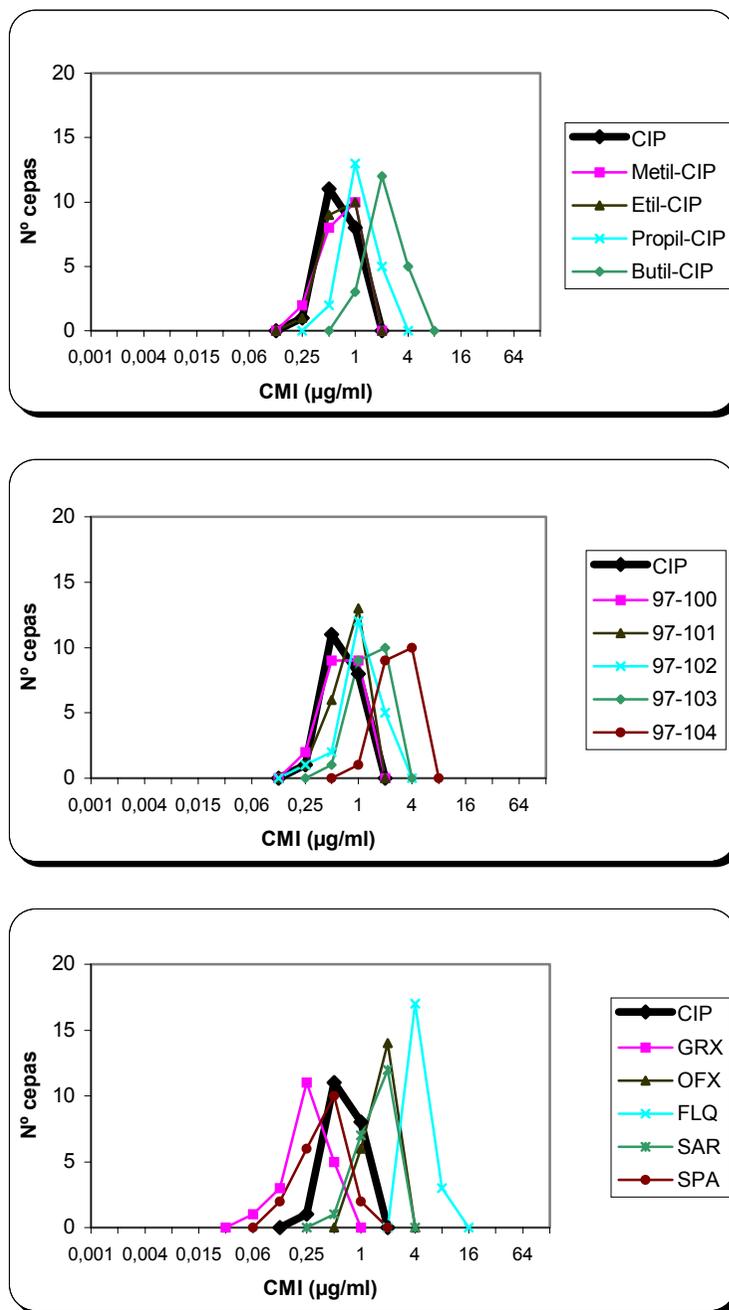


Figura 3.13. Distribución de la CMI de los compuestos estudiados en 20 cepas de *Enterococcus faecalis*.

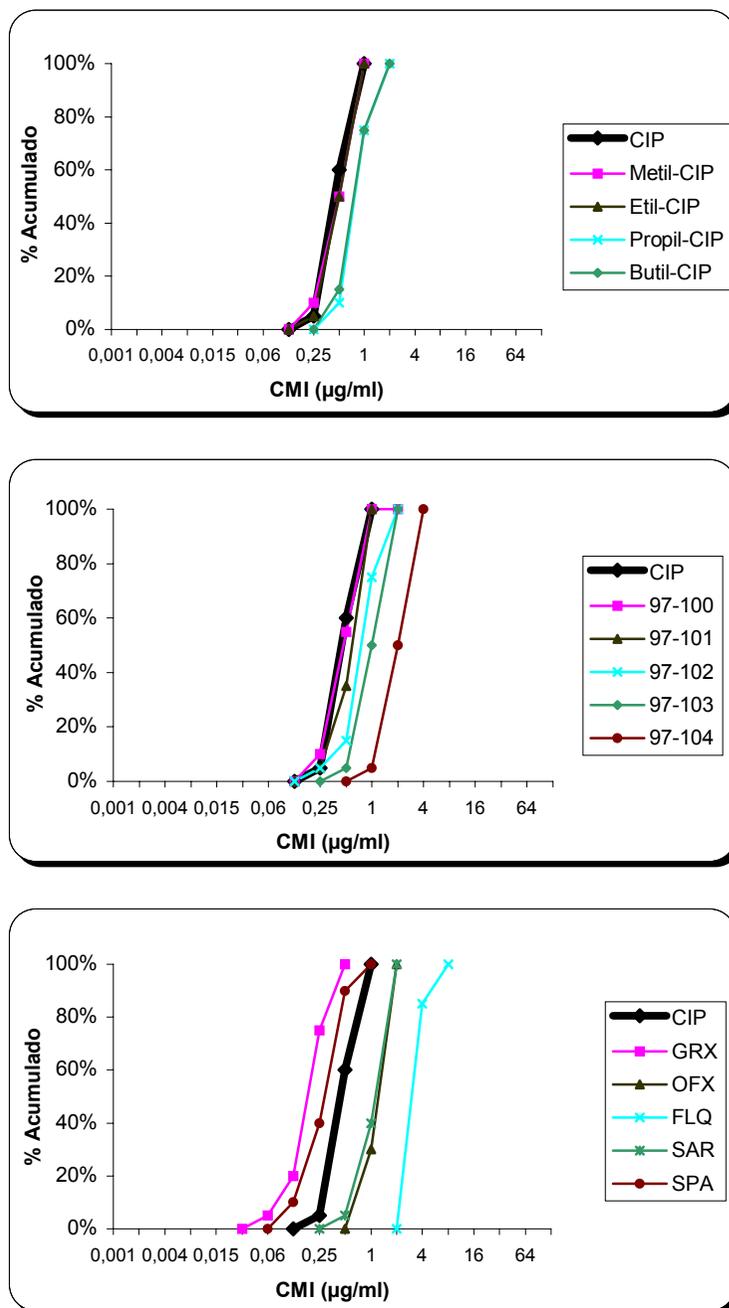


Figura 3.14. Porcentaje acumulado de la CMI para las quinolonas estudiadas en 20 cepas de *Enterococcus faecalis*.

**Resultados 170**

3.1.3.4. *Streptococcus pneumoniae*

En el Cuadro 3.18 se detallan los resultados del ciprofloxacino, de los homólogos y de los heterólogos estudiados sobre 22 cepas de *Streptococcus pneumoniae*. Se presentan asimismo los principales parámetros de actividad calculados.

Serie	Quinolona	Intervalo de CMI	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Moda	MG
Homólogos 4’N-alquil- ciprofloxacino	CIP	0,5 - 4	2	4	2	1,554
	Metil-CIP	0,12 - 4	1	4	0,25	0,801
	Etil-CIP	0,12 - 2	1	2	1	0,801
	Propil-CIP	0,25 - 4	1	4	1	1,287
	Butil-CIP	1 - 8	4	8	4	3,311
Homólogos 3’metil,4’N-alquil- ciprofloxacino	97-100	0,25 - 2	1	2	1	1,032
	97-101	0,25 - 2	1	2	1	0,882
	97-102	0,25 - 4	1	4	0,5	1,171
	97-103	0,25 - 4	2	4	2	1,460
	97-104	1 - 8	4	8	4	3,109
Heterólogos	GRX	0,03 - 1	0,25	1	0,5	0,210
	OFX	0,25 - 4	1	4	1	1,328
	FLQ	16 - >64	-	-	>64	>64
	SAR	0,25 - 8	1	8	1	1,587
	SPA	0,06 - 1	0,25	1	1	0,372

**MG:** Media geométrica; **CMI<sub>50</sub>:** Concentración que inhibe el 50% de las cepas; **CMI<sub>90</sub>:** Concentración que inhibe el 90% de las cepas.

**Cuadro 3.18.** Parámetros de la actividad antimicrobiana ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las sustancias estudiadas en *Streptococcus pneumoniae* ( $n=22$ ).

A excepción de 4'-N-butilciprofloxacino y 97-104, los homólogos presentan parámetros inferiores a los del ciprofloxacino. En concreto, la media geométrica de los derivados 4'-N-metil y 4'-N-etilciprofloxacino es 1,94 veces menor que la del patrón y 97-101, 1,76 veces inferior. El resto se aproximan más al ciprofloxacino. El grepafloxacino y el esparfloxacino, presentan una media geométrica 7,40 y 4,18 veces menor que la del fármaco de referencia.

El Cuadro 3.19 presenta la concordancia de las CMI's entre los compuestos homólogos, heterólogos y el ciprofloxacino para las 22 cepas estudiadas de *S. pneumoniae*. Los dos primeros compuestos de ambas series homólogas presentan valores de CMI iguales o inferiores a los del ciprofloxacino y la mayoría de CMI's están entre una y dos diluciones  $\log_2$  menores. Los derivados 4'-N-propilciprofloxacino y 97-102, también son ligeramente más activos que el patrón ya que sólo una cepa presenta un valor de CMI una dilución superior a éste. En los homólogos 97-103, 4'-N-butilciprofloxacino y 97-104 la mayoría de las CMI's son iguales o una o dos diluciones  $\log_2$  superiores a las del ciprofloxacino. El grepafloxacino y el esparfloxacino tienen una actividad superior a la del ciprofloxacino, puesto que la mayoría de CMI's se sitúan entre una y tres diluciones  $\log_2$  inferiores. El ofloxacino y el sarafloxacino poseen prácticamente la misma actividad que el patrón y el flumequino es la quinolona menos activa, con CMI's tan elevadas que no se considera en los cuadros y tablas posteriores.

En la Figura 3.15 se representa gráficamente la distribución de las CMI's de las sustancias ensayadas en las 22 cepas seleccionadas de *S. pneumoniae*. Se observa que todos los elementos homólogos, presentan una distribución desplazada a la izquierda del ciprofloxacino, a excepción de los

**Resultados 172**

derivados butílicos que se sitúan a la derecha del patrón. Respecto a los heterólogos, el grepafloxacino y el esparfloxacino presentan una distribución de CMI a valores inferiores a las del ciprofloxacino, mientras que el ofloxacino y el sarafloxacino muestran una distribución similar al mismo.

En la Figura 3.16 se representa los porcentajes acumulados de la CMI de cada uno de los compuestos en las 22 cepas ensayadas de *S. pneumoniae*.

Serie	Quinolona	Número de cepas					
		-4 log <sub>2</sub>	-3 log <sub>2</sub>	-2 log <sub>2</sub>	-1 log <sub>2</sub>	mismo resultado	+1 log <sub>2</sub> +2 log <sub>2</sub>
Homólogos 4’N-alquil- ciprofloxacino	Metil-CIP			9	4	8	1
	Etil-CIP			2	17	3	
	Propil-CIP				7	14	1
	Butil-CIP					1	18 3
Homólogos 3’metil, 4’N-alquil- ciprofloxacino	97-100				13	9	
	97-101			2	14	6	
	97-102				10	11	1
	97-103				5	14	3
	97-104					2	18 2
Heterólogos	GRX	5	9	8			
	OFX				6	15	1
	FLQ						
	SAR				6	3	3
	SPA		5	6	1		

**Cuadro 3.19.** Concordancia de las CMI de las quinolonas estudiadas con la CMI del ciprofloxacino en *Streptococcus pneumoniae* (n=22).

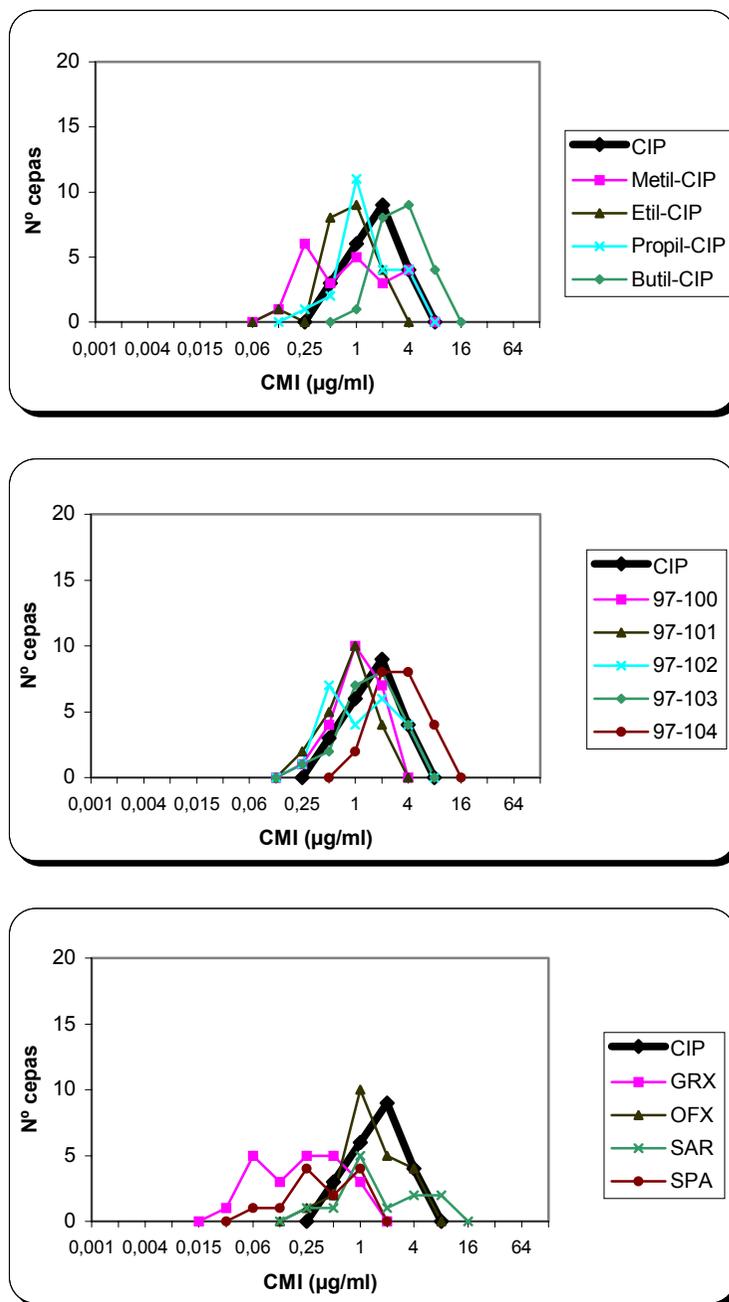


Figura 3.15. Distribución de la CMI de los compuestos estudiados en 22 cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

Resultados 174

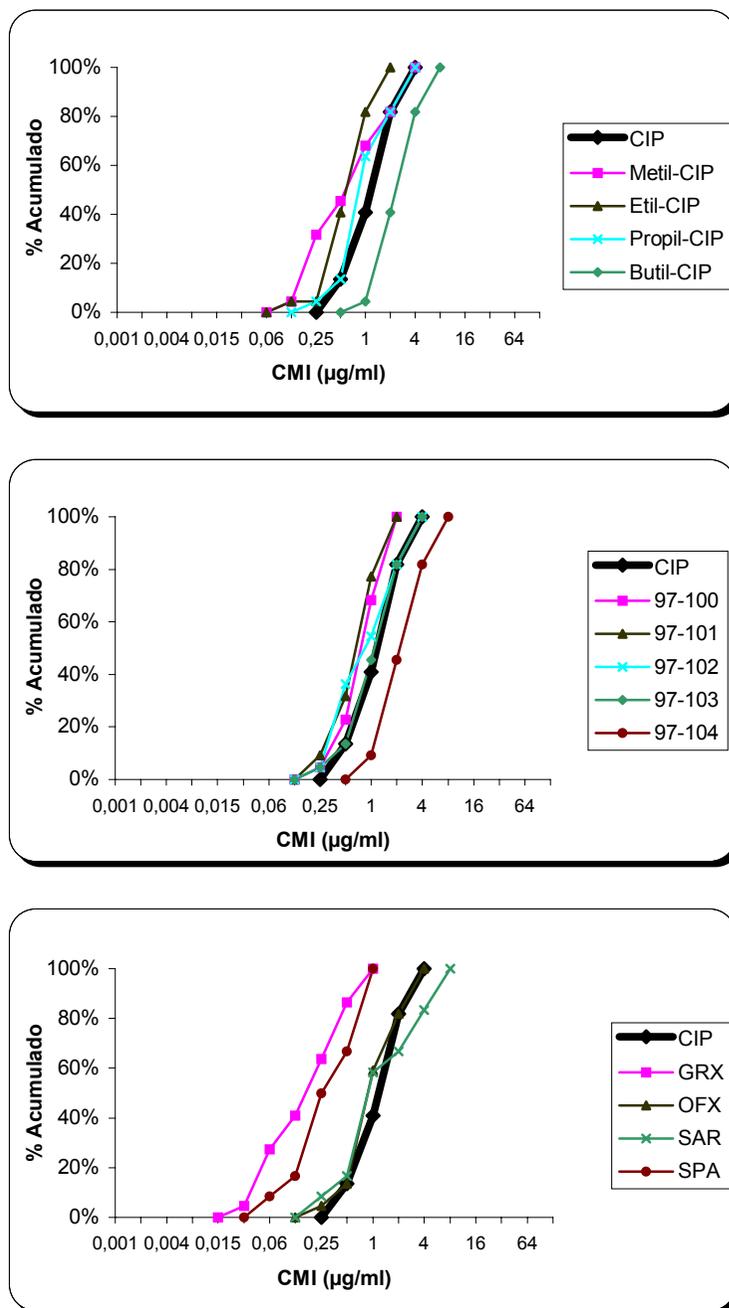


Figura 3.16. Porcentaje acumulado de la CMI para las quinolonas estudiadas en 22 cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

Globalmente considerados, estos resultados señalan al grepafloxacino y al esparfloxacino como los compuestos de mayor actividad, seguidos de 4’N-metilciprofloxacino, 4’N-etilciprofloxacino y 97-101. Los compuestos 97-100, 97-102, 4’N-propilciprofloxacino, ofloxacino y 97-103 son también ligeramente más activos que ciprofloxacino. Por el contrario, sarafloxacino, 97-104 y 4’N-butilciprofloxacino tienen menor actividad y el flumequino es, con diferencia, el compuesto menos activo.

## **3.2. CURVAS DE LETALIDAD EN *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

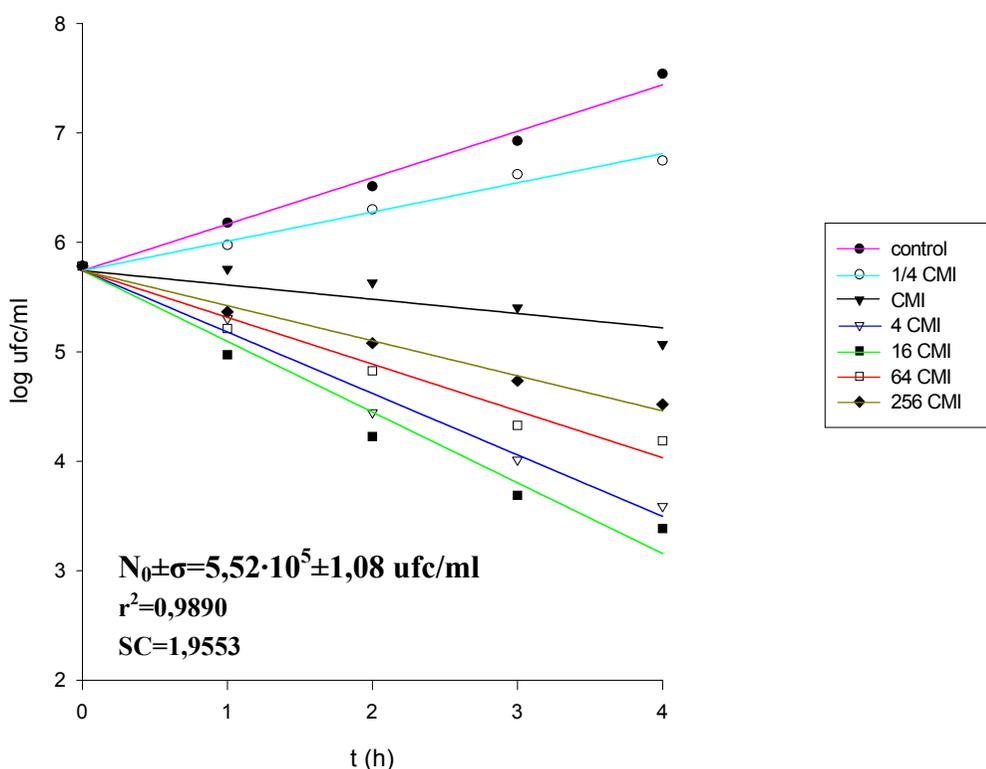
### **3.2.1. Ciprofloxacino**

Los valores de letalidad se han ajustado a los dos modelos cinéticos posibles: mono y biexponencial. Sin embargo, sólo se muestran los resultados correspondientes al primero en aras a la brevedad ya que, desde el punto de vista estadístico (AIC, prueba F Snedecor) es mucho más adecuado. En la Figura 3.17 se muestran las curvas de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de distintas concentraciones de ciprofloxacino. En la parte inferior se muestran los parámetros del ajustado conjunto de los datos acompañados de su error estándar, así como los criterios de bondad del ajuste (coeficiente de correlación y suma de cuadrados).

Se ha procedido a un ajuste lineal entre los logaritmos naturales y el tiempo, porque, de este modo, se estima directamente la constante de letalidad como la pendiente y su precisión como su error estándar. Ello

## Resultados 176

conlleva la transformación de la variable dependiente lo cual favorece el ajuste desde el punto de vista matemático al reducir el ámbito de valores. Asimismo, se consigue transformarla en una variable de distribución normal. Se debe considerar, no obstante, que supone una ponderación de los datos equivalente a  $1/y^2$ .

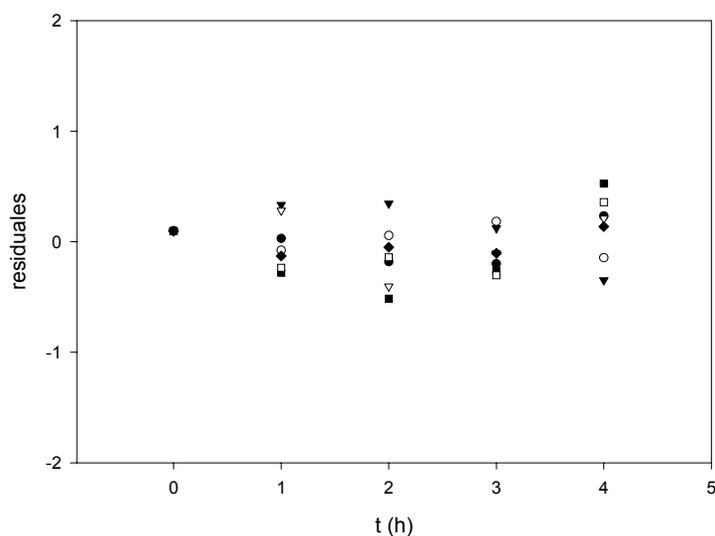


**Figura 3.17.** Representación gráfica y parámetros del ajustado conjunto de las curvas de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de ciprofloxacino.

A  $1/4$  CMI no se observa letalidad, la cinética de crecimiento es paralela al control. A partir de la CMI, la letalidad aumenta con la concentración y el tiempo de incubación. La curva correspondiente a la CMI

parece presentar un periodo de latencia antes de iniciar la acción bactericida, pero éste no puede demostrarse desde el punto de vista matemático.

En la Figura 3.18 se representan los valores residuales obtenidos tras el ajustado del modelo en función de la variable independiente (tiempo de estudio). Se observa que su distribución es aleatoria y la dispersión pequeña. La precisión de los parámetros es inferior al 10% (oscila en torno a un 3,74-9,05%), excepto para la CMI en la que es 18,5%. El coeficiente de determinación  $r^2$  es altamente significativo. Todas las consideraciones, pues, apoyan la bondad del ajustado.



**Figura 3.18.** Representación gráfica de los valores residuales obtenidos tras el ajustado del modelo de ciprofloxacino en *S. aureus* ATCC 25923 en función del tiempo de estudio.

En el Cuadro 3.20 se muestran las pendientes de las curvas de letalidad obtenidas para cada concentración de ciprofloxacino, así como los

## Resultados 178

parámetros más utilizados derivados de la misma. En concreto: el tiempo que tarda la población en reducirse a la mitad o duplicarse, si la cinética es de crecimiento,  $T_{1/2}$ ; el tiempo necesario para reducir o aumentar la población viable en un 90%,  $T_{90}$ ; y el tiempo en que se produce una reducción o aumento de tres logaritmos,  $T_{99,9}$ .

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	$k$ ( $\text{h}^{-1}$ ) $\pm\sigma$	$T_{1/2}$ (h)	$T_{90}$ (h)	$T_{99,9}$ (h)
CT*	0,977 $\pm$ 0,056	0,710	2,357	7,071
¼ CMI	0,616 $\pm$ 0,056	1,126	3,741	11,223
CMI	-0,301 $\pm$ 0,056	2,303	7,650	22,949
4 CMI	-1,293 $\pm$ 0,056	0,536	1,782	5,345
16 CMI	-1,488 $\pm$ 0,056	0,466	1,547	4,642
64 CMI	-0,984 $\pm$ 0,056	0,704	2,340	7,019
256 CMI	-0,738 $\pm$ 0,056	0,940	3,121	9,363

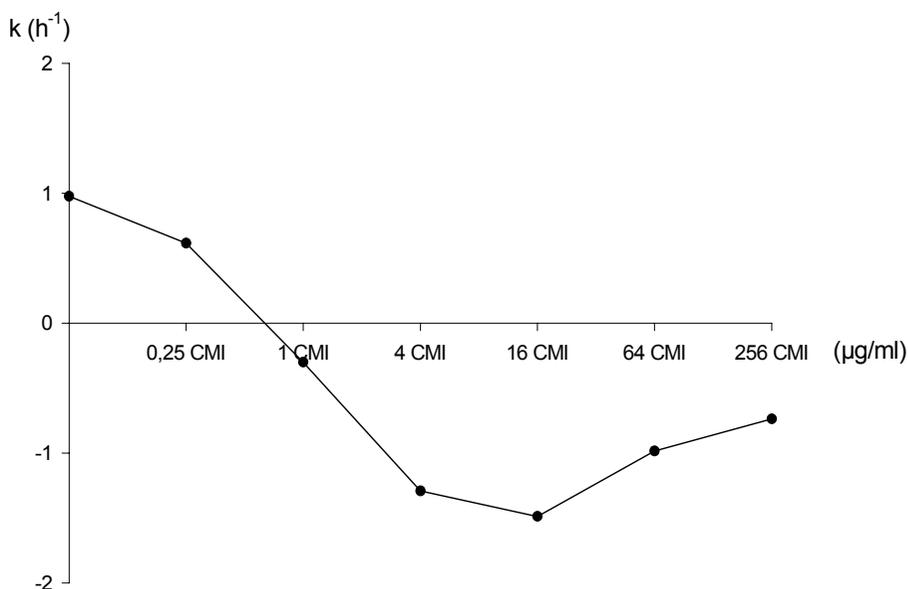
\*CT control de crecimiento

**Cuadro 3.20.** *Valores de la constante de letalidad y tiempo necesario para alcanzar el 50%, 90% y 99,9% de reducción de bacterias viables obtenidos para cada concentración de ciprofloxacino en S. aureus ATCC 25923.*

Resulta destacable que ninguna de las concentraciones ensayadas produce acción bactericida en el tiempo de estudio. A 16 CMI se alcanza la máxima velocidad de letalidad y cerca de las cuatro horas se obtiene un descenso de tres logaritmos en el número de bacterias viables. Esta concentración junto con 4 CMI son, por otro lado, las que alcanzan con

mayor velocidad el tiempo necesario para reducir la población en un 90% y muestran un valor de  $T_{1/2}$  menor, es decir, tienen una cinética de letalidad más rápida que el resto de concentraciones ensayadas.

Con el fin de determinar la relación existente entre la letalidad y la concentración de estudio, se ha realizado un análisis de varianza de las constantes de letalidad, seguido de una prueba de Scheffé ( $\alpha=0,05$ ) para establecer si existen diferencias significativas entre las constantes y el valor de concentración a partir del cual no hay un aumento de la letalidad. La representación gráfica de la relación citada y los resultados obtenidos mediante el análisis se muestran en la Figura 3.19 y en el Cuadro 3.21, respectivamente.



**Figura 3.19.** Representación de las constantes de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 en función de la concentración de ciprofloxacino.

**Resultados 180**

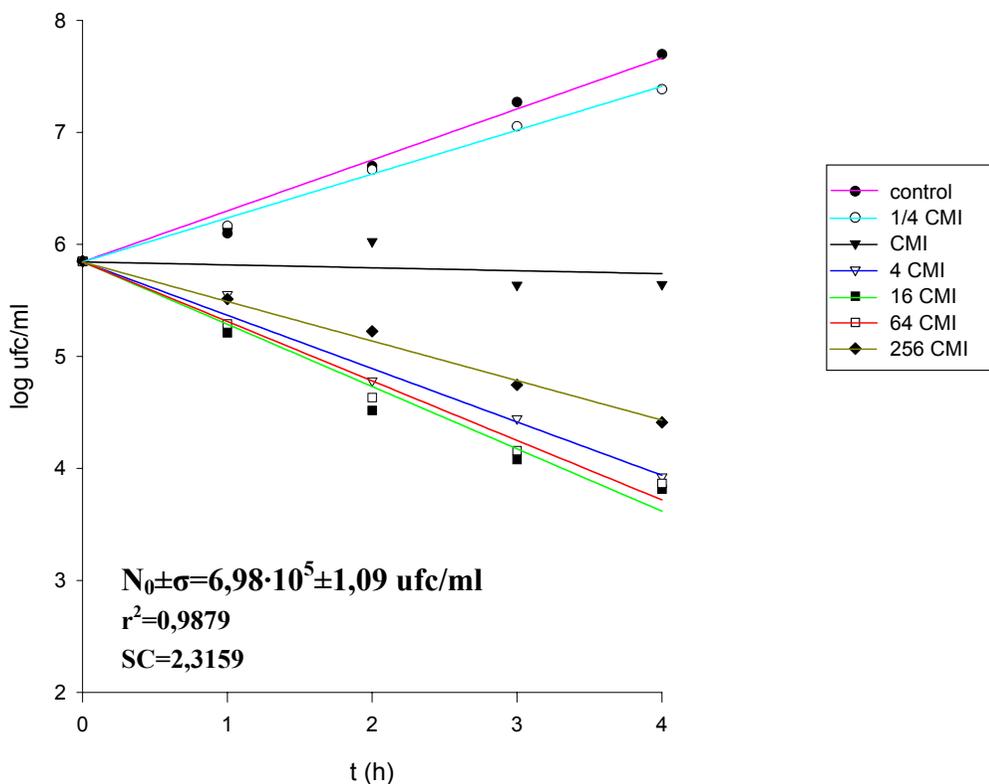
	256 CMI	64 CMI	16 CMI	4 CMI	CMI	¼ CMI
CT	S	S	S	S	S	<b>NS</b>
¼ CMI	S	S	S	S	S	
CMI	S	S	S	S		
4 CMI	S	S	<b>NS</b>			
16 CMI	S	S				
64 CMI	S					

**Cuadro 3.21.** Resultados de la prueba de Scheffé ( $\alpha=0,05$ ) de las constantes de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 frente a ciprofloxacino. **S:** significativo; **NS:** no significativo; **CT:** control de crecimiento.

### 3.2.2. 4’N-metilciprofloxacino

Siguiendo el mismo esquema de trabajo que para el ciprofloxacino se han obtenido los resultados de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de distintas concentraciones de 4’N-metilciprofloxacino. Se presentan gráficamente en la Figura 3.20. También en este caso, la cinética de muerte es claramente monoexponencial. Los parámetros estimados mediante ajustado lineal conjunto se detallan en su parte inferior, junto a los parámetros estadísticos que califican la bondad del ajuste.

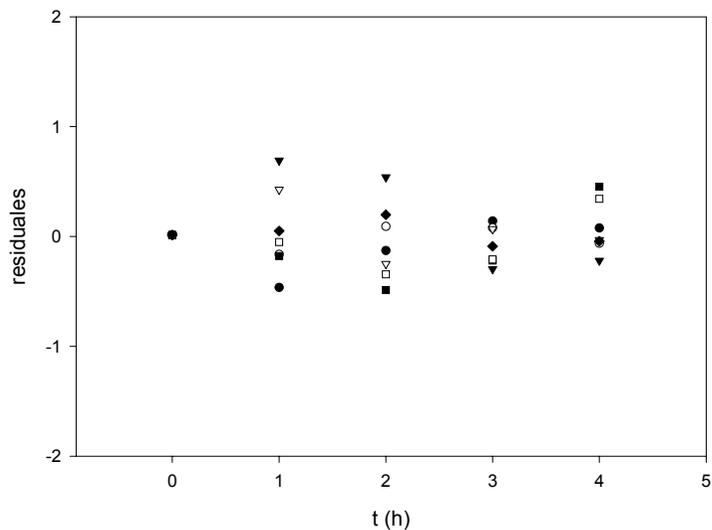
Tampoco en este caso ¼ CMI produce letalidad; la cinética de crecimiento es paralela al control y sus pendientes no son estadísticamente diferentes. A partir de la CMI la letalidad aumenta con la concentración y el tiempo de incubación.



**Figura 3.20.** Representación gráfica y parámetros del ajustado conjunto de las curvas de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de 4'-N-metilciprofloxacino.

En la Figura 3.21 se representan los residuales del ajustado del modelo en función del tiempo. Su distribución es aleatoria y su dispersión pequeña. La precisión de los parámetros oscila en torno a un 4,73-7,45%, aunque es igual a 100,66% para la CMI debido a que la letalidad es muy baja a esta concentración y la curva es prácticamente la horizontal. Además, el coeficiente de determinación  $r^2$  es altamente significativo, por lo que todas las consideraciones, pues, apoyan la bondad del ajustado.

## Resultados 182



**Figura 3.21.** Representación gráfica de los valores residuales obtenidos tras el ajustado del modelo de 4'-N-metilciprofloxacino en *S. aureus* ATCC 25923 en función del tiempo de estudio.

En el Cuadro 3.22 se detallan las pendientes de las curvas de letalidad obtenidas para cada concentración de 4'-N-metilciprofloxacino, así como los tiempos  $T_{1/2}$ ,  $T_{90}$  y  $T_{99,9}$ .

Como se puede observar, ninguna de las concentraciones ensayadas produce acción bactericida en el tiempo de estudio, puesto que todas necesitan más de cuatro horas para provocar una reducción del 99,9% de bacterias viables. Las concentraciones que alcanzan con mayor rapidez el tiempo necesario para reducir la población en un 90% y muestran un valor de  $T_{1/2}$  menor son 16 y 64 CMI, es decir, muestran una cinética de letalidad más rápida que el resto de concentraciones ensayadas.

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	$k$ ( $\text{h}^{-1}$ ) $\pm\sigma$	$T_{1/2}$ (h)	$T_{90}$ (h)	$T_{99,9}$ (h)
CT*	1,048 $\pm$ 0,061	0,662	2,197	6,592
¼ CMI	0,902 $\pm$ 0,061	0,768	2,552	7,656
CMI	-0,060 $\pm$ 0,061	11,514	38,249	114,747
4 CMI	-1,097 $\pm$ 0,061	0,632	2,100	6,299
16 CMI	-1,281 $\pm$ 0,061	0,541	1,797	5,392
64 CMI	-1,224 $\pm$ 0,061	0,567	1,882	5,646
256 CMI	-0,813 $\pm$ 0,061	0,852	2,831	8,494

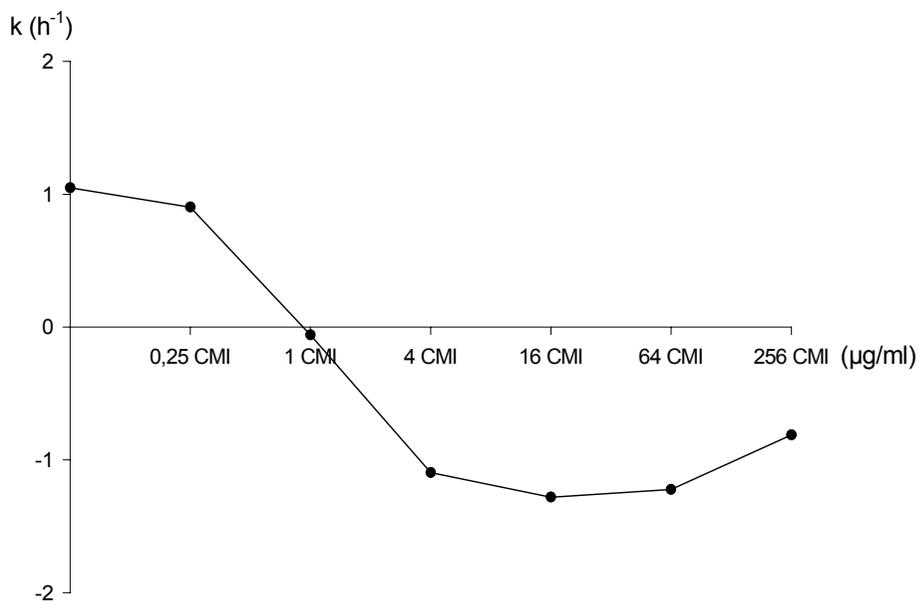
\*CT control de crecimiento

**Cuadro 3.22.** Valores de la constante de letalidad y tiempo necesario para alcanzar el 50%, 90% y 99,9% de reducción de bacterias viables obtenidos para cada concentración de 4'-N-metilciprofloxacino en *S. aureus* ATCC 25923.

El análisis de varianza de las constantes de letalidad y la prueba de Scheffé ( $\alpha=0,05$ ) se muestran en la Figura 3.22 y en el Cuadro 3.23, respectivamente.

Estos resultados demuestran desde un punto de vista estadístico que la concentración de ¼ CMI no modifica la cinética de crecimiento respecto al control. A partir de la CMI, la letalidad aumenta significativamente con la concentración hasta 4 CMI. Entre 4, 16 y 64 CMI no hay diferencias significativas y a partir de 64 CMI no sólo no aumenta la letalidad sino que, paradójicamente, disminuye, obteniéndose a 256 CMI incluso menor letalidad que a 4 CMI.

**Resultados 184**



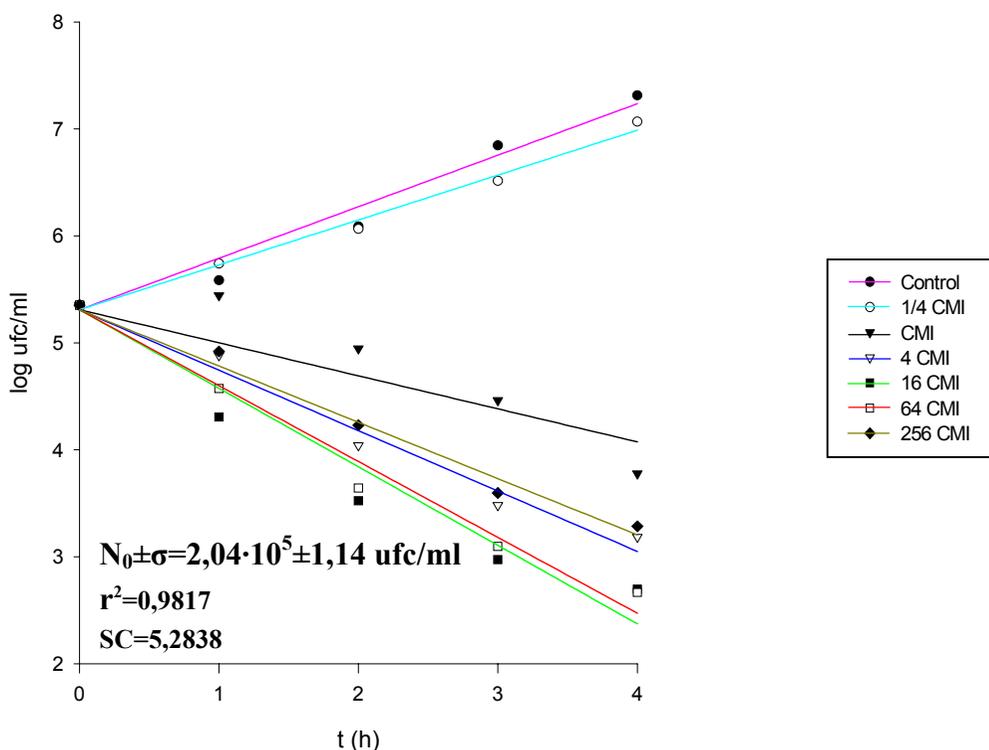
**Figura 3.22.** Representación de las constantes de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 en función de la concentración de 4'-N-metilciprofloxacino.

	256 CMI	64 CMI	16 CMI	4 CMI	CMI	¼ CMI
CT*	S	S	S	S	S	NS
¼ CMI	S	S	S	S	S	
CMI	S	S	S	S		
4 CMI	S	NS	NS			
16 CMI	S	NS				
64 CMI	S					

**Cuadro 3.23.** Resultados de la prueba de Scheffé ( $\alpha=0,05$ ) de las constantes de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 frente a 4'-N-metilciprofloxacino. **S:** significativo; **NS:** no significativo; **CT:** control de crecimiento.

### 3.2.3. 4’N-etilciprofloxacino

En la Figura 3.23 se muestran las curvas de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 frente a distintas concentraciones de 4’N-etilciprofloxacino. A tenor de los criterios estadísticos empleados los valores de letalidad obtenidos siguen una cinética monoexponencial. Los parámetros del ajustado conjunto llevado a cabo se detallan en la zona inferior de la figura, acompañados de sus desviaciones estándar y de los criterios de bondad del ajuste.

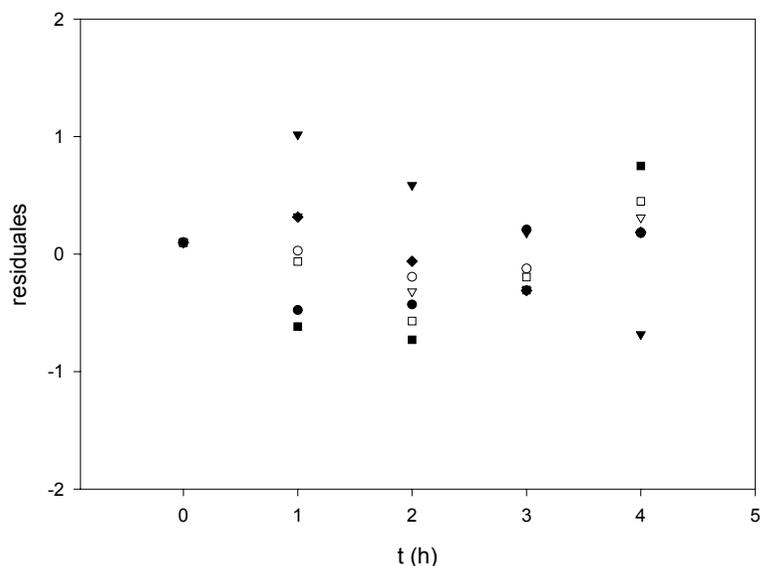


**Figura 3.23.** Representación gráfica y parámetros del ajustado conjunto de las curvas de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de 4’N-etilciprofloxacino.

## Resultados 186

Se observa que  $\frac{1}{4}$  CMI no produce letalidad y la cinética de crecimiento es paralela al control. Sólo a partir de la CMI la letalidad aumenta con la concentración y el tiempo de incubación. A la CMI se observa gráficamente un periodo de latencia antes de iniciar la acción bactericida, que no puede demostrarse desde el punto de vista matemático.

En la Figura 3.24 se representan los valores residuales del ajustado en función del tiempo, como criterio de calidad del ajuste. Dado que la distribución es aleatoria y la dispersión pequeña, ambos criterios afirman la bondad del ajustado que queda asimismo patente en el coeficiente  $r^2$  y en la precisión de los parámetros (entre 5,42 y 9,48%, aunque para la CMI es igual a 12,89%).



**Figura 3.24.** Representación gráfica de los valores residuales obtenidos tras el ajustado del modelo de 4'-N-etilciprofloxacino en *S. aureus* ATCC 25923 en función del tiempo de estudio.

En el Cuadro 3.24 se muestran las pendientes de las curvas de letalidad obtenidas para cada concentración de 4'-N-etilciprofloxacino, así como los tiempos  $T_{1/2}$ ,  $T_{90}$ , y  $T_{99,9}$ .

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	$k$ ( $\text{h}^{-1}$ ) $\pm\sigma$	$T_{1/2}$ (h)	$T_{90}$ (h)	$T_{99,9}$ (h)
CT*	1,109 $\pm$ 0,092	0,625	2,076	6,228
¼ CMI	0,966 $\pm$ 0,092	0,717	2,383	7,149
CMI	-0,711 $\pm$ 0,092	0,975	3,239	9,718
4 CMI	-1,301 $\pm$ 0,092	0,533	1,770	5,310
16 CMI	-1,690 $\pm$ 0,092	0,410	1,362	4,087
64 CMI	-1,633 $\pm$ 0,092	0,424	1,410	4,230
256 CMI	-1,212 $\pm$ 0,092	0,572	1,901	5,701

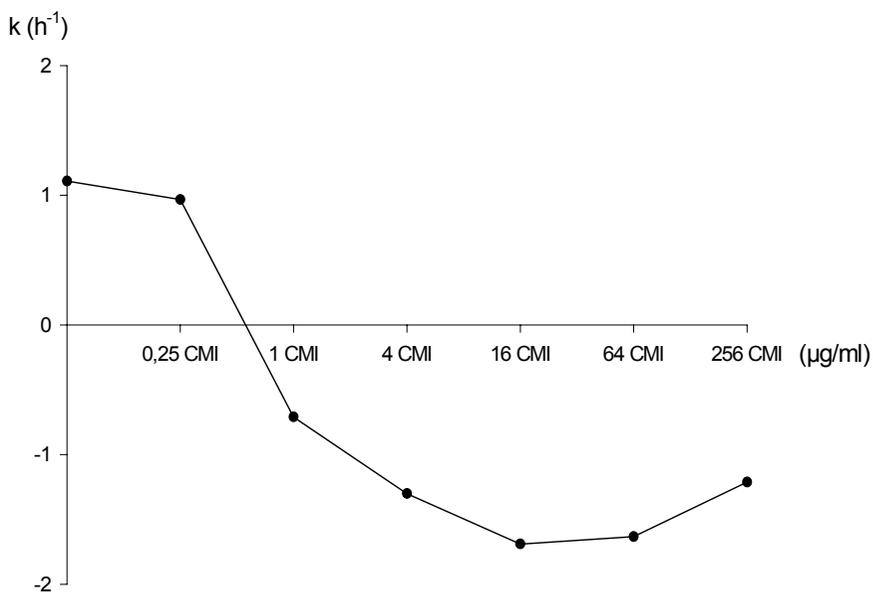
\*CT control de crecimiento

**Cuadro 3.24.** *Valores de la constante de letalidad y tiempo necesario para alcanzar el 50%, 90% y 99,9% de reducción de bacterias viables obtenidos para cada concentración de 4'-N-etilciprofloxacino en S. aureus ATCC 25923.*

Es de notar que la acción bactericida en el tiempo de estudio sólo se produce con las concentraciones 16 CMI y 64 CMI, que presentan la cinética de letalidad más rápida.

El análisis de varianza aplicado a las constantes de letalidad y la prueba de Scheffé ( $\alpha=0,05$ ) se muestran en la Figura 3.25 y en el Cuadro 3.25, respectivamente.

**Resultados 188**



**Figura 3.25.** Representación de las constantes de letalidad *S. aureus* ATCC 25923 en función de la concentración de 4'-N-etilciprofloxacino.

	256 CMI	64 CMI	16 CMI	4 CMI	CMI	¼ CMI
CT*	S	S	S	S	S	NS
¼ CMI	S	S	S	S	S	
CMI	S	S	S	S		
4 CMI	NS	S	S			
16 CMI	S	NS				
64 CMI	S					

**Cuadro 3.25.** Resultados de la prueba de Scheffé ( $\alpha=0,05$ ) de las constantes de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 frente a 4'-N-etilciprofloxacino. **S:** significativo; **NS:** no significativo; **CT:** control de crecimiento.

Se deduce, pues, que la concentración de  $\frac{1}{4}$  CMI no modifica la cinética de crecimiento respecto al control. La letalidad aumenta significativamente con la concentración hasta 16 CMI. Entre 16 y 64 CMI no hay diferencias significativas y a partir de 64 CMI paradójicamente disminuye, obteniéndose a 256 CMI la misma letalidad que a 4 CMI.

### 3.2.4. 3'-metil,4'-N-metilprofloxacino (97-101)

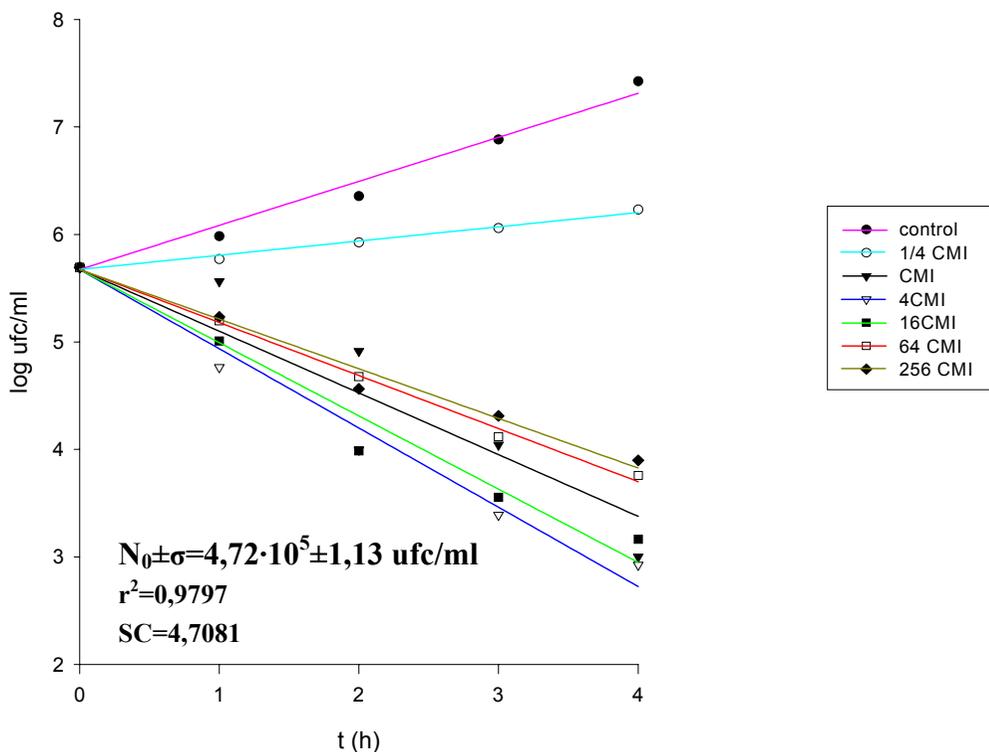
Las curvas de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 a distintas concentraciones de 97-101, se muestran en la Figura 3.26. El ajustado de los valores de letalidad obtenidos a una cinética de primer orden permite estimar los parámetros que se detallan. Se indican también el coeficiente de correlación y la suma de cuadrados como criterio de calidad.

Se puede comprobar que a  $\frac{1}{4}$  CMI la cinética de crecimiento prácticamente se mantiene bacteriostática. A partir de la CMI, la letalidad aumenta con la concentración y el tiempo de incubación. La curva correspondiente a la CMI parece presentar un periodo de latencia antes de iniciar la acción bactericida, pero éste no puede demostrarse desde el punto de vista matemático.

En la Figura 3.27 se representan los valores residuales obtenidos tras el ajustado del modelo en función del tiempo de estudio. Se observa que la distribución es aleatoria y la dispersión pequeña. La precisión de los parámetros oscila en torno a un 5,09-9,16%, aunque para  $\frac{1}{4}$  CMI es 28,36%, debido a que esta concentración ya presenta acción bactericida respecto al control de crecimiento pero la curva se sitúa cerca de la horizontal. Además

## Resultados 190

el coeficiente de correlación  $r^2$  es altamente significativo. Todas las consideraciones, pues apoyan asimismo la bondad del ajustado.



**Figura 3.26.** Representación gráfica y parámetros del ajustado conjunto de las curvas de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de 97-101.

En el Cuadro 3.26 se expresan las pendientes de las curvas de letalidad obtenidas para cada concentración de 97-101, así como los tiempos  $T_{1/2}$ ,  $T_{90}$  y  $T_{99,9}$ .

El 97-101 sólo presenta acción bactericida en el tiempo de estudio a 4 CMI, aunque 16 CMI provoca también una reducción del 99,9% próxima a

cuatro horas. Estas concentraciones son, por otro lado, las que muestran una cinética de letalidad más rápida que el resto de concentraciones ensayadas.

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	$k$ ( $\text{h}^{-1}$ ) $\pm\sigma$	$T_{1/2}$ (h)	$T_{90}$ (h)	$T_{99,9}$ (h)
CT*	0,943 $\pm$ 0,086	0,735	2,441	7,322
¼ CMI	0,305 $\pm$ 0,086	2,275	7,557	22,671
CMI	-1,322 $\pm$ 0,086	0,524	1,742	5,224
4 CMI	-1,698 $\pm$ 0,086	0,408	1,356	4,068
16 CMI	-1,569 $\pm$ 0,086	0,442	1,468	4,404
64 CMI	-1,136 $\pm$ 0,086	0,610	2,026	6,079
256 CMI	-1,067 $\pm$ 0,086	0,652	2,167	6,495

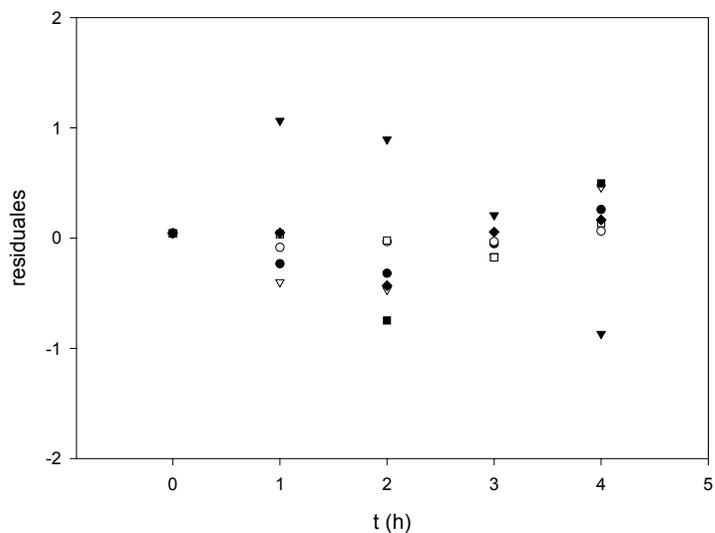
\*CT control de crecimiento

**Cuadro 3.26.** *Valores de la constante de letalidad y tiempo necesario para alcanzar el 50%, 90% y 99,9% de reducción de bacterias viables obtenidos para cada concentración de 97-101 en S. aureus ATCC 25923.*

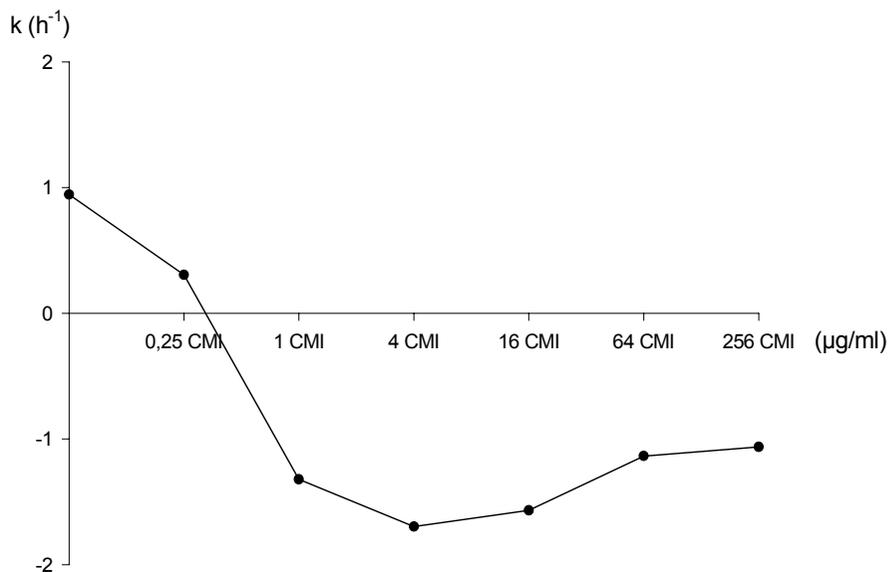
El análisis de varianza de las constantes de letalidad y la prueba de Scheffé ( $\alpha=0,05$ ) se muestran en la Figura 3.28 y en el Cuadro 3.27, respectivamente.

Se comprueba que el aumento de la letalidad es significativo hasta 4 CMI. Entre 4 y 16 CMI no hay diferencias significativas y a partir de 16 CMI la constante disminuye, de forma que a 64 CMI se obtiene la misma letalidad que a CMI y a 256 CMI es incluso menor.

## Resultados 192



**Figura 3.27.** Representación gráfica de los valores residuales obtenidos tras el ajustado del modelo de 97-101 en *S. aureus* ATCC 25923 en función del tiempo de estudio.



**Figura 3.28.** Representación de las constantes de letalidad de *S. aureus* ATCC 25923 en función de la concentración de 97-101.

	256 CMI	64 CMI	16 CMI	4 CMI	CMI	¼ CMI
CT*	S	S	S	S	S	S
¼ CMI	S	S	S	S	S	
CMI	S	NS	S	S		
4 CMI	S	S	NS			
16 CMI	S	S				
64 CMI	S					

**Cuadro 3.27.** Resultados de la prueba de Scheffé ( $\alpha=0,05$ ) de las constantes de letalidad de *S. aureus* ATCC 2592 frente a 97-101. **S:** significativo; **NS:** no significativo; **CT:** control de crecimiento.

### 3.2.5. Comparación entre las constantes de letalidad en función de la concentración de antibiótico ensayada

En el Cuadro 3.28 se muestran los valores de las constantes de letalidad, así como los resultados de la prueba de Scheffé ( $\alpha=0,05$ ) de dichas constantes, según la concentración ensayada, de las cuatro quinolonas de estudio en *S. aureus* ATCC 25923.

El control, dado que se prepara de igual forma en los distintos ensayos no presenta diferencias significativas entre las constantes. Esta consideración incide en la reproducibilidad de la técnica experimental ya que aunque las experiencias se han realizado en días distintos y con antibióticos diferentes, la cinética de crecimiento del microorganismo es la misma en todos los ensayos.

**Resultados 194**

					k (h <sup>-1</sup> )	
<b>Control</b>	97-101	Etil-CIP	Metil-CIP		CIP	0,977±0,056
CIP	NS	NS	NS		Metil- CIP	1,048±0,061
Metil- CIP	NS	NS			Etil- CIP	1,109±0,092
Etil- CIP	NS				97-101	0,943±0,086
<b>¼ CMI</b>	97-101	Etil-CIP	Metil-CIP		CIP	0,616±0,056
CIP	S	S	S		Metil- CIP	0,902±0,061
Metil-CIP	S	NS			Etil- CIP	0,966±0,092
Etil-CIP	S				97-101	0,305±0,086
<b>CMI</b>	97-101	Etil-CIP	Metil-CIP		CIP	-0,301±0,056
CIP	S	S	S		Metil- CIP	-0,060±0,061
Metil-CIP	S	S			Etil- CIP	-0,711±0,092
Etil-CIP	S				97-101	-1,322±0,086
<b>4 CMI</b>	97-101	Etil-CIP	Metil-CIP		CIP	-1,293±0,056
CIP	S	NS	S		Metil- CIP	-1,097±0,061
Metil-CIP	S	S			Etil- CIP	-1,301±0,092
Etil-CIP	S				97-101	-1,698±0,086
<b>16 CMI</b>	97-101	Etil-CIP	Metil-CIP		CIP	-1,488±0,056
CIP	NS	S	NS		Metil- CIP	-1,281±0,061
Metil-CIP	S	S			Etil- CIP	-1,690±0,092
Etil-CIP	NS				97-101	-1,569±0,086
<b>64 CMI</b>	97-101	Etil-CIP	Metil-CIP		CIP	-0,984±0,056
CIP	S	S	S		Metil- CIP	-1,224±0,061
Metil-CIP	NS	S			Etil- CIP	-1,633±0,092
Etil-CIP	S				97-101	-1,136±0,086
<b>256 CMI</b>	97-101	Etil-CIP	Metil-CIP		CIP	-0,738±0,056
CIP	S	S	NS		Metil- CIP	-0,813±0,061
Metil-CIP	S	S			Etil- CIP	-1,216±0,092
Etil-CIP	NS				97-101	-1,064±0,086

**Cuadro 3.28.** Valores de las constantes de letalidad y resultados de la prueba de Scheffé ( $\alpha=0,05$ ) de las mismas en función de la concentración para las cuatro quinolonas ensayadas en *S. aureus* ATCC 25923.

La concentración de  $\frac{1}{4}$  CMI produce distinta respuesta según la quinolona estudiada. En todos los casos la cinética es de crecimiento, si bien la de menor velocidad es 97-101, único compuesto que muestra letalidad a esta concentración con respecto al control, seguido de ciprofloxacino, 4'-N-metilciprofloxacino y 4'-N-etilciprofloxacino, para las que no se ponen de manifiesto diferencias.

Las constantes de los cuatro compuestos son estadísticamente distintas a la CMI. La quinolona con menor constante de letalidad a esta concentración es 4'-N-metilciprofloxacino, y en orden creciente seguido de ciprofloxacino, 4'-N-etilciprofloxacino y 97-101.

En presencia de 4 CMI existen diferencias significativas entre las constantes de los cuatro antibióticos estudiados, a excepción de 4'-N-etilciprofloxacino y ciprofloxacino, cuyas constantes de letalidad son estadísticamente indistinguibles. El antibiótico que provoca mayor velocidad de letalidad es el 97-101, seguido de 4'-N-etilciprofloxacino y ciprofloxacino. El de menor velocidad de letalidad es el 4'-N-metilciprofloxacino.

Los resultados obtenidos a 16 CMI muestran que los antibióticos que producen mayor letalidad son 4'-N-etilciprofloxacino y 97-101, seguido de ciprofloxacino que presenta una letalidad menor que 4'-N-etilciprofloxacino, pero estadísticamente igual a 97-101. La quinolona de menor velocidad de letalidad es 4'-N-metilciprofloxacino cuyo valor es significativamente distinto a los demás antibióticos a excepción de ciprofloxacino entre los que no existen diferencias.

A 64 CMI existen diferencias significativas entre todos los valores de constantes a excepción de 4'-N-metilciprofloxacino y 97-101, en los que no se

## Resultados 196

puede rechazar la hipótesis de igualdad. El compuesto con menor velocidad de letalidad es ciprofloxacino, le siguen 4'-N-metilciprofloxacino y 97-101. El derivado con mayor letalidad es el 4'-N-etilciprofloxacino.

Por último a 256 CMI, los antibióticos con menor velocidad de letalidad son ciprofloxacino y 4'-N-metilciprofloxacino, entre los que no existen diferencias significativas. En el extremo opuesto, las quinolonas con mayor letalidad son 4'-N-etilciprofloxacino y 97-101, que tampoco presentan diferencias estadísticamente significativas.

En resumen, se puede afirmar que la mayor o menor velocidad de letalidad que muestran los distintos antibióticos no sigue ningún patrón claro y hay que tener en cuenta la concentración de estudio para comparar el poder relativo de las quinolonas. Por otra parte, las concentraciones comentadas previamente son relativas a la CMI, que difiere para cada antibiótico. En cambio si se consideran las concentraciones absolutas las diferencias entre las quinolonas son mayores. Estas consideraciones se comentarán en el capítulo de Discusión.

### 3.3. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Ya se ha indicado que, estas relaciones se han establecido utilizando como parámetro estructural la lipofilia (concretamente, el coeficiente de reparto de las quinolonas entre n-octanol y una solución de pH 7,0) y como índice de actividad la inversa de la media geométrica de la concentración mínima inhibidora, con los símbolos respectivos de P y 1/MG CMI, cuyos

valores se detallan en los Cuadros 3.29 y 3.30. Asimismo en el Cuadro 3.31 se presentan estos mismos parámetros correspondientes a los heterólogos utilizados en la validación externa de la correlación.

Para establecer la relación estructura-actividad se han utilizado los datos disponibles, convenientemente agrupados, de modo que puedan contribuir a la mejor comprensión y esclarecimiento de los problemas que se abordan en este trabajo. En principio, se han seleccionado como sustratos de estas correlaciones las siguientes series o bloques:

➤ Todas las quinolonas ensayadas

Los parámetros y demás características de la correlación figuran en la columna de datos de las Figuras 3.29 a 3.36 bajo el epígrafe “Ambas series”. Estos datos han dado origen a las gráficas que están situadas en la parte superior de las figuras y que deben considerarse como las más generales, puesto que engloban elementos y propiedades que pueden ser heterogéneos.

➤ Quinolonas de la Serie A (4’N-alquilciprofloxacino)

Sus parámetros y propiedades generales se muestran en la 2ª columna de datos de las figuras anteriormente citadas, bajo el epígrafe de “Serie A”, para fines comparativos. Las gráficas correspondientes están expuestas en la Figura 3.37.

➤ Quinolonas de la Serie B (3’metil,4’N-alquilciprofloxacino)

Sus parámetros y demás características aparecen en la 3ª columna de las anteriormente citadas figuras, también para fines comparativos. Las gráficas representativas de la correlación estructura-actividad se reproducen en la Figura 3.38.

**Resultados 198**

<b>Microorganismo (n°)</b>	<b>CIP</b>	<b>Metil-CIP</b>	<b>Etil-CIP</b>	<b>Propil-CIP</b>	<b>Butil-CIP</b>
<i>Escherichia coli</i> (20)	70,907	24,575	34,591	11,107	2,915
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (20)	2,644	21,992	10,996	4,806	1,516
<i>Achromobacter spp.</i> (18)	0,382	0,445	0,354	0,214	0,079
<i>Moraxella catarrhalis</i> (20)	27,020	47,631	30,042	16,033	7,968
<i>Staphylococcus aureus</i> (20)	3,281	14,131	15,095	7,246	3,281
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i> (19)	6,445	9,246	13,076	7,465	3,605
<i>Enterococcus faecalis</i> (20)	1,569	1,516	1,464	0,901	0,467
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (22)	0,643	1,249	1,249	0,777	0,302
P n-octanol $\pm\sigma^*$	0,075 $\pm$ 0,003	1,42 $\pm$ 0,21	3,38 $\pm$ 0,040	11,85 $\pm$ 0,19	35,30 $\pm$ 3,50

\* Referencia 194

**Cuadro 3.29.** Valores de I/GM CMI y P para los compuestos de la serie 4'-N-alquilciprofloxacino en las especies estudiadas.

Microorganismo (n°)	97-100	97-101	97-102	97-103	97-104
<i>Escherichia coli</i> (20)	59,093	23,081	11,480	5,353	3,120
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (20)	5,554	14,015	6,213	2,828	1,414
<i>Achromobacter spp.</i> (18)	0,540	0,231	0,120	0,054	0,030
<i>Moraxella catarrhalis</i> (20)	28,959	34,509	18,455	16,599	8,249
<i>Staphylococcus aureus</i> (20)	5,311	9,491	6,997	5,685	2,972
<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo (19)	8,931	10,260	6,936	3,880	1,932
<i>Enterococcus faecalis</i> (20)	1,569	1,320	0,966	0,732	0,366
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (22)	0,969	1,134	0,854	0,685	0,322
P n-octanol $\pm\sigma$ *	0,21 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,02	3,53 $\pm$ 0,11	15,1 $\pm$ 0,5	48,6 $\pm$ 1,2

\* A. Ruíz García. Tesis Doctoral. Valencia, Noviembre 2000.

**Cuadro 3.30.** Valores de 1/GM CMI y P para los compuestos de la serie 3'metil, 4'N-alquilprofloxacino en las especies estudiadas.

## Resultados 200

Microorganismo (n°)	GRX	OFL	SAR	SPA
<i>Escherichia coli</i> (20)	39,683	15,974	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (20)	17,241	2,828	-	-
<i>Achromobacter spp.</i> (18)	0,429	0,250	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i> (20)	71,429	12,151	26,042	90,090
<i>Staphylococcus aureus</i> (20)	14,286	3,623	-	-
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i> (19)	21,978	3,733	7,194	13,532
<i>Enterococcus faecalis</i> (20)	4,032	0,616	0,683	2,650
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (22)	4,762	0,753	0,630	2,688
P n-octanol $\pm\sigma$	3,30 $\pm$ 0,06 <sup>1</sup>	0,42 $\pm$ 0,03 <sup>1</sup>	0,34 $\pm$ 0,03 <sup>2</sup>	1,17 $\pm$ 0,10 <sup>3</sup>

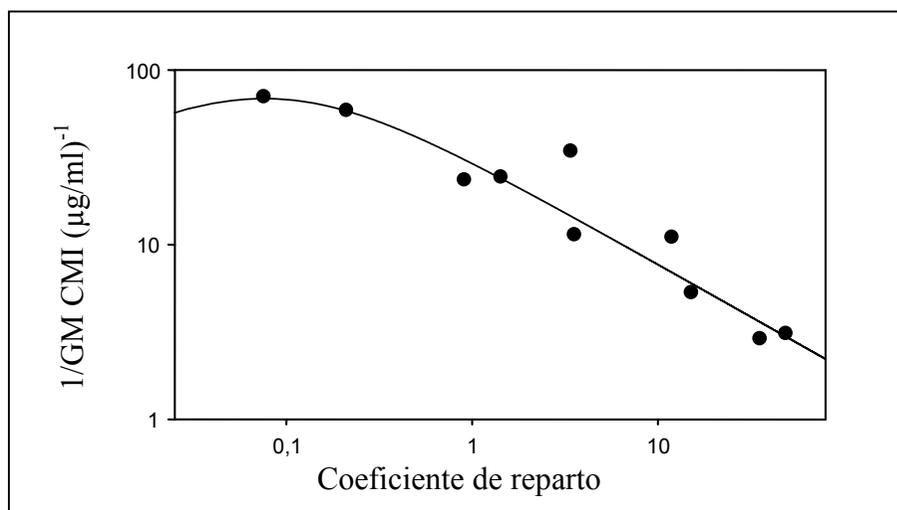
**1** G. Sánchez Castaño. Tesis Doctoral. Valencia, Septiembre 2000.

**2** Comunicación personal

**3** C. Fernández. Trabajo de Investigación. Valencia, Julio 2001.

**Cuadro 3.31.** Valores de 1/GM CMI y P para los compuestos heterólogos en las especies estudiadas.

Los comentarios acerca de los máximos de actividad, los óptimos de lipofilia y de las correlaciones en general se realizarán en el capítulo de Discusión.

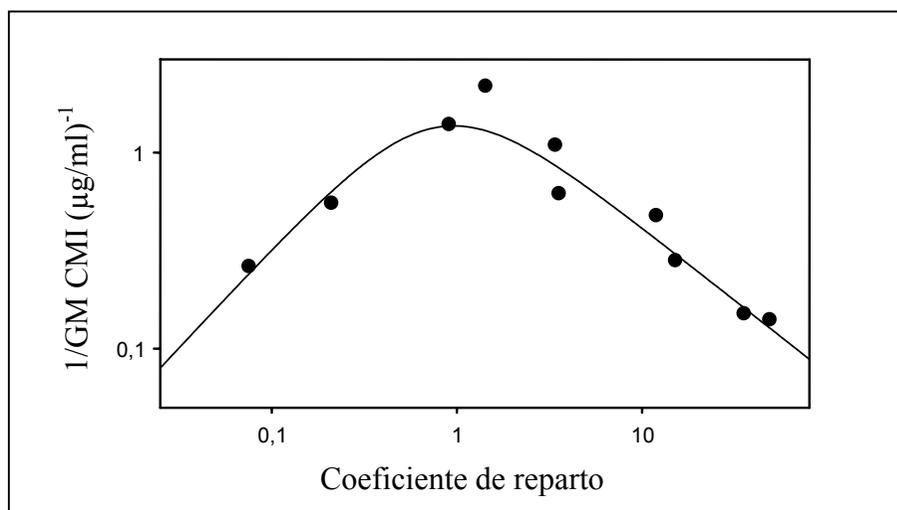


Símbolos	Ambas series	Serie A	Serie B
$L \pm \sigma$	518,2±516,5	131,9±67,81	2064±772,7
$m \pm \sigma$	0,536±0,285	0,184±0,133	0,870±0,088
$R \pm \sigma$	16,80±18,35	2,452±1,835	81,79±32,22
$n \pm \sigma$	1,137±0,255	0,934±0,091	1,423±0,081
$P_0$	0,08	0,09	0,06
$b \pm \sigma$	0,932±0,103	0,914±0,175	0,955±0,041
$a \pm \sigma$	0,006±3,441	-0,335±6,530	1,082±1,596
$r$	0,955	0,949	0,996

$P_0$ : lipofilia óptima;  $(1/GM\ CMI)_{max}$ : actividad máxima. Número de cepas ensayadas: 20  
 Correlación lineal entre actividades experimentales y calculadas:  $b$  pendiente;  $a$  ordenada en el origen;  $r$  coeficiente de correlación.

**Figura 3.29.** Relaciones estructura-actividad en *Escherichia coli*. La gráfica superior representa la correlación obtenida para todas las quinolonas ensayadas (1ª columna de datos).

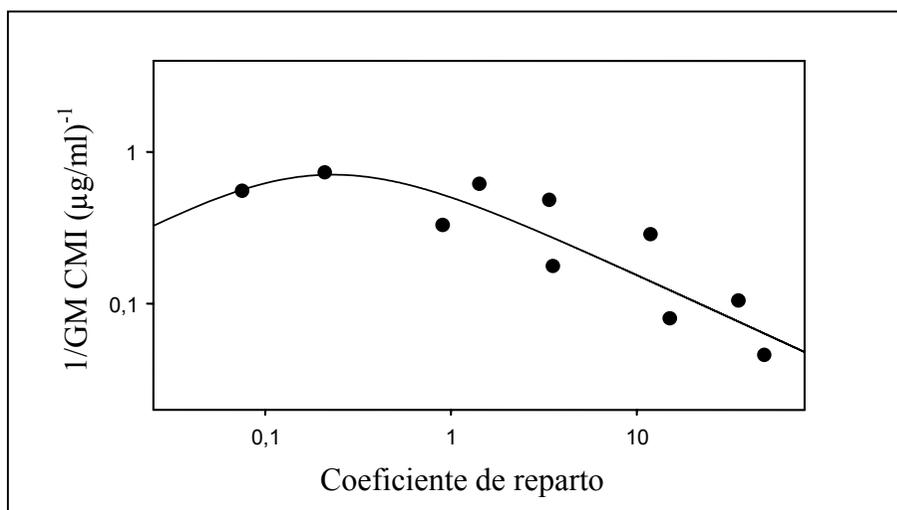
## Resultados 202



Símbolos	Ambas series	Serie A	Serie B
<b>L±σ</b>	33,06±18,27	37,02±6,072	44,92±24,29
<b>m±σ</b>	1,010±0,272	1,014±0,064	1,140±0,261
<b>R±σ</b>	1,294±1,017	0,818±0,232	2,392±0,181
<b>n±σ</b>	1,783±0,224	1,962±0,057	1,831±0,212
<b>P<sub>0</sub></b>	1,02	1,15	0,82
<b>b±σ</b>	0,677±0,103	0,932±0,082	0,974±0,086
<b>a±σ</b>	1,589±0,985	0,469±0,930	0,368±0,588
<b>r</b>	0,920	0,988	0,985

**P<sub>0</sub>**: lipofilia óptima; **(1/GM CMI)<sub>max</sub>**: actividad máxima. Número de cepas ensayadas: **20**  
 Correlación lineal entre actividades experimentales y calculadas: **b** pendiente; **a** ordenada en el origen; **r** coeficiente de correlación.

**Figura 3.30.** Correlaciones estructura-actividad obtenidas para *Acinetobacter calcoaceticus*. En la parte superior se ha reproducido una gráfica representativa de la correlación hallada en el caso que aborda la 1ª columna de datos, es decir, para todo el grupo en conjunto (ambas series).

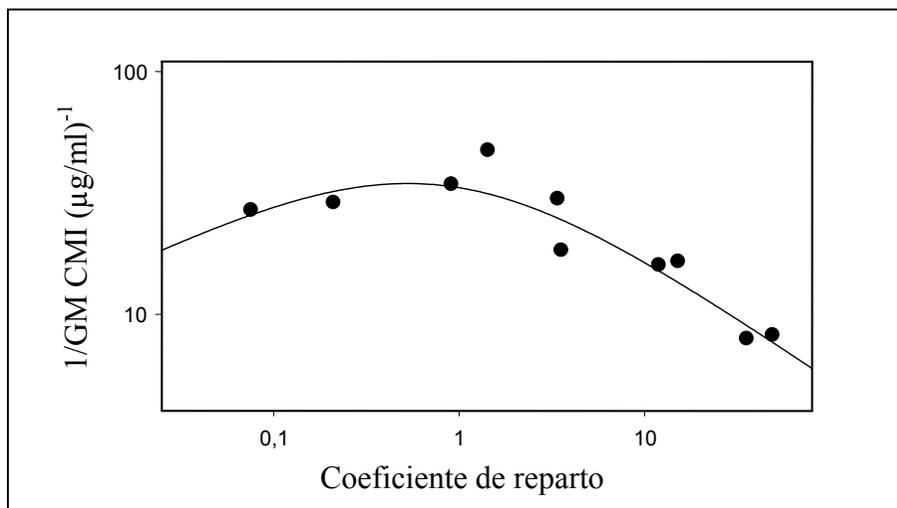


Símbolos	Ambas series	Serie A	Serie B
$L \pm \sigma$	4,125±6,170	0,815±0,056	7,907±2,371
$m \pm \sigma$	0,668±1,053	0,144±0,029	0,808±0,088
$R \pm \sigma$	7,212±2,469	0,217±0,058	21,36±7,055
$n \pm \sigma$	1,233±0,291	1,116±0,037	1,368±0,079
$P_0$	0,24	0,71	0,14
$b \pm \sigma$	0,797±0,168	1,064±0,062	0,923±0,087
$a \pm \sigma$	0,046±0,069	-0,016±0,028	0,023±0,035
$r$	0,860	0,995	0,983

$P_0$ : lipofilia óptima;  $(1/GM\ CMI)_{max}$ : actividad máxima. Número de cepas ensayadas: 18  
 Correlación lineal entre actividades experimentales y calculadas:  $b$  pendiente;  $a$  ordenada en el origen;  $r$  coeficiente de correlación.

**Figura 3.31.** Relaciones estructura-actividad para *Achromobacter* spp. La gráfica superior representa la correlación obtenida para todas las quinolonas ensayadas (ambas series).

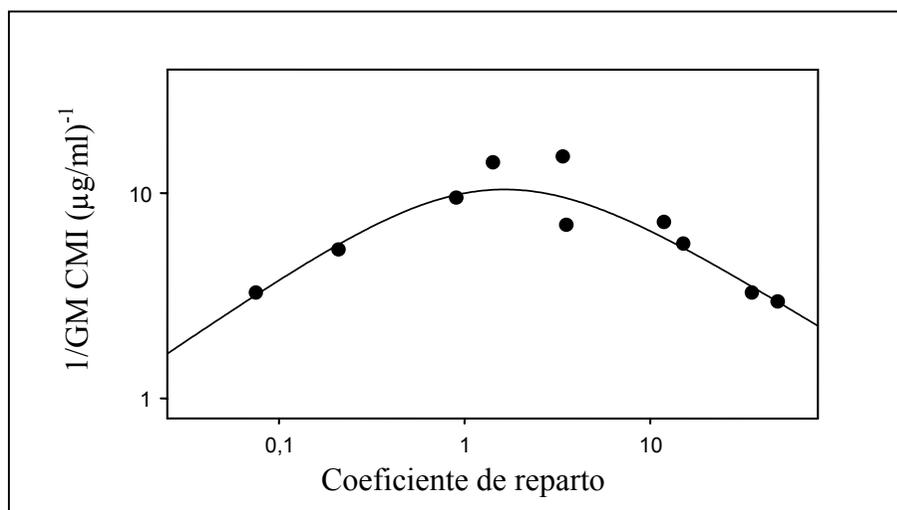
Resultados 204



Símbolos	Ambas series	Serie A	Serie B
$L \pm \sigma$	64,42±29,31	106,4±20,28	71,48±42,29
$m \pm \sigma$	0,320±0,169	0,456±0,073	0,329±0,189
$R \pm \sigma$	0,876±0,781	1,090±0,399	1,321±1,223
$n \pm \sigma$	0,900±0,089	1,154±0,045	0,782±0,105
$P_0$	0,60	0,65	0,46
$b \pm \sigma$	0,722±0,131	1,015±0,082	0,884±0,153
$a \pm \sigma$	5,330±3,442	1,260±2,374	2,826±3,662
$r$	0,890	0,990	0,945

$P_0$ : lipofilia óptima;  $(1/GM\ CMI)_{max}$ : actividad máxima. Número de cepas ensayadas: 20  
 Correlación lineal entre actividades experimentales y calculadas:  $b$  pendiente;  $a$  ordenada en el origen;  $r$  coeficiente de correlación.

**Figura 3.32.** Correlaciones estructura-actividad obtenidas para la especie *Moraxella catarrhalis*. La gráfica que figura en la parte superior reproduce la hallada para todas las quinolonas del grupo (ambas series, 1ª columna de datos).

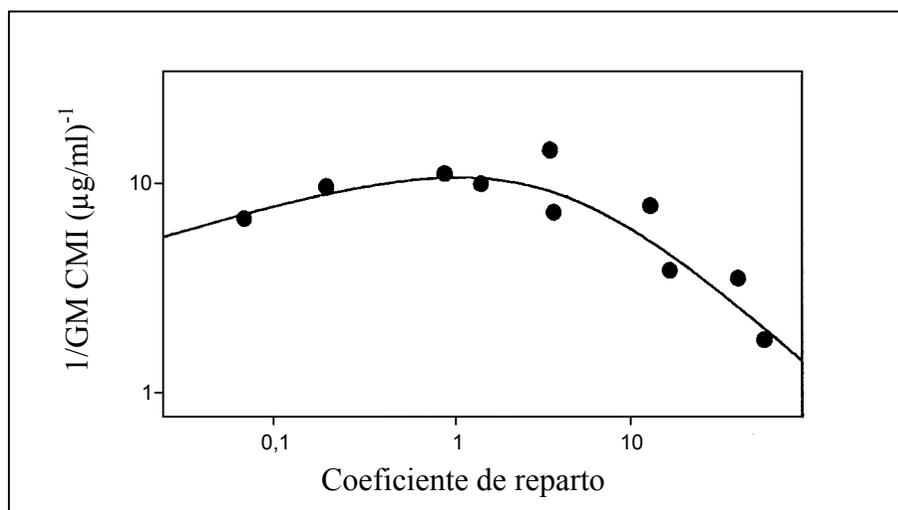


Símbolos	Ambas series	Serie A	Serie B
$L \pm \sigma$	16,20±9,350	15,30±1,490	22,67±4,630
$m \pm \sigma$	0,616±0,262	0,610±0,045	0,725±0,089
$R \pm \sigma$	0,621±0,748	0,201±0,065	1,388±0,456
$n \pm \sigma$	1,173±0,154	1,493±0,049	1,154±0,062
$P_0$	1,66	2,29	1,24
$b \pm \sigma$	0,594±0,118	0,971±0,037	1,030±0,132
$a \pm \sigma$	2,230±0,990	0,145±0,367	0,012±0,798
$r$	0,873	0,998	0,969

$P_0$ : lipofilia óptima;  $(1/GM\ CMI)_{max}$ : actividad máxima. Número de cepas ensayadas: 20  
 Correlación lineal entre actividades experimentales y calculadas:  $b$  pendiente;  $a$  ordenada en el origen;  $r$  coeficiente de correlación.

**Figura 3.33.** Relaciones estructura-actividad para *Staphylococcus aureus*. Incluye la representación gráfica de la correlación obtenida para todas las quinolonas ensayadas (1ª columna de datos) en la parte superior de la figura.

Resultados 206

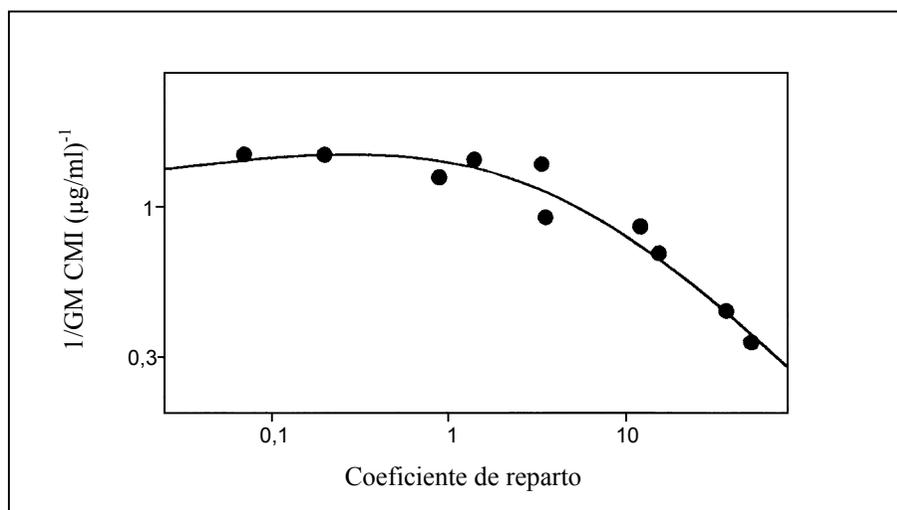


Símbolos	Ambas series	Serie A	Serie B
$L \pm \sigma$	12,79±6,670	10,19±2,432	23,13±5,071
$m \pm \sigma$	0,239±0,224	0,184±0,122	0,458±0,085
$R \pm \sigma$	0,297±0,523	0,036±0,032	1,310±0,477
$n \pm \sigma$	0,991±0,175	1,354±0,568	1,018±0,055
$P_0$	1,17	2,94	0,80
$b \pm \sigma$	0,634±0,099	1,476±1,466	1,008±0,025
$a \pm \sigma$	1,638±0,942	0,787±0,171	-0,068±0,177
$r$	0,915	0,936	0,998

$P_0$ : lipofilia óptima;  $(1/GM\ CMI)_{max}$ : actividad máxima. Número de cepas ensayadas: 20 en total: *S. epidermidis* (14); *S. cohni* (3) y *S. simulans* (3).

Correlación lineal entre actividades experimentales y calculadas: **b** pendiente; **a** ordenada en el origen; **r** coeficiente de correlación.

**Figura 3.34.** Relaciones estructura-actividad para las especies de *Staphylococcus coagulasa* negativas. En la parte superior se presenta la correlación para todas las quinolonas ensayadas (ambas series).

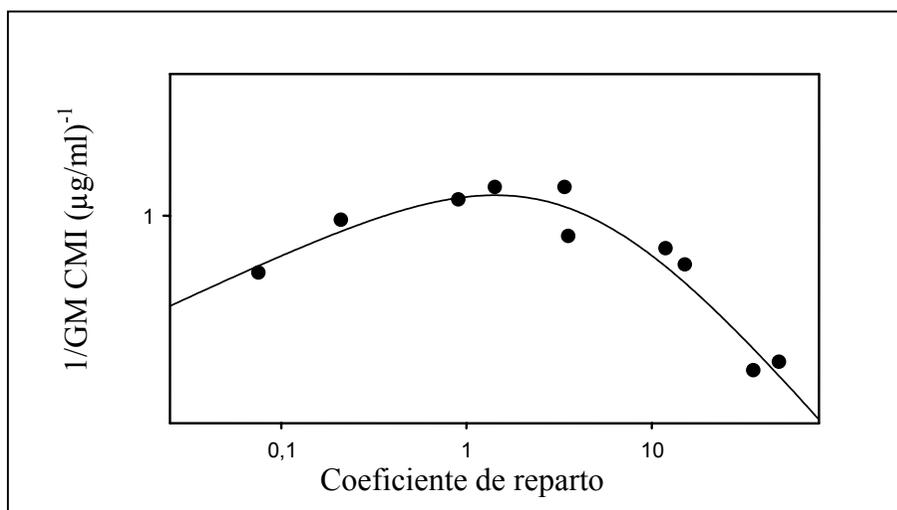


Símbolos	Ambas series	Serie A	Serie B
$L \pm \sigma$	2,070±0,481	1,983±0,150	2,059±0,859
$m \pm \sigma$	0,103±0,059	0,103±0,022	0,080±0,105
$R \pm \sigma$	0,394±0,304	0,195±0,076	0,543±0,620
$n \pm \sigma$	0,739±0,091	0,915±0,073	0,632±0,089
$P_0$	0,31	0,62	0,13
$b \pm \sigma$	0,926±0,105	0,968±0,084	0,972±0,064
$a \pm \sigma$	0,062±0,123	-0,007±0,106	0,015±0,075
$r$	0,952	0,989	0,991

$P_0$ : lipofilia óptima;  $(1/GM CMI)_{max}$ : actividad máxima. Número de cepas ensayadas: 20  
 Correlación lineal entre actividades experimentales y calculadas:  $b$  pendiente;  $a$  ordenada en el origen;  $r$  coeficiente de correlación.

**Figura 3.35.** Correlaciones estructura-actividad obtenidas para la especie *Enterococcus faecalis*. En la parte superior se incluye la gráfica representativa de la relación hallada para todas las quinolonas ensayadas, correspondientes a la 1ª columna de datos (ambas series).

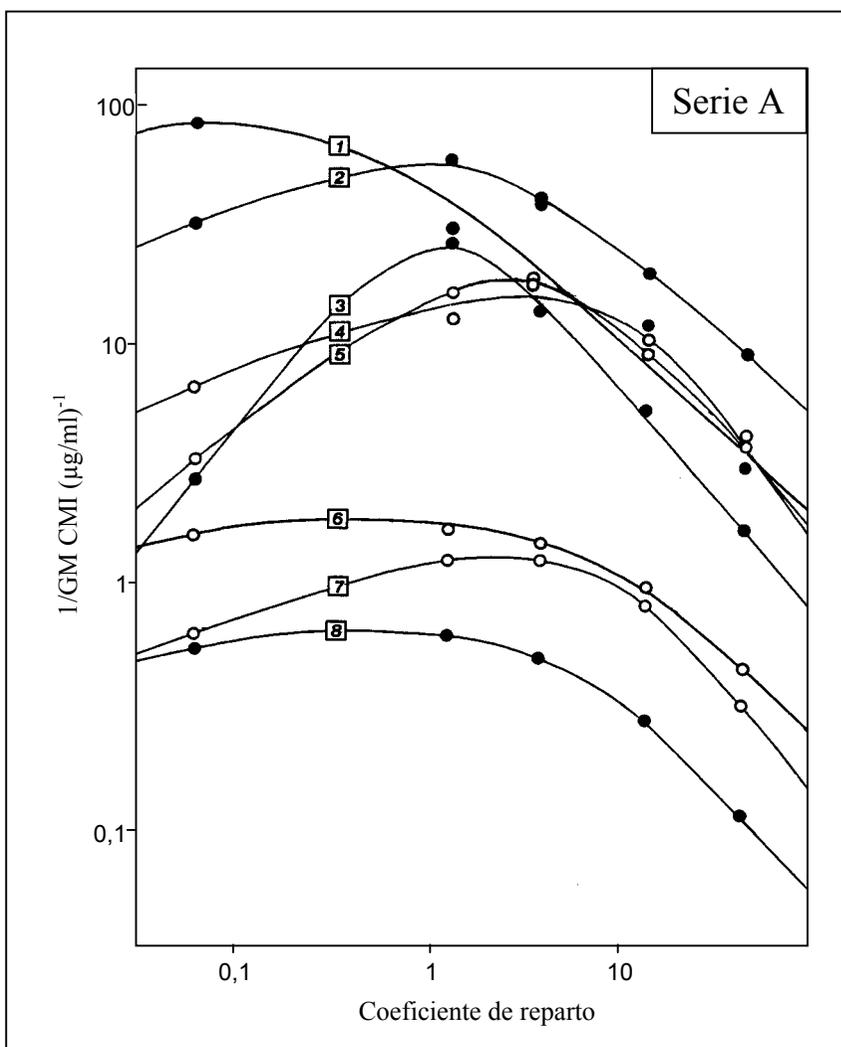
Resultados 208



Símbolos	Ambas series	Serie A	Serie B
$L \pm \sigma$	1,480±0,492	1,257±0,021	1,820±0,299
$m \pm \sigma$	0,295±0,146	0,258±0,008	0,353±0,060
$R \pm \sigma$	0,280±0,319	0,067±0,007	0,618±0,024
$n \pm \sigma$	1,027±0,121	1,385±0,023	0,897±0,032
$P_0$	1,41	2,36	1,09
$b \pm \sigma$	0,894±0,105	1,001±0,012	0,974±0,135
$a \pm \sigma$	0,061±0,092	-0,001±0,011	0,021±0,109
$r$	0,949	0,999	0,961

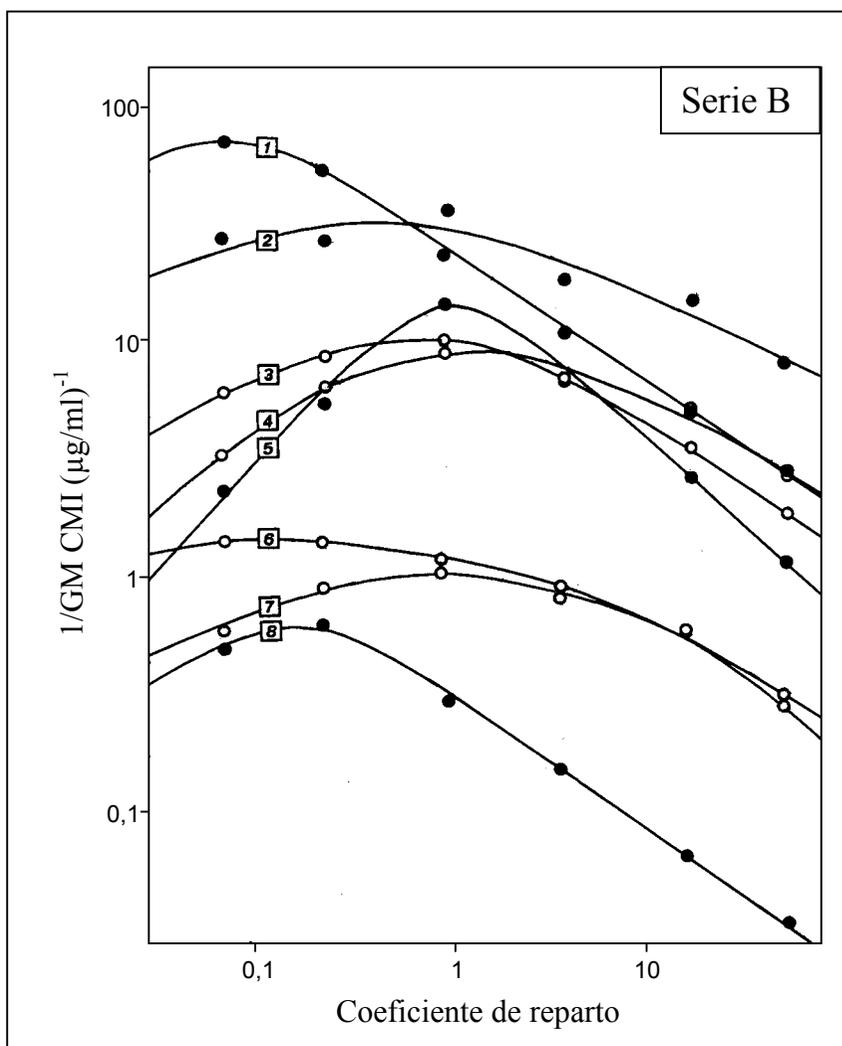
$P_0$ : lipofilia óptima;  $(1/GM\ CMI)_{max}$ : actividad máxima. Número de cepas ensayadas: 22  
 Correlación lineal entre actividades experimentales y calculadas:  $b$  pendiente;  $a$  ordenada en el origen;  $r$  coeficiente de correlación.

**Figura 3.36.** Correlaciones estructura-actividad halladas para *Streptococcus pneumoniae*. En la parte superior se incluye la gráfica representativa de la relación obtenida para las diez quinolonas ensayadas en conjunto, cuyos parámetros figuran en la 1ª columna de datos (ambas series).



**Figura 3.37.** Representación gráfica de las correlaciones estructura-actividad obtenidas para las quinolonas de la serie A (4'-N-alkilciprofloxacino) en cada una de las especies seleccionadas. El número de cada curva (encuadrado) es indicativo de la especie ensayada. Las claves son las siguientes:

- |  |                                    |
|--|------------------------------------|
| 1. <i>Escherichia coli</i>                   | 5. <i>Staphylococcus aureus</i>    |
| 2. <i>Moraxella catarrhalis</i>              | 6. <i>Enterococcus faecalis</i>    |
| 3. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>        | 7. <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| 4. <i>Staphylococcus coagulasa negativos</i> | 8. <i>Achromobacter spp.</i>       |



**Figura 3.38.** Representación gráfica de las correlaciones estructura-actividad obtenidas para las quinolonas de la serie B (3'-metil,4'-N-alkilciprofloxacino) en todas las especies ensayadas. El número encuadrado que figura en las curvas es indicativo de la especie, siendo las claves las siguientes:

- |  |                                    |
|--|------------------------------------|
| 1. <i>Escherichia coli</i>                   | 5. <i>Staphylococcus aureus</i>    |
| 2. <i>Moraxella catarrhalis</i>              | 6. <i>Enterococcus faecalis</i>    |
| 3. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>        | 7. <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| 4. <i>Staphylococcus coagulasa negativos</i> | 8. <i>Achromobacter spp.</i>       |

### 3.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS EN *Streptococcus pneumoniae*

#### 3.4.1. Actividad antimicrobiana de los homólogos del ciprofloxacino frente a determinadas cepas de *Streptococcus pneumoniae*

En el Cuadro 3.32 se muestran las cepas de *S. pneumoniae* utilizadas en el estudio, así como las mutaciones identificadas en las QRDR de la girasa y topoisomerasa IV de las mismas. Se han seleccionado para el estudio cepas que presentan una o varias mutaciones en una o ambas enzimas diana de las quinolonas. Como control se utiliza la cepa 7785, libre de mutaciones en las QRDR.

En los Cuadros 3.33 y 3.34 se detallan los resultados de la CMI obtenidos para las dos series estudiadas en las cepas de *S. pneumoniae* mencionadas. El ciprofloxacino presenta una CMI de 1 µg/ml en la cepa libre de mutaciones, lo que concuerda con los datos previos (9, 226).

Para todos los compuestos las cepas mutantes en ParC provocan un aumento de la CMI entre dos y tres diluciones, mientras que en las cepas con mutaciones en GyrA no se produce un aumento de la CMI o no es significativo (una dilución). En las cepas que expresan ambas mutaciones (GyrA y ParC) las CMIs de los derivados están comprendida entre 16 y 128 µg/ml (es decir, entre 4 y 6 diluciones mayores respecto a las obtenidas con la cepa sin mutaciones).

La cepa 1C1 no presenta mutaciones en las QRDR y probablemente se trate de un mutante en el mecanismo de secreción, lo que explicaría que la CMI permanezca inalterada o aumente una dilución con respecto a la cepa libre de mutaciones.

**Cepas de *Streptococcus pneumoniae***

Cepa	Mutaciones			
	Girasa		Topoisomerasa IV	
	GyrA	GyrB	ParC	ParE
7785*				
1C1	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
2C6	Ninguna	Ninguna	Ser-79 → Tyr	Ninguna
2C7	Ninguna	Ninguna	Ser-79 → Phe	Ninguna
3C4	Ser-83 → Tyr	Ninguna	Ser-79 → Tyr	Ninguna
1S1	Ser-83 → Phe	Ninguna	Ninguna	Ninguna
1S4	Ser-83 → Tyr	Ninguna	Ninguna	Ninguna
2S1	Ser-83 → Phe	Ninguna	Ser-79 → Tyr	Ninguna
2S4	Ser-83 → Phe	Ninguna	Asp-83 → Asn	Ninguna

\* cepa clínica sensible a ciprofloxacino aislada en el St. George's Hospital Medical School, Londres, UK (227).

**Cuadro 3.32.** *Mutaciones identificadas en las QRDR de las proteínas topoisomerasa IV y girasa en cepas de S. pneumoniae resistentes a ciprofloxacino y esparfloxacino. Estas cepas se obtuvieron según se describe en las referencias 226, 227 y 230.*

Cepa	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	CIP	Metil-CIP	Etil-CIP	Propil-CIP	Butil-CIP
7785	1	1	0,5-1	2	2-4
7785	1	1	0,5-1	2	2-4
1C1	2	1-2	1	2	4
1C1	2	1-2	1	2	4
2C6	8	4	4	4-8	8-16
2C6	8	4	4	4-8	8-16
2C7	8	2-4	2-4	2-4	4-8
2C7	8	2-4	2-4	2-4	4-8
1S1	2	2	1	2-4	4-8
1S1	2	2	1	2-4	4-8
1S4	2	2	1-2	2-4	4
1S4	2	2	1-2	2-4	4
3C4	64	16-32	32	64	64
3C4	64	16-32	32	64	64
2S1	64	64	32	32	32-64
2S1	64	64	32	32	64
2S4	32	32	16	32	64
2S4	32	32	16	32	64

**Cuadro 3.33.** Resultados de la CMI obtenidos con la serie 4'-N-alquilciprofloxacino frente a las cepas de *S. pneumoniae* descritas en el Cuadro 3.32.

Resultados 214

Cepa	CMI (µg/ml)					
	CIP	97-100	97-101	97-102	97-103	97-104
7785	1	0,5-1	0,5-1	2	2	4
7785	1	0,5-1	0,5-1	2	2	4
1C1	2	1	1	2	2	4
1C1	2	1	1	2	2	4
2C6	8	4	4	4-8	4	8
2C6	8	4	4	4-8	4	8
2C7	8	2-4	2-4	4	4	8
2C7	8	2-4	2-4	4	4	8
1S1	2	2	1	2	4	4-8
1S1	2	2	1	2	4	4-8
1S4	2	1	1-2	2	4	4-8
1S4	2	1	1-2	2	4	4-8
3C4	64	32-64	32-64	32-64	64	64
3C4	64	32-64	32-64	32-64	64	64
2S1	64	32	32	32-64	64	64-128
2S1	64	32	32	32-64	64	64-128
2S4	32	16-32	16	16-32	32	64
2S4	32	16-32	16	16-32	32	64

**Cuadro 3.34.** Resultados de la CMI obtenidos con la serie 3'metil,4'N-alquilciprofloxacino frente a las cepas de *S. pneumoniae* descritas en el Cuadro 3.32.

Estos resultados muestran claramente que la topoisomerasa IV es la primera diana para todos los derivados 4'-N-alquílicos del anillo piperacínico en posición 7, al menos en este microorganismo, al igual que lo es para ciprofloxacino, puesto que los valores de CMI no aumentan de forma significativa cuando la cepa ensayada presenta una o varias mutaciones en los genes que codifican la enzima girasa. Sin embargo, la CMI aumenta de forma considerable cuando las mutaciones se producen en los genes que codifican la topoisomerasa IV. Los mayores valores de CMI se observan de un modo general para todas las quinolonas ensayadas cuando las cepas de estudio presentan mutaciones en ambas dianas.

### **3.4.2. Estudio *in vitro* de la formación del complejo ternario (“cleavage”) por las topoisomerasas de *Streptococcus pneumoniae***

Se estudió la formación *in vitro* del complejo ternario entre fármaco, ADN y enzima (“cleavage” en terminología anglosajona) en presencia de la topoisomerasa IV y también de la girasa, con los derivados alquilados del ciprofloxacino en comparación con éste.

Se ha elegido este estudio en lugar de medir la inhibición enzimática (mediante el IC<sub>50</sub>) para profundizar en el mecanismo de acción de estos compuestos deslindando únicamente la interacción con la diana. En la actualidad se considera que simula de forma adecuada los procesos que ocurren en el interior de la bacteria, ya que se cree que la formación del complejo ternario es el proceso limitativo, el que inicia la acción bactericida de las quinolonas.

La comparación entre los distintos compuestos se ha llevado a cabo mediante la  $CC_{25}$ , que se define como la concentración de fluoroquinolona que convierte el 25% del ADN superenrollado PBR322 a la forma lineal en presencia de la topoisomerasa IV o de la girasa.

Los valores de  $CC_{25}$  obtenidos con cada uno de los compuestos para ambas condiciones de ensayo se detallan en el Cuadro 3.35.

Serie	Quinolona	$CC_{25}$ ( $\mu$ M)	
		GIRASA	TOPO IV
4’N-alquilciprofloxacino	CIP	80	10-20
	Metil-CIP	320	40
	Etil-CIP	320	40
	Propil-CIP	320	80
	Butil-CIP	>640	80-160
3’metil,4’N-alquilciprofloxacino	97-100	80	20
	97-101	160-320	20-40
	97-102	320	40
	97-103	320-640	40
	97-104	>640	80-160

**Cuadro 3.35.** Valores de  $CC_{25}$  obtenidos con los derivados alquílicos del ciprofloxacino en las enzimas diana de *S. pneumoniae*. **Topo IV** abreviación de topoisomerasa IV.

Las Figuras 3.39-3.42 muestran las imágenes de las bandas de ADN superenrollado (S) y lineal (L) obtenidas tras procesar las muestras mediante

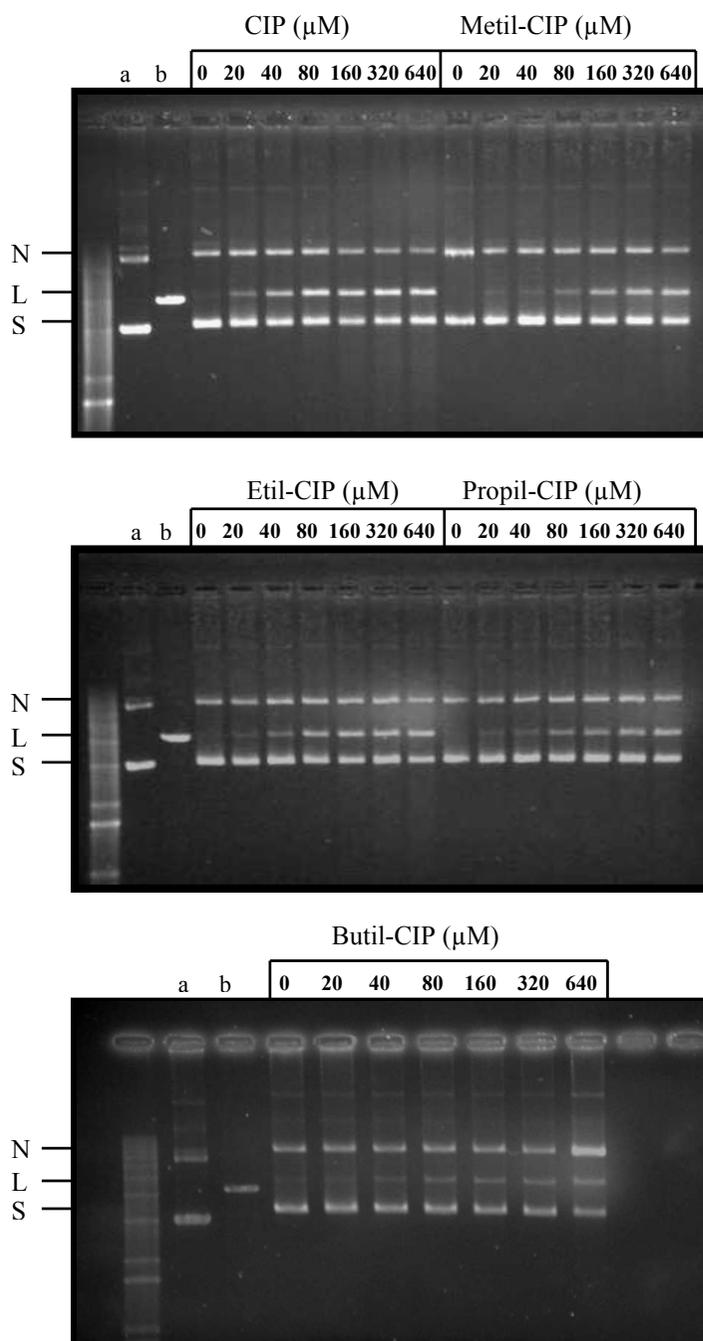
electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 V de cada uno de los compuestos estudiados con la enzima girasa (Figuras 3.39 y 3.40) y topoisomerasa IV (Figuras 3.41 y 3.42). Durante el proceso se obtiene también ADN relajado, que se denota por N. Las letras **a** y **b** representan el control de ADN superenrollado y lineal, respectivamente.

En cada imagen de gel se muestra el ámbito de concentraciones de la correspondiente quinolona utilizado en el ensayo. De esta forma se puede observar con facilidad a qué concentración corresponde la banda de ADN que convierte el 25% del ADN superenrollado PBR322 a la forma lineal en presencia de la topoisomerasa IV o de la girasa. El ADN superenrollado al ser de menor tamaño recorre mayor distancia que el ADN lineal, de mayor tamaño.

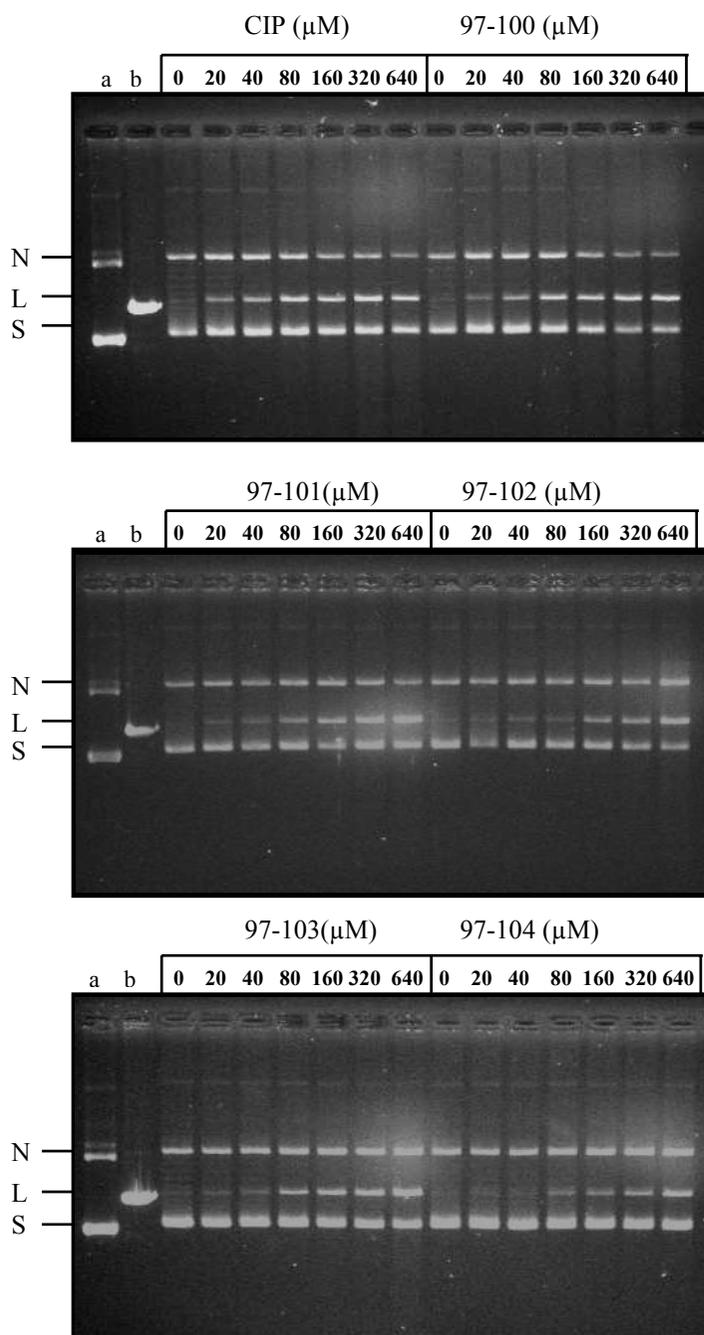
Los resultados demuestran que la formación del complejo ternario depende de la concentración de quinolona ensayada, puesto que conforme aumenta ésta el porcentaje de ADN lineal también incrementa de forma proporcional. El ciprofloxacino presenta menor valor de  $CC_{25}$  tanto en presencia de girasa como de topoisomerasa IV que los derivados 4'-N-alquílicos. Sólo el derivado 97-100 (único que no posee sustituyente en la posición 4'-N del anillo piperacínico) muestra la misma  $CC_{25}$  que el compuesto de referencia.

Por otro lado la  $CC_{25}$  aumenta con la lipofilia y el volumen del sustituyente del compuesto, lo que parece indicar que la adición de un grupo alquílico en la posición 4'-N del ciprofloxacino no favorece la formación del complejo “cleavage” y conforme el volumen de este radical aumenta, desde el grupo metílico hasta el butílico, la  $CC_{25}$  también incrementa.

Resultados 218

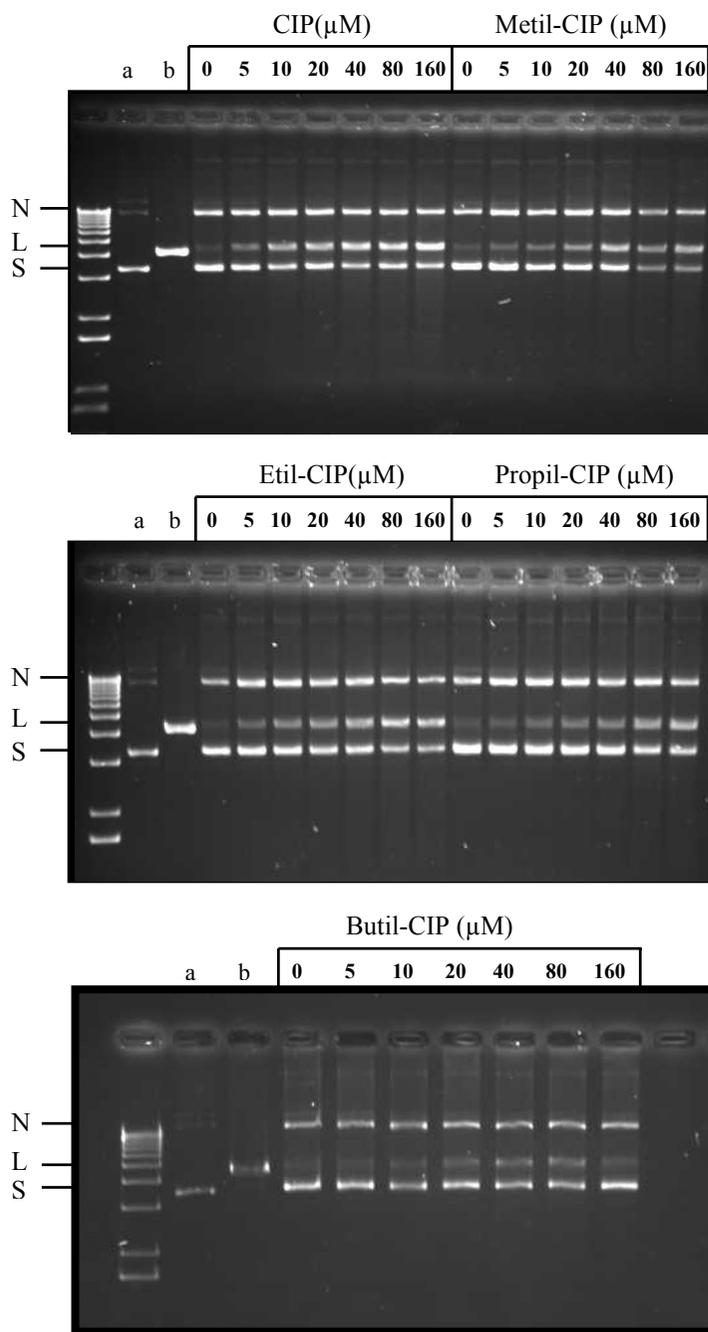


**Figura 3.39.** Resultados obtenidos en gel de agarosa tras el estudio del “cleavage” con la enzima girasa y los derivados de la serie 4'-N-alcilciprofloxacino.

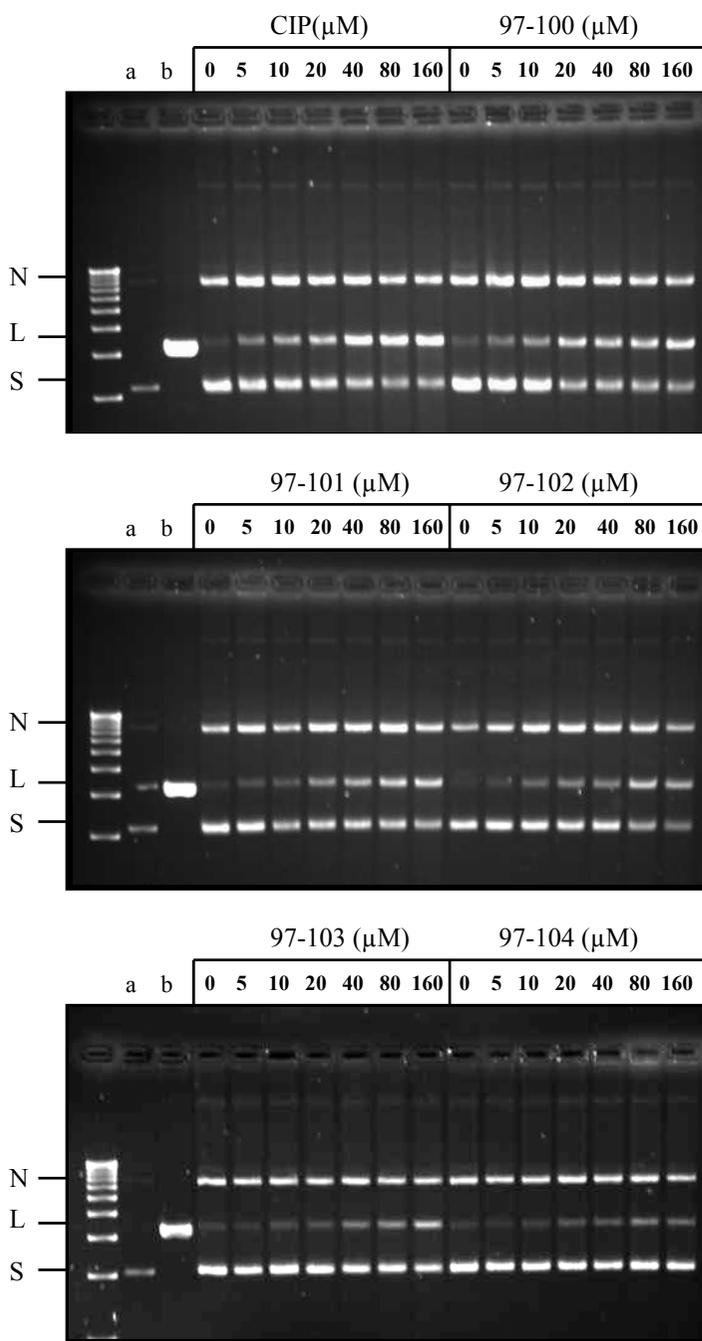


**Figura 3.40.** Resultados obtenidos en gel de agarosa tras el estudio del “cleavage” con la enzima girasa y los derivados de la serie 3’metil,4’N-alquilciprofloxacino.

Resultados 220



**Figura 3.41.** Resultados obtenidos en gel de agarosa tras el estudio del “cleavage” con la enzima topoisomerasa IV y los derivados de la serie 4’N-alcilciprofloxacino.



**Figura 3.42.** Resultados obtenidos en gel de agarosa tras el estudio del “cleavage” con la enzima topoisomerasa IV y los derivados de la serie 3’metil,4’N-alkilciprofloxacino.

### 3.5. ELECCIÓN DE CANDIDATOS: BALANCE ACTIVIDAD-BIODISPONIBILIDAD

En el Cuadro 3.37 se muestran los valores del cociente de actividades (CA) y biodisponibilidad oral relativa (CF) utilizados para establecer el balance actividad-biodisponibilidad (BAB) de los compuestos en todos los microorganismos estudiados. CA se calcula con los datos de 1/GM CMI recogidos en los Cuadros 3.29 y 3.30. CF se obtiene con los datos de  $F_{\text{calc}}$  mostrados en el cuadro 3.36, en el que se presentan además los valores de biodisponibilidad determinada en rata, que proporcionan la oportunidad de comprobar la fiabilidad del método propuesto y demuestran que las predicciones poseen un margen de error aceptable.

Quinolona	Constante de absorción <i>in situ</i> $k_a \pm \sigma$ (h <sup>-1</sup> )	$F_{\text{calc}}$	$F_{\text{det}}$
CIP	0,63±0,08 <sup>1</sup>	0,443	0,41 <sup>2</sup>
Metil-CIP	2,55±0,23 <sup>1</sup>	0,907	0,84 <sup>3</sup>
Etil-CIP	3,52±0,24 <sup>1</sup>	0,962	-
Propil-CIP	4,79±0,52 <sup>1</sup>	0,988	0,94 <sup>2</sup>
Butil-CIP	5,69±0,46 <sup>1</sup>	0,995	0,66 <sup>3,5</sup>
97-100	1,24±0,07 <sup>1</sup>	0,684	0,73 <sup>2</sup>
97-101	3,5±0,7 <sup>4</sup>	0,961	0,72 <sup>4</sup>
97-102	3,1±0,2 <sup>4</sup>	0,944	0,87 <sup>4</sup>
97-103	4,5±0,4 <sup>4</sup>	0,985	0,67 <sup>4</sup>
97-104	5,2±0,3 <sup>4</sup>	0,992	0,83 <sup>4</sup>

**1** Referencia 24. **2** Referencia 260. **3** G. Sánchez Castaño. Tesis Doctoral. Valencia, Septiembre 2000. **4** A. Ruíz García Tesis Doctoral Valencia, Noviembre 2000. **5** Los autores argumentan problemas de solubilidad en el ensayo.

**Cuadro 3.36.** Valores de la constante de absorción *in situ*, biodisponibilidad oral absoluta calculada según la ecuación 2.12 y biodisponibilidad intrínseca absoluta para los homólogos del ciprofloxacino pertenecientes a ambas series.

Microorganismo (n°)	Quinolona	CA	CF	BAB	Mejor BAB
<i>Escherichia coli</i> (20)	Metil-CIP	0,347	2,047	0,710	
	Etil-CIP	0,488	2,172	1,060	
	Propil-CIP	0,157	2,230	0,350	
	Butil-CIP	0,041	2,246	0,092	
	97-100	0,833	1,544	1,286	<b>97-100</b>
	97-101	0,326	2,169	0,707	
	97-102	0,162	2,131	0,345	
	97-103	0,075	2,223	0,167	
	97-104	0,044	2,239	0,099	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (20)	Metil-CIP	8,316	2,047	17,023	<b>Metil-CIP</b>
	Etil-CIP	4,158	2,172	9,031	
	Propil-CIP	1,817	2,230	4,052	
	Butil-CIP	0,573	2,246	1,287	
	97-100	2,100	1,544	3,242	
	97-101	5,300	2,169	11,496	
	97-102	2,350	2,131	5,008	
	97-103	1,070	2,223	2,379	
	97-104	0,535	2,239	1,198	
<i>Achromobacter spp.</i> (18)	Metil-CIP	1,167	2,047	2,389	<b>Metil-CIP</b>
	Etil-CIP	0,926	2,172	2,011	
	Propil-CIP	0,561	2,230	1,251	
	Butil-CIP	0,206	2,246	0,463	
	97-100	1,414	1,544	2,183	
	97-101	0,606	2,169	1,314	
	97-102	0,315	2,131	0,671	
	97-103	0,140	2,223	0,311	
	97-104	0,079	2,239	0,177	

Resultados 224

Microorganismo (n°)	Quinolona	CA	CF	BAB	Mejor BAB
<i>Moraxella catarrhalis</i> (20)	Metil-CIP	1,763	2,047	3,609	<b>Metil-CIP</b>
	Etil-CIP	1,112	2,172	2,415	
	Propil-CIP	0,593	2,230	1,322	
	Butil-CIP	0,295	2,246	0,663	
	97-100	1,072	1,544	1,655	
	97-101	1,277	2,169	2,770	
	97-102	0,683	2,131	1,455	
	97-103	0,614	2,223	1,365	
	97-104	0,305	2,239	0,683	
<i>Staphylococcus aureus</i> (20)	Metil-CIP	4,306	2,047	8,814	<b>Etil-CIP</b>
	Etil-CIP	4,600	2,172	9,991	
	Propil-CIP	2,208	2,230	4,924	
	Butil-CIP	1,000	2,246	2,246	
	97-100	1,619	1,544	2,500	
	97-101	2,892	2,169	6,273	
	97-102	2,132	2,131	4,543	
	97-103	1,732	2,223	3,850	
	97-104	0,906	2,239	2,029	
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i> (19)	Metil-CIP	1,435	2,047	2,937	<b>Etil-CIP</b>
	Etil-CIP	2,029	2,172	4,407	
	Propil-CIP	1,158	2,230	2,582	
	Butil-CIP	0,559	2,246	1,256	
	97-100	1,386	1,544	2,140	
	97-101	1,592	2,169	3,453	
	97-102	1,076	2,131	2,293	
	97-103	0,602	2,223	1,338	
	97-104	0,300	2,239	0,672	

Microorganismo (n°)	Quinolona	CA	CF	BAB	Mejor BAB
<i>Enterococcus faecalis</i> (20)	Metil-CIP	0,97	2,047	1,986	<b>Etil-CIP</b>
	Etil-CIP	0,93	2,172	2,020	
	Propil-CIP	0,57	2,230	1,271	
	Butil-CIP	0,30	2,246	0,674	
	97-100	1,000	1,544	1,544	
	97-101	0,841	2,169	1,824	
	97-102	0,616	2,131	1,313	
	97-103	0,467	2,223	1,038	
	97-104	0,233	2,239	0,522	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (22)	Metil-CIP	1,942	2,047	3,975	<b>Etil-CIP</b>
	Etil-CIP	1,942	2,172	4,218	
	Propil-CIP	1,208	2,230	2,694	
	Butil-CIP	0,469	2,246	1,053	
	97-100	1,506	1,544	2,325	
	97-101	1,763	2,169	3,824	
	97-102	1,328	2,131	2,830	
	97-103	1,065	2,223	2,367	
	97-104	0,500	2,239	1,120	

**Cuadro 3.37.** Valores de actividad antimicrobiana relativa (CA), biodisponibilidad oral relativa (CF) y balance actividad-biodisponibilidad (BAB) para los homólogos del ciprofloxacino pertenecientes a ambas series en todos los microorganismos estudiados y elección del mejor candidato en cada caso.



## *Capítulo IV: Discusión*

---

### **4.1. SELECCIÓN DE LAS QUINOLONAS EN ESTUDIO**

Las fluoroquinolonas se han convertido en agentes importantes en quimioterapia, especialmente en pacientes con infecciones graves que requieran fármacos potentes administrados por vía oral. Sin embargo, la aparición de resistencias ha llevado a la búsqueda de nuevas moléculas.

Durante años se ha creído que los homólogos por alquilación simple en la posición 4'N del anillo piperacínico del ciprofloxacino eran menos activos que el fármaco del que derivan (75, 195, 243). Además se dealquilan

para dar ciprofloxacino como metabolito por lo que se han considerado en ocasiones como profármacos (160).

Posiblemente por estos motivos, las quinolonas comercializadas más recientemente son diferentes del ciprofloxacino e incluyen modificaciones en el núcleo base de la benzopiridona (75, 76, 251) lo que ha conducido a la obtención de nuevas quinolonas, más activas (34, 56, 76) pero, en muchos casos, más tóxicas, hasta el punto de que algunas han sido retiradas del mercado tras haberse demostrado su toxicidad a medio o largo plazo (1, 10, 277).

Por el contrario, series de compuestos como los derivados 4'-N-alquilciprofloxacino no se suelen incluir en los estudios de diseño de fármacos para uso humano. No obstante, ya desde 1990 existen trabajos en la bibliografía que demuestran que estos compuestos son más activos que el ciprofloxacino e incluso se absorben más eficazmente en el tracto intestinal de algunos animales (87, 116). Además no deben considerarse como profármacos ya que su metabolismo es lento.

Por este motivo, se han sintetizado varios elementos homólogos pertenecientes a dos series: 4'-N-alquilciprofloxacino y 3'-metil,4'-N-alquilciprofloxacino (Figura 2.1), con los que se pretende obtener un aumento en la biodisponibilidad manteniendo la actividad. Esta es la hipótesis de trabajo del **Proyecto de Investigación SAF 96-1710** titulado "Predicción de la biodisponibilidad en los estudios de desarrollo de fármacos: nuevas quinolonas". Para desarrollar los objetivos de este proyecto, es necesaria la determinación de la actividad antibacteriana, como parámetro microbiológico, y relacionarlo con la biodisponibilidad, como parámetro farmacocinético tomando el ciprofloxacino como referencia.

## 4.2. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

El estudio de la actividad realizado pretende comprobar si las propiedades antibacterianas de estos compuestos, junto a la mejora de la biodisponibilidad que se les asocia, justifican un estudio más profundo de estas moléculas para valorar su posible utilización terapéutica.

En la realización de este trabajo, inicialmente se utilizaron varias cepas de referencia de la ATCC para el cálculo de la CMI, con el fin de tener una primera aproximación de resultados en los nuevos homólogos. Se pretendía comprobar si tras la adición de los correspondientes radicales se mantenía el espectro y la actividad con respecto al ciprofloxacino.

Se amplió luego el estudio a los microorganismos que presentaron mejor actividad que el fármaco patrón, es decir, algunas especies de Gram negativos y Gram positivos en general, incluyendo varios géneros y cepas resistentes a meticilina y/o ciprofloxacino para investigar si estos homólogos podrían ser una solución ante el importante problema de resistencias. No obstante, los resultados no mejoraron de manera significativa la actividad del compuesto de referencia en las cepas resistentes.

Se decidió finalmente, obtener información general acerca de la actividad de estas sustancias y comprobar si los resultados preliminares obtenidos son característica de cepa o de género.

Para determinar si la actividad del derivado es la misma que la del ciprofloxacino se compara la media geométrica de las CMIs. Además, para confirmar si tiene la misma actividad se compara también la CMI cepa a cepa, considerando que diferencias menores de 2 diluciones  $\log_2$  no son significativas.

#### 4.2.1. Serie 4’N-alkilciprofloxacino

La media geométrica y la concordancia de los compuestos de esta serie comparadas con las del ciprofloxacino se muestran en los Cuadros 4.1 y 4.2, respectivamente. Sin duda, los compuestos más activos de esta serie son los que llevan un grupo metilo o etilo en posición 4’N.

Microorganismo	MEDIA GEOMÉTRICA				
	CIP	Metil-CIP	Etil-CIP	Propil-CIP	Butil-CIP
<i>Escherichia coli</i>	<b>0,014</b>	0,041	0,029	0,090	0,343
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,378	<b>0,046</b>	0,091	0,208	0,660
<i>Achromobacter spp.</i>	2,619	<b>2,245</b>	2,828	4,666	12,699
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0,037	<b>0,021</b>	0,033	0,062	0,126
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,305	0,071	<b>0,066</b>	0,138	0,305
SCN	0,155	0,108	<b>0,077</b>	0,134	0,277
<i>Enterococcus faecalis</i>	<b>0,637</b>	0,660	0,683	1,110	2,144
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,554	<b>0,801</b>	<b>0,801</b>	1,288	3,311

SCN: *Staphylococcus coagulasa* negativos

**Cuadro 4.1.** Medias geométricas del ciprofloxacino y los compuestos homólogos 4’N-alkílicos para las cepas ensayadas.

Según el criterio adoptado, la actividad del derivado **4’N-metilado** coincide con la del ciprofloxacino en el 88,1% del total de las cepas ensayadas, mientras el 10,6% y 1,3% del total de las cepas tuvieron una CMI

8 ó 16 veces menor que las del patrón, respectivamente. Si se utiliza un criterio de concordancia más restrictivo ( $\pm 1 \log_2$ ) el porcentaje de similitud total es del 59,2%, y, de nuevo, el resto se debe a una mejor actividad en todos los microorganismos, a excepción de *E. coli* en el que la concordancia es del 30%. Por otra parte, las media geométrica de las CMI's del derivado es inferior a la del ciprofloxacino en todos los microorganismos estudiados a excepción de *E. coli* y *E. faecalis*.

En resumen, el derivado 4'-N-metilciprofloxacino presenta la misma actividad que el patrón en *E. faecalis*. En la especie *E. coli* depende del criterio que se utilice. Es claramente más activo en el resto de las especies ensayadas; destaca *A. calcoaceticus* y *S. aureus* en las que la media geométrica es 8,3 y 4,3 veces menor, respectivamente, a la de ciprofloxacino.

En el homólogo **4'-N-etílico**, el porcentaje de concordancia total con el ciprofloxacino es del 96,9%, pero de nuevo el resto se debe a una mayor actividad de este compuesto. A esta misma conclusión se llega al comparar según el criterio de concordancia de  $\pm 1 \log_2$  el porcentaje de similitud que en total es del 68,9%, ya que sólo en *E. coli* la actividad del derivado es inferior, siendo la concordancia del 70%.

Esto se confirma también al comparar la media geométrica de las CMI's, siendo inferior la del derivado en todos los microorganismos estudiados a excepción de *E. coli*, *Achromobacter spp.* y *E. faecalis*.

En resumen, el derivado 4'-N-etilciprofloxacino presenta la misma actividad que el patrón en las especies: *E. coli*, *Achromobacter spp.* y *E. faecalis*. Es más activo en el resto de las especies ensayadas, destacando *A. calcoaceticus*, *S. aureus* y los SCN en las que la media geométrica es 4,2, 4,6 y 2,0 veces menor a la de ciprofloxacino, respectivamente.

Discusión 232

Microorganismo	Metil-CIP		Etil-CIP		Propil-CIP		Butil-CIP	
	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$
<i>Escherichia coli</i>	100%	30%	100%	70%	25%	10%	10%	10%
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	10% 80% (-3 log <sub>2</sub> ) 10% (-4 log <sub>2</sub> )	0% 10% (-2 log <sub>2</sub> ) 80% (-3 log <sub>2</sub> ) 10% (-4 log <sub>2</sub> )	90% 10% (-3 log <sub>2</sub> )	10% 80% (-2 log <sub>2</sub> ) 10% (-3 log <sub>2</sub> )	100%	90% 10% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	95%
<i>Achromobacter spp.</i>	100%	94,4% 5,6%(-2 log <sub>2</sub> )	100%	100%	100%	88,9%	55,6%	16,7%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	100%	90% 10% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	95% 5% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	95%	100%	25%
<i>Staphylococcus aureus</i>	95% 5% (-3 log <sub>2</sub> )	0% 95% (-2 log <sub>2</sub> ) 5% (-3 log <sub>2</sub> )	85% 15% (-3 log <sub>2</sub> )	0% 85% (-2 log <sub>2</sub> ) 15% (-3 log <sub>2</sub> )	100%	90% 10% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	100%
SCN	100%	100%	100%	85% 15% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	100%	100%	100%
<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	25%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100%	59,1% 40,9% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	90,9% 9,1% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	100%	100%	86,4%
<b>% total</b>	88,1% 10,6% (-3 log <sub>2</sub> ) 1,3% (-4 log <sub>2</sub> )	59,2% 20,2% (-2 log <sub>2</sub> ) 10,6% (-3 log <sub>2</sub> ) 1,3% (-4 log <sub>2</sub> )	96,9% 3,1% (-3 log <sub>2</sub> )	68,9% 24,3% (-2 log <sub>2</sub> ) 3,1% (-3 log <sub>2</sub> )	90,6%	84,2% 2,5% (-2 log <sub>2</sub> )	83,2%	57,3%

SCN: *Staphylococcus coagulasa* negativos

**Cuadro 4.2.** Porcentaje de concordancia de los derivados 4'-N-alquílicos con respecto a ciprofloxacino.

El derivado **4’N-propílico** presenta un porcentaje de concordancia total de 90,6%, siendo del 100% en todos los microorganismos a excepción de *E. coli* en el que es del 25%. Al comparar el porcentaje de similitud según el criterio de concordancia de  $\pm 1 \log_2$  se observa que es del 84,2%, siendo la diferencia hasta el 100% debida a una peor actividad, aunque un 2,5% del porcentaje total se debe a que las CMI de este derivado son 4 veces inferiores a las del ciprofloxacino en las especies *A. calcoaceticus* y *S. aureus*.

Por otro lado, la media geométrica de las CMI de este derivado es inferior a la del ciprofloxacino en *A. calcoaceticus*, *S. aureus*, SCN y *S. pneumoniae*, por lo que en estos microorganismos la actividad del derivado es mayor. Presenta la misma actividad en *Achromobacter spp.*, *M. catarrhalis* y *E. faecalis* y es menos activo en *E. coli*.

Siguiendo el mismo criterio que en los casos anteriores, el compuesto **4’N-butílico** es el que muestra peor actividad, aunque el porcentaje de concordancia con el ciprofloxacino es del 100% en todas las especies a excepción de *Achromobacter spp.* y *E. coli*, siendo el porcentaje total del 83,2%. Sin embargo, al utilizar el criterio de  $\pm 1 \log_2$  sólo en los microorganismos *S. aureus* y SCN el porcentaje es del 100%. Por otro lado, la media geométrica es mayor a la del ciprofloxacino en todas las especies a excepción de *A. calcoaceticus* en el que el valor coincide. De este modo se puede afirmar que la actividad del homólogo 4’N-butilciprofloxacino es la misma que la del patrón en *A. calcoaceticus*, *S. aureus*, SCN y *S. pneumoniae*. Es inferior en *E. coli* y *Achromobacter spp.* En *M. catarrhalis* y *E. faecalis* la actividad del homólogo es igual o inferior a la de ciprofloxacino dependiendo del criterio utilizado.

Por tanto, aunque la actividad de los compuestos de esta serie depende en gran medida del microorganismo que se considere, se puede afirmar sin lugar a dudas que los compuestos con un radical metilo o etilo son los más activos a excepción de *E. coli* en el que el ciprofloxacino presenta una actividad ligeramente superior. Un dato curioso es que de forma general, 4’N-metilciprofloxacino es el compuesto más activo frente a los Gram negativos (a excepción de *E. coli*), mientras que el derivado etilado es el más activo frente a los Gram positivos. No obstante, 4’N-propilciprofloxacino también presenta mejor actividad que el patrón en los microorganismos Gram positivos (a excepción de *E. faecalis*) y *A. calcoaceticus*. 4’N-butilciprofloxacino no presenta mejor actividad que el patrón en ningún caso, si bien en los microorganismos ya mencionados la actividad es la misma.

#### 4.2.2. Serie 3’metil,4’N-alquilociprofloxacino

En los Cuadros 4.3 y 4.4 se muestran la media geométrica y la concordancia de los compuestos de esta serie con respecto al ciprofloxacino.

Según el criterio adoptado, la actividad del derivado **97-100** coincide con la del ciprofloxacino en el 99,4% del total de las cepas ensayadas, siendo del 100% en todos los microorganismos estudiados, a excepción de *E. coli* en cuyo caso es del 95%. Si se adopta un criterio de concordancia más restrictivo ( $\pm 1 \log_2$ ) el porcentaje de similitud total es del 97,5%, donde el 2,5% restante se debe a una mejor actividad de este compuesto en *A. calcoaceticus* y *M. catarrhalis*. Sin embargo, la media geométrica de las CMI’s del derivado es inferior a la del ciprofloxacino en todos los microorganismos estudiados a excepción de *E. coli* y *E. faecalis*.

En resumen, el derivado 97-100 presenta la misma actividad que el patrón en *E. coli* y *E. faecalis*. Es ligeramente más activo en el resto de las especies ensayadas, destacando *A. calcoaceticus* en el que la media geométrica es 2,1 veces menor a la del ciprofloxacino.

Microorganismo	MEDIA GEOMÉTRICA					
	CIP	97-100	97-101	97-102	97-103	97-104
<i>Escherichia coli</i>	<b>0,014</b>	0,017	0,043	0,087	0,187	0,321
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,378	0,180	<b>0,071</b>	0,1610	0,354	0,707
<i>Achromobacter spp.</i>	2,619	<b>1,852</b>	4,320	8,314	18,665	33,256
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0,037	0,035	<b>0,029</b>	0,054	0,060	0,121
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,305	0,188	<b>0,105</b>	0,143	0,176	0,337
SCN	0,155	0,112	<b>0,098</b>	0,144	0,258	0,518
<i>Enterococcus faecalis</i>	<b>0,637</b>	0,673	0,758	1,035	1,366	2,732
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,554	1,032	<b>0,882</b>	1,171	1,460	3,109

SCN: *Staphylococcus coagulasa* negativos

**Cuadro 4.3.** Medias geométricas del ciprofloxacino y los derivados homólogos 3'metil,4'N-alquílicos para las cepas ensayadas.

En el homólogo **97-101**, el porcentaje de concordancia total con el ciprofloxacino es del 95%, y, de nuevo, el resto se debe a una mayor actividad de este compuesto en *A. calcoaceticus*, ya que en esta especie el 30% y 5% de las cepas ensayadas presentan CMI's 8 ó 16 veces menor que

las del ciprofloxacino, respectivamente. No obstante, al comparar según el criterio de concordancia de  $\pm 1 \log_2$  el porcentaje de similitud es en total del 71,9%, pero sólo en *E. coli* la actividad del derivado es inferior, siendo la concordancia del 50%.

Si se tiene en consideración la media geométrica de las CMI, la del derivado es inferior en todos los microorganismos estudiados a excepción de *E. coli*, *Achromobacter spp.* y *E. faecalis*.

En resumen, el derivado 97-101 presenta la misma actividad que el ciprofloxacino en *E. faecalis* y *Achromobacter spp.* Es inferior en *E. coli* y claramente mayor en el resto de las especies ensayadas, destacando *A. calcoaceticus* y *S. aureus* en las que la media geométrica es 5,3 y 2,9 veces menor a la del patrón, respectivamente.

El derivado **97-102** presenta un porcentaje de concordancia total del 91,3%, siendo del 100% en todos los microorganismos a excepción de *E. coli* en el que es del 30%. Al comparar el porcentaje de similitud según el criterio de concordancia de  $\pm 1 \log_2$  se observa que es del 74,1%, siendo la diferencia hasta el 100% debida a una peor actividad en *E. coli* y *Achromobacter spp.*, aunque un 5% de este porcentaje total se debe a que las CMI del derivado son 4 veces inferiores a las del ciprofloxacino en las especies *A. calcoaceticus*, *M. catarrhalis* y *S. aureus*.

Por otro lado, la media geométrica de las CMI de este homólogo es inferior a la del ciprofloxacino en *A. calcoaceticus*, *S. aureus*, SCN y *S. pneumoniae*, por lo que en estos microorganismos la actividad del derivado es mayor. Presenta la misma actividad en *E. faecalis* y es menor en *E. coli*. La actividad frente a *Achromobacter spp.* depende del criterio adoptado.

Microorganismo	97-100		97-101		97-102		97-103		97-104	
	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$
<i>Escherichia coli</i>	95%	95%	95%	50%	30%	10%	10%	0%	10%	0%
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	100%	90% 10% (-2 log <sub>2</sub> )	65% 30% (-3 log <sub>2</sub> ) 5% (-4 log <sub>2</sub> )	5% 60% (-2 log <sub>2</sub> ) 30% (-3 log <sub>2</sub> ) 5% (-4 log <sub>2</sub> )	100%	75% 25% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	100%	100%	95%
<i>Achromobacter spp.</i>	100%	100%	100%	94,4%	100%	27,8%	27,8%	0%	16,7%	0%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	100%	95% 5% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	95% 5% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	90% 5% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	95%	95%	30%
<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	100%	50% 50% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	90% 10% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	100%	100%	100%
SCN	100%	100%	100%	90% 10% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	100%	100%	100%	100%	30%
<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	90%	90%	0%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100%	100%	100%	90,9% 9,1% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	100%	100%	100%	100%	90,9%
<b>% total</b>	99,4%	97,5% 1,9% (-2 log <sub>2</sub> )	95% 3,8% (-3 log <sub>2</sub> ) 0,6% (-4 log <sub>2</sub> )	71,9% 16,8% (-2 log <sub>2</sub> ) 3,8% (-3 log <sub>2</sub> ) 0,6% (-4 log <sub>2</sub> )	91,3%	74,1% 5% (-2 log <sub>2</sub> )	79,7%	73,1%	76,5%	43,2%

SCN: *Staphylococcus coagulasa* negativos

**Cuadro 4.4.** Porcentaje de concordancia de los derivados 3'metil,4'N-alquílicos con respecto a ciprofloxacino.

Para el compuesto **97-103** el porcentaje de concordancia con el ciprofloxacino es del 100% en todas las especies a excepción de *E. coli* y *Achromobacter spp.* siendo el total de 79,7%. Lo mismo se observa al utilizar el criterio de  $\pm 1 \log_2$ , aunque en las especies *M. catarrhalis* y *E. faecalis* la concordancia baja a 95% y 90%, respectivamente.

Por otro lado, la media geométrica de este derivado es inferior a la del ciprofloxacino en *A. calcoaceticus*, *S. aureus* y *S. pneumoniae* en los que la actividad del homólogo es ligeramente mayor. Presenta la misma actividad en *M. catarrhalis*, *E. faecalis* y los SCN y es menor en *E. coli* y *Achromobacter spp.*

El derivado **97-104** es el que muestra peor actividad de la serie, con un porcentaje de concordancia total de 76,5%, ó 43,2% según el criterio escogido, aunque es superior al 95% con ambos criterios en *A. calcoaceticus*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*. Por otro lado, la media geométrica es mayor a la del ciprofloxacino en todas las especies. De este modo, la actividad del homólogo 97-104 es la misma que la del patrón en *A. calcoaceticus*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*. Es inferior para el resto de microorganismos, salvo en los SCN para los que la actividad es igual o inferior a la de ciprofloxacino dependiendo del criterio utilizado.

En resumen, aunque la actividad, como en la serie anterior, depende del microorganismo que se considere, se puede afirmar sin lugar a dudas que los compuestos 97-100 y 97-101 son los más activos a excepción de *E. coli* en el que el ciprofloxacino presenta una actividad ligeramente superior. En general, el derivado 97-101 es el más activo de todos, siendo el que presenta la mayor actividad frente a *A. calcoaceticus*, *M. catarrhalis*, *S. aureus*, SCN

y *S. pneumoniae*. Por otro lado, 97-100 es el más activo frente a *Achromobacter spp.* No obstante, 97-102 y 97-103 también presentan mejor actividad que el ciprofloxacino en los microorganismos *A. calcoaceticus*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*. 97-104 no presenta mejor actividad que el patrón en ningún caso, si bien en los microorganismos ya mencionados la actividad es la misma.

Según lo visto hasta el momento en las dos series homólogas, se comprueba lo que ya se adelantó al comentar la relación estructura-actividad de las quinolonas en el capítulo de Antecedentes. Domagala (76) afirma que la alquilación del anillo en posición 7 aumenta la actividad frente a microorganismos Gram positivos y la semivida (Figura 4.1).

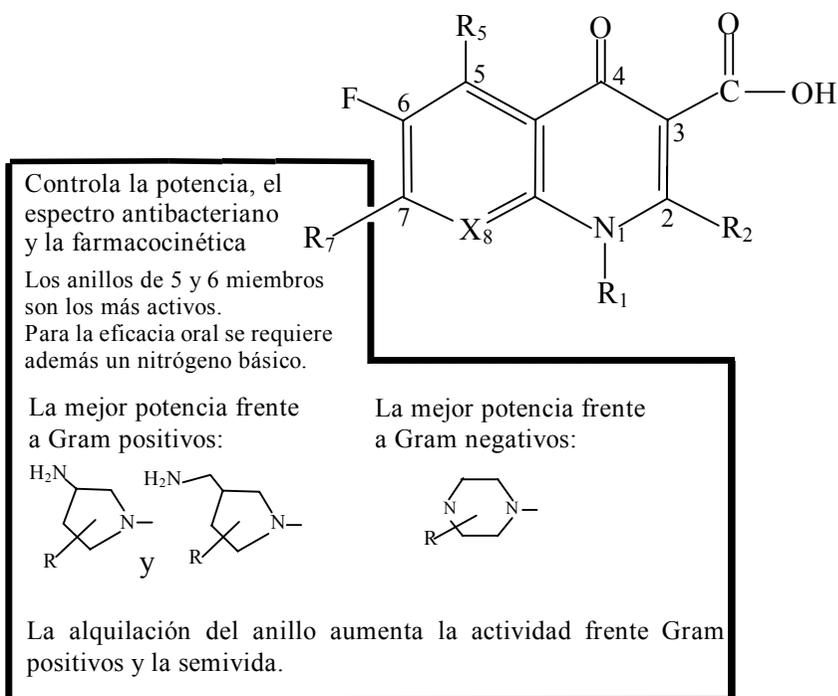


Figura 4.1. Fragmento de la Figura 1.11.

## Discusión 240

Este hecho ha sido comprobado en el presente trabajo, puesto que los derivados han demostrado mantener o aumentar su actividad en estos microorganismos, destacando el caso particular de *Staphylococcus aureus*, en el que la actividad se mejora.

### 4.2.3. Heterólogos

La media geométrica y la concordancia de los compuestos heterólogos ensayados con respecto al ciprofloxacino se muestran en los Cuadros 4.5 y 4.6, respectivamente.

Microorganismo	MEDIA GEOMÉTRICA					
	CIP	GRX	OFX	FLQ	SAR	SPA
<i>Escherichia coli</i>	<b>0,014</b>	0,025	0,063	0,969	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,378	<b>0,058</b>	0,354	1,072	-	-
<i>Achromobacter spp.</i>	2,619	<b>2,333</b>	4,000	34,562	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0,037	0,014	0,082	-	0,038	<b>0,011</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,305	<b>0,073</b>	0,276	1,179	-	-
SCN	0,155	<b>0,046</b>	0,268	4,438	0,139	0,074
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,637	<b>0,248</b>	1,625	4,438	1,464	0,377
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,554	<b>0,210</b>	1,328	-	1,587	0,372

SCN: *Staphylococcus* coagulasa negativos

**Cuadro 4.5.** Medias geométricas del ciprofloxacino y los compuestos heterólogos para las cepas ensayadas.

Según el criterio adoptado, la actividad del **grepafloxacino** coincide con la del ciprofloxacino en el 79,6% del total de las cepas ensayadas, aunque el resto se debe a una mayor actividad de este compuesto, ya que el 17,6% y 2,8% del total de las cepas tuvieron una CMI 8 ó 16 veces menor que las del patrón, respectivamente.

Si se utiliza un criterio de concordancia más restrictivo ( $\pm 1 \log_2$ ) el porcentaje de similitud total es del 43,1%, pero de nuevo la diferencia hasta el 100% se debe a una mejor actividad del grepafloxacino en todos los microorganismos ensayados, a excepción de *E. coli* en el que la concordancia es del 75%.

Comparando las medias geométricas de las CMIs, se observa que la del grepafloxacino es inferior a la del ciprofloxacino en todos los microorganismos estudiados a excepción de *E. coli*.

De todo esto se resume que el grepafloxacino es más activo que el patrón en todos los microorganismos estudiados a excepción de *E. coli*, en el que la actividad de ambos compuestos es similar.

El **ofloxacino** presenta una actividad muy similar a la del ciprofloxacino, siendo la concordancia del 100% en todas las especies estudiadas a excepción de *E. coli* en el que es de 60%. Si se utiliza el criterio de  $\pm 1 \log_2$  la concordancia total disminuye a 79,8%.

Por otro lado, la media geométrica del ofloxacino es ligeramente inferior a la del ciprofloxacino en *A. calcoaceticus*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*, por lo que su actividad es algo mayor a la del patrón en estos microorganismos. En los SCN es similar, es claramente inferior en *E. coli*, y dependiendo del criterio adoptado es mayor o menor en *Achromobacter spp.*, *M. catarrhalis* y *E. faecalis*.

**Discusión 242**

Microorganismo	GRX		OFX		FLQ		SAR		SPA	
	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$	$\pm 2 \log_2$	$\pm 1 \log_2$
<i>Escherichia coli</i>	100%	75%	60%	15%	0%	0%	-	-	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	35% 65% (-3 log <sub>2</sub> )	0% 35% (-2 log <sub>2</sub> ) 65% (-3 log <sub>2</sub> )	100%	100%	95%	55%	-	-	-	-
<i>Achromobacter spp.</i>	100%	100%	100%	83,3%	5,6%	5,6%	-	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	95% 5% (-3 log <sub>2</sub> )	60% 35% (-2 log <sub>2</sub> ) 5% (-3 log <sub>2</sub> )	100%	80%	-	-	100%	90% 5% (-2 log <sub>2</sub> )	90% 5% (-3 log <sub>2</sub> ) 5% (-4 log <sub>2</sub> )	35% 55% (-2 log <sub>2</sub> ) 5% (-3 log <sub>2</sub> ) 5% (-4 log <sub>2</sub> )
<i>Staphylococcus aureus</i>	90% 10% (-3 log <sub>2</sub> )	10% 80% (-2 log <sub>2</sub> ) 10% (-3 log <sub>2</sub> )	100%	100%	95%	10%	-	-	-	-
SCN	80% 20% (-3 log <sub>2</sub> )	35% 45% (-2 log <sub>2</sub> ) 20% (-3 log <sub>2</sub> )	100%	100%	0%	0%	100%	100%	100%	80% 20% (-2 log <sub>2</sub> )
<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	65% 35% (-2 log <sub>2</sub> )	100%	60%	35%	0%	100%	80%	100%	95% 5% (-2 log <sub>2</sub> )
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	36,4% 40,9%(-3log <sub>2</sub> ) 22,7%(-4log <sub>2</sub> )	0% 36,4%(-2log <sub>2</sub> ) 40,9%(-3log <sub>2</sub> ) 22,7%(-4log <sub>2</sub> )	100%	100%	-	-	100%	100%	58,3% 41,7%(-3 log <sub>2</sub> )	8,3% 58,3%(-2 log <sub>2</sub> ) 41,7%(-3 log <sub>2</sub> )
<b>% total</b>	79,6% 17,6%(-3log <sub>2</sub> ) 2,8%(-4 log <sub>2</sub> )	43,1% 33,3%(-2log <sub>2</sub> ) 17,6%(-3log <sub>2</sub> ) 2,8%(-4 log <sub>2</sub> )	95%	79,8%	28,8%	8,8%	100%	87,1% 11,7%(-3log <sub>2</sub> ) 1,3%(-4 log <sub>2</sub> )	54,6% 34,6%(-2log <sub>2</sub> ) 11,7%(-3log <sub>2</sub> ) 1,3%(-4 log <sub>2</sub> )	43,2%

SCN: *Staphylococcus coagulasa* negativos

**Cuadro 4.6.** Porcentaje de concordancia de los compuestos heterólogos con respecto a ciprofloxacino.

El **flumequino** es el compuesto que muestra peor actividad, con un porcentaje de concordancia total de 28,8%, ó 8,8% según el criterio escogido, aunque es del 95% con el criterio más permisivo en *A. calcoaceticus* y *S. aureus*. Por otro lado, la media geométrica es mayor a la del ciprofloxacino en todos los microorganismos. De este modo, se puede afirmar que la actividad del flumequino es inferior para todas las especies ensayadas.

El **sarafloxacino** también presenta una actividad muy similar a ciprofloxacino, siendo la concordancia del 100% en el total de las cepas ensayadas. Si se utiliza el criterio de  $\pm 1 \log_2$  la concordancia total disminuye a 92,5% pero un 1,25% del total se debe a una diferencia de dos diluciones menor en *M. catarrhalis*. Sólo la media geométrica del sarafloxacino en los SCN es ligeramente inferior a la del ciprofloxacino.

En resumen, la actividad de este compuesto coincide con la del ciprofloxacino en todas las cepas estudiadas a excepción de *E. faecalis*, que es menor o igual según el criterio elegido.

Por último, el **esparfloxacino**, presenta una concordancia total de 87,1% y 54,6% según ambos criterios, pero se debe a una mayor actividad. Lo mismo se observa al comparar las medias geométricas de las CMI's que en todos los casos es inferior a la del ciprofloxacino. Su actividad es pues, mayor a la del compuesto de referencia.

Como conclusión, el grepafloxacino es el compuesto más activo de entre los heterólogos estudiados, siendo el que presenta la mayor actividad frente a todos los microorganismos ensayados a excepción de las especies *E. coli*, para la que el ciprofloxacino continúa siendo el más activo y *M.*

*catarrhalis* para la que la actividad del esparfloxacino es mayor. El flumequino es el compuesto menos activo de todos y ofloxacino y sarafloxacino presentan una actividad muy similar a la del ciprofloxacino.

En resumen, los parámetros de actividad obtenidos para los heterólogos proveen una escala coherente con los datos de la bibliografía. Este hecho confirma la validez del método utilizado para la interpretación de los resultados en lo que respecta a la actividad.

#### **4.3. CURVAS DE LETALIDAD EN *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Las investigaciones iniciales sobre cualquier antimicrobiano y por ello, de las quinolonas, comienzan con las determinaciones de la CMI. Este procedimiento, aunque conveniente y bien establecido, se trata de un parámetro estático pues permite comparaciones entre distintas sustancias respecto a su capacidad de inhibir la multiplicación de las bacterias, pero no refleja la actividad bactericida. Por ello, con fármacos bactericidas como las quinolonas, es importante caracterizar esta actividad. Un método utilizado comúnmente para establecer la actividad bactericida es el estudio de las curvas de letalidad a concentraciones múltiples de la CMI del fármaco.

Las curvas de letalidad proporcionan información dinámica sobre el crecimiento y la letalidad de los microorganismos, parámetros importantes en clínica, sobre todo en infecciones tales como endocarditis, meningitis, osteomielitis, en las que es importante que el antibiótico sea bactericida y que

la acción sea rápida. Sin embargo, este método plantea un problema debido a que la comparación entre fármacos de las gráficas generadas por los datos obtenidos tras el estudio no es rápido ni fácil.

Se ha seleccionado como paradigma un microorganismo, *Staphylococcus aureus*, y los compuestos de ambas series que demostraron ser más activos frente a este microorganismo con el fin de establecer la existencia de diferencias en cuanto a letalidad por adición de radicales alquílicos en posición 4'N al ciprofloxacino y, de este modo, proporcionar información dinámica y adicional a las CMI.

#### **4.3.1. Elección del modelo para el ajustado de las curvas de letalidad: justificación**

Una vez determinadas las ufc/ml en cada tiempo y concentración según el procedimiento descrito en el epígrafe 2.4.3, se busca la función matemática que mejor se ajusta a los datos experimentales con el fin de determinar el tipo de cinética y poder estimar la constante de letalidad. Los antibióticos pueden mostrar distintas cinéticas, de las cuales las más frecuentes son la monoexponencial, y la biexponencial o bifásica, cuyas ecuaciones han sido descritas con anterioridad.

En nuestro caso se procedió al ajustado de las curvas de letalidad para cada antibiótico según ambas cinéticas. La monoexponencial dio mejores resultados cualquiera que fuera el método para compararlas: coeficiente de correlación, precisión de parámetros, F de Snedecor y criterio de Akaike. Los dos últimos de hecho penalizan el incremento del número de parámetros que introduce la ecuación biexponencial.

## Discusión 246

Se eligió utilizar los logaritmos de las ufc/ml puesto que al ser números mucho menores el ajustado es en gran medida más fiable, conclusión a la que se llegó tras comparar los parámetros utilizados como criterios para medir la bondad del ajustado.

No obstante se pueden emplear los logaritmos neperianos o decimales de las ufc/ml. Aunque en la mayoría de los trabajos revisados se emplean estos últimos, se ha seleccionado los logaritmos neperianos de las ufc/ml como variable dependiente porque, de este modo, el valor de la pendiente de la recta proporciona directamente la constante de velocidad de letalidad y no es necesario corregirla por el factor 2,303 para obtener su valor.

Por otro lado, gráficamente parece observarse un período de latencia a la CMI, por lo que se ensayó el ajustado monoexponencial incluyendo un nuevo término,  $t_0$ , que permite estimar su duración. No se encontraron diferencias significativas en la bondad del ajustado, y dado que conlleva la pérdida de un grado de libertad, este modelo no se consideró adecuado.

En última instancia se procedió al ajustado conjunto de todas las concentraciones ensayadas para cada quinolona. Este modelo resultó ser el más ventajoso ya que representa un notable incremento de los grados de libertad. De hecho, conlleva una menor desviación estándar de los parámetros. Ésta constituye un buen indicador de la fiabilidad del ajustado, ya que expresa la precisión con la que se ha estimado los parámetros.

Este modelo proporciona una suma de cuadrados, SC, para todo el ajustado conjunto, aunque se puede calcular de forma individualizada para cada concentración. Al comparar la SC según el modelo conjunto para cada concentración con el individual, ésta fue inferior, por lo que el ajustado se considera más fiable.

La representación gráfica de los valores residuales frente a los valores predichos de la variable dependiente nos permite medir la dispersión de los mismos que, en esta ocasión, es mayor con el ajustado simultáneo; sin embargo con el modelo individual se obtienen 6 residuales más. En ambos casos la distribución de los puntos es totalmente aleatoria y no muestra tendencia a la ordenación.

Por todo ello, se eligió como la función matemática que mejor se ajusta a los datos experimentales la ecuación de la cinética monoexponencial utilizando un modelo de regresión lineal del ajustado conjunto de los logaritmos neperianos de las ufc/ml para todas las concentraciones ensayadas de cada antibiótico estudiado frente al tiempo (epígrafe 3.2 de Resultados).

#### **4.3.2. Estudio comparativo de las curvas de letalidad en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

De modo general, para las cuatro quinolonas ensayadas, a  $\frac{1}{4}$  CMI no se observa letalidad; de hecho, la cinética de crecimiento es paralela al control. En todos los antibióticos a excepción de 4'-N-metilciprofloxacino, a la CMI parece observarse gráficamente un periodo de latencia antes de iniciar la acción bactericida, que no puede demostrarse desde el punto de vista matemático. A partir de la CMI la letalidad aumenta con la concentración y el tiempo de incubación.

En este aspecto, se sabe que las quinolonas muestran cinéticas de letalidad dependientes de la concentración, alcanzando la constante de letalidad máxima a la concentración bactericida óptima (203) que, para las quinolonas más recientes tiene lugar cerca de 8 veces su CMI (100). A partir

de este máximo, la actividad disminuye al incrementar la concentración, fenómeno que se conoce, como ya se ha comentado, como efecto paradójico o efecto Eagle. Con el fin de investigar la posible existencia de este efecto se realizó un análisis de varianza de las constantes de letalidad con la concentración de la sustancia como factor, seguido de una prueba de Scheffé ( $\alpha=0,05$ ) cuando fue pertinente.

Los resultados obtenidos sobre *S. aureus* muestran que en todos los antibióticos a excepción de 97-101, la concentración de  $\frac{1}{4}$  CMI no modifica la cinética de crecimiento respecto al control y sus pendientes no son estadísticamente diferentes. A partir de la CMI, la letalidad aumenta significativamente con la concentración hasta 16 CMI en 4'-N-etilciprofloxacino ó 4 CMI en los demás compuestos. Ésta, pues, es la concentración bactericida óptima, lo que concuerda con lo publicado para otras quinolonas (100). Además, en ciprofloxacino y 97-101 se observa que entre 4 y 16 CMI no hay diferencias significativas. En 4'-N-metilciprofloxacino 4, 16 y 64 CMI son estadísticamente el mismo resultado y en 4'-N-etilciprofloxacino tampoco existen diferencias entre 16 y 64 CMI. A partir de las concentraciones indicadas para cada antibiótico, la letalidad disminuye de forma significativa confirmándose así el efecto paradójico también para las quinolonas en estudio. Para el 4'-N-etilciprofloxacino el efecto paradójico observado fue menor que para el resto de compuestos ensayados.

Por otro lado, en la bibliografía (100) existen datos sobre el tiempo que necesitan las fluoroquinolonas para disminuir la viabilidad tres logaritmos, o lo que es lo mismo, el tiempo en que la concentración es

bactericida (210), que depende del grupo de bacterias que se considere. Así las fluoroquinolonas matan las bacterias Gram negativas más rápidamente que los *Staphylococcus sp.*, siendo este tiempo de 1,5 h para *Enterobacteriaceae*, de 4 a 6 h para *Staphylococcus sp.* y mayor o igual a 6 h para *Streptococcus sp.* y *Enterococcus sp.* (100).

Los resultados obtenidos con las quinolonas en estudio son coherentes con los hallados en la bibliografía, puesto que ninguna concentración ensayada es bactericida en un tiempo inferior a cuatro horas y sólo las concentraciones 16 y 64 CMI de 4'-N-etilciprofloxacino y 4 CMI de 97-101 son bactericidas en ese tiempo.

Se ha profundizado también en las diferencias en la letalidad de estos antibióticos, mediante la comparación entre las constantes de letalidad de las cuatro quinolonas en estudio sobre *S. aureus* ATCC 25923 manteniendo fija la concentración de antibiótico ensayada. Los resultados del análisis de varianza y la prueba de Scheffé ( $\alpha=0,05$ ) que se presentan en el Cuadro 3.28 son, no obstante, poco informativos. Muestran que la mayor o menor velocidad de letalidad que manifiestan los distintos antibióticos no sigue ningún patrón claro respecto a la CMI. Se debe recurrir, pues, a la concentración absoluta de estudio para comparar el poder relativo de las quinolonas. De hecho, la CMI difiere para cada antibiótico.

Además, si se compara la concentración bactericida óptima de las cuatro quinolonas en términos absolutos se comprueba que si para ciprofloxacino esta concentración es 1 y 4  $\mu\text{g/ml}$ , puesto que no existen diferencias significativas entre 4 y 16 CMI, en sus derivados es normalmente inferior. Concretamente es 0,25, 1 y 4  $\mu\text{g/ml}$  para 4'-N-metilciprofloxacino, 1 y 4  $\mu\text{g/ml}$  para 4'-N-etilciprofloxacino y 0,5 y 2  $\mu\text{g/ml}$  para 97-101.

La representación gráfica de las constantes en ordenadas frente a la concentración en abscisas, proporciona un análisis muy ilustrativo de estos resultados que permite visualizar tanto la concentración bactericida óptima como el efecto paradójico. En la Figura 4.2 se muestran estas gráficas con las quinolonas en estudio tanto con concentraciones relativas a la CMI como absolutas.

En resumen, se ha establecido que la dinámica de crecimiento y letalidad que provocan los homólogos del ciprofloxacino es la misma que su patrón en este microorganismo, puesto que la letalidad depende de la concentración, siguen la misma cinética bactericida y muestran un efecto paradójico similar.

El antibiótico que presenta mayor velocidad de letalidad es el 97-101, pues resulta bactericida a las cuatro horas de ensayo con la concentración de 0,5 µg/ml. El 4'-N-etilciprofloxacino necesita 1 µg/ml para ser bactericida en ese tiempo. Esto sugiere que el grupo metilo adicional que presenta el derivado 97-101 en posición 3' con respecto a ciprofloxacino y los compuestos de la otra serie, pudiera ser responsable de su mayor letalidad debido a un posible cambio en la diana principal de acción frente a *S. aureus*.

Este hecho se ha descrito con anterioridad para grepafloxacino y ciprofloxacino en *S. pneumoniae*, que actúan sobre la girasa y topoisomerasa IV, respectivamente. Conviene recordar que la selección de la girasa como primera diana por parte de las quinolonas se asocia con un aumento en la velocidad de letalidad. Curiosamente, los únicos radicales que diferencian al grepafloxacino del ciprofloxacino son dos grupos metilo en posición 5 y 3'. Si se cambia el grupo metilo del grepafloxacino de la posición 5 a la 4'-N se obtiene la estructura del derivado 97-101.

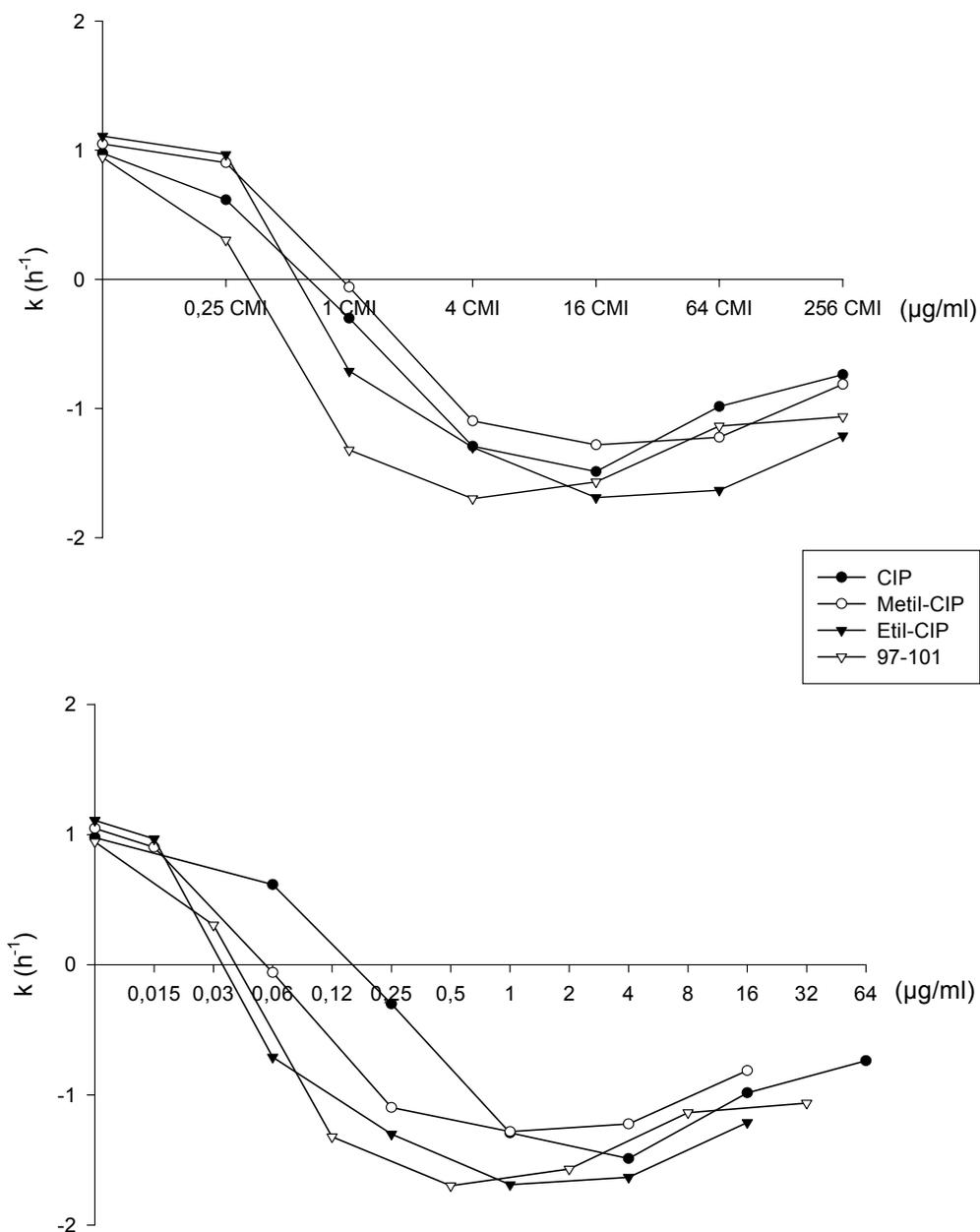


Figura 4.2. Representación gráfica de las constantes de letalidad frente a la concentración tanto relativa a la CMI (gráfica superior) como absoluta (gráfica inferior) de las cuatro quinolonas en estudio.

Para comprobar esta teoría se ensayó la CMI con cepas que presentaban mutaciones en las QRDR. Los resultados demostraron que tanto el ciprofloxacino como sus derivados, incluido el 97-101, seleccionan como primera diana a la topoisomerasa IV en *S. aureus*, es decir, no se producen cambios en la selección de la diana intracelular. Sin embargo, cabe la posibilidad de que la formación del complejo ternario quinolona-ADN-topoisomerasa IV se produzca a una concentración inferior con este homólogo, o que la afinidad del derivado por la enzima sea mayor. Ambas hipótesis se estudiarán en trabajos posteriores.

#### **4.4. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD**

Los parámetros de las correlaciones están expuestos matemáticamente en los cuadros situados en la parte inferior de las Figuras 3.29 a 3.36 en sus tres vertientes. En estas mismas figuras se exponen gráficamente las obtenidas para todas las quinolonas ensayadas en conjunto, en tanto que en la Figura 3.37 y en la Figura 3.38 se exponen gráficamente las halladas para las series A y B, respectivamente.

Como se observa, todos los lotes de datos (Cuadros 3.29 y 3.30), en todas las especies ensayadas, admiten el tratamiento bilineal (122, 156-159, 241). El análisis de las correlaciones se ha realizado según los métodos expuestos en el apartado correspondiente del capítulo 2. No se han considerado factores modificadores estéricos o electrónicos como variables independientes debido a la similitud estructural de los compuestos ensayados.

Hay que indicar también que los heterólogos estudiados se han empleado para la validación externa de la correlación y para la interpretación de determinados aspectos del trabajo.

#### **4.4.1. Calidad y alcance práctico de la correlación**

En general, las correlaciones halladas para el conjunto de todas las quinolonas son las que poseen peores parámetros estadísticos en uno u otro sentido. Algunas de ellas son deficientes en lo que se refiere a su capacidad predictiva (valores  $r$ , última fila) o por la variación porcentual de los parámetros de las curvas (coeficientes, sobre todo), que suele ser elevada y hace estadísticamente insegura la validez del modelo elegido, pese a ser comparativamente mejor para todas las especies microbianas seleccionadas (excepto *E. faecalis*), que otros modelos. Pueden aducirse varias razones para intentar explicar estas anomalías.

##### 4.4.1.1. Heterogeneidad y dispersión de datos

Las sustancias ensayadas son homólogas desde el punto de vista químico pero no son equivalentes; es decir, su actividad, elemento por elemento, puede diferir para las especies microbianas ensayadas. Ello se traduce en una dispersión de resultados en la escala de ordenadas que acarrea una elevada desviación estándar de los parámetros de las curvas siempre que se utilizan para establecer la correlación todos los compuestos disponibles.

De hecho, para algunas especies estudiadas (por ejemplo, *Achromobacter spp.*, Figura 3.31), las series A y B forman conjuntos claramente diferentes con niveles de actividad relativamente homogéneos

para cada serie pero distintos entre ambas. Es obvio que, en estas condiciones, la dispersión de los datos aumenta. Sin embargo, conviene aquí reseñar que, considerando las características de la expresión bilineal y los errores de ajustado a los que se presta, se considera aceptable por autores importantes una desviación de hasta el 50% en los parámetros (302).

En lo que atañe a la bondad del ajustado, que define la capacidad predictiva de la ecuación y medible por el coeficiente de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo, también la dispersión puede influir de forma importante. Obsérvese que los valores  $r$  hallados para el conjunto de todas las quinolonas son estadísticamente significativos (Cuadro 4.7).

#### 4.4.1.2. Número de datos experimentales

La ecuación de funcionamiento bilineal posee cuatro parámetros: dos coeficientes ( $L$  y  $R$ ) y dos exponentes ( $m$  y  $n$ ). Se precisan por este motivo al menos cinco puntos para su aplicación práctica, lo que supone un grado de libertad.

En general, cuando existen pocos puntos pero definen bien la correlación, se obtienen, entre valores experimentales y teóricos, coeficientes de correlación  $r$  muy elevados y estadísticamente análogos o superiores incluso a los obtenidos para series con gran número de elementos o candidatos a fármacos. Buenos ejemplos son, a excepción de *E. coli* en la serie A, los hallados en este trabajo para las series A y B.

En realidad, la existencia de un número limitado de datos se transforma en un problema muy importante cuando faltan puntos experimentales para definir un tramo concreto de la correlación. En estos

casos, no se puede estimar un máximo y se obtiene una recta doble logarítmica que no es más que un artefacto matemático, funcional para algunos elementos de la serie (medios y bajos por lo general), pero carente de sentido desde un punto de vista global.

Especies seleccionadas	Ambas series		Serie A		Serie B	
	r	p	r	p	r	p
<i>Escherichia coli</i>	0,955	<0,0001	0,949	0,0137	0,996	<0,0001
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,952	<0,0001	0,989	0,0013	0,991	0,0001
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,949	<0,0001	0,999	<0,0001	0,961	0,0019
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,920	0,0002	0,988	0,0015	0,985	0,0003
SCN	0,915	0,0002	0,936	0,0193	0,998	<0,0001
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0,890	0,0006	0,990	0,0011	0,945	0,0044
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,873	0,0010	0,998	0,0001	0,969	0,0014
<i>Achromobacter spp.</i>	0,860	0,0014	0,995	0,0004	0,983	0,0004

SCN: *Staphylococcus* coagulasa negativos

**Cuadro 4.7.** *Coefficientes de correlación entre actividades antibacterianas determinadas experimentalmente y predichas por el modelo de las quinolonas ensayadas en las especies seleccionadas, acompañados de sus correspondientes probabilidades (p) y ordenadas según su potencia frente a todas las quinolonas en conjunto.*

#### 4.4.1.3. Distribución de los datos

En la serie o series utilizadas existe un número de quinolonas muy desigual a uno y otro lado de la gráfica representativa de la correlación estructura-actividad. En su parte izquierda, por debajo del valor  $P=1$ , en la escala de abscisas aparecen, como máximo, dos elementos que son también los cabezas de serie: ciprofloxacino y 3'metilciprofloxacino. Los ocho restantes se alinean a la derecha de la gráfica, en la zona de valores comprendida entre 1 y 100. Ello hace difícil, en muchos casos, definir con claridad la rama izquierda de la curva en el modelo bilineal.

Esta dificultad se agudiza cuando se emplean para establecer las correlaciones estructura-actividad las series A o B por separado, puesto que estadísticamente sólo existe un grado de libertad y sólo se sitúa un elemento a la izquierda de la gráfica. En la práctica, sin embargo, no siempre aparece este problema.

Parece que el efecto que produce la desigual distribución de los datos experimentales resulta, en la práctica, menos importante que el de la dispersión de los mismos, ya que las desviaciones estándar de los parámetros son siempre mucho menores que para el conjunto de todas las quinolonas ensayadas y los coeficientes de correlación obtenidos ( $r$ , así como la inclinación  $b$  y la ordenada en origen  $a$ ) se traducen en una mayor capacidad predictiva para las ecuaciones correspondientes.

#### 4.4.1.4. Errores experimentales y otros factores modificadores

No puede descartarse nunca la influencia de la variabilidad inherente a cualquier ensayo biológico en los resultados.

Por otro lado, hay que señalar que algunos compuestos (tanto homólogos como heterólogos) poseen en su molécula ciertas configuraciones estructurales de carácter estérico, electrónico o mixtas que pueden modificar su comportamiento respecto a los restantes en el sentido de aumentar o disminuir su CMI prevista o esperada. A veces son muy difíciles de caracterizar y no es raro que se tomen como errores experimentales; en realidad, habría que introducir la variable correspondiente a este efecto si se desea mantener una buena correlación. Precisamente éste es uno de los problemas en la obtención e interpretación de las correlaciones estructura-actividad: el número de variables a utilizar. En nuestro caso la selección de la lipofilia ya se ha justificado (31, 120-122, 137, 157, 159, 241, 301, 317) pero conlleva en ocasiones a alguna imprecisión.

#### **4.4.2. Capacidad predictiva**

Las correlaciones estructura-actividad descritas hasta aquí son, sin duda, estadísticamente aceptables. Ello se confirma no obstante, mediante la validación externa de la correlación. Para ello se han seleccionado cuatro quinolonas: sarafloxacino, esparfloxacino, ofloxacino y grepafloxacino (esta última retirada del mercado en 1999 (10) pero útil para fines especulativos como el que ahora se persigue).

Los valores experimentales de partida se exponen en el Cuadro 3.31. Todos los heterólogos presentan, en todos los casos, un comportamiento homogéneo respecto a los compuestos de ambas series, lo que confirma la bondad de las correlaciones establecidas o, por lo menos, permite suponer con gran probabilidad que existe. Dicho comportamiento ha intentado plasmarse en la Figura 4.3.

En efecto, para todas las especies ensayadas, el ofloxacino, claramente hidrófilo ( $P=0,43\pm 0,03$ ) se sitúa siempre por debajo de la línea representativa de la correlación y no se aleja sensiblemente de ella en ninguna de las especies ensayadas. Dicho de otro modo, su actividad se predice con un error muy bajo en algunos casos (*S. pneumoniae* y *S. aureus*, por ejemplo), en tanto que en otros presenta valores algo mayores, como con *A. calcoaceticus*, *M. catarrhalis* y *E. coli*. Por su parte, el grepafloxacino, más lipófilo ( $P=3,31\pm 0,05$ ) se sitúa siempre por encima de la línea representativa de la correlación. En algunas especies, como *Achromobacter spp.*, *A. calcoaceticus* y *S. aureus*, el error de predicción es muy pequeño, (3,43, 27,94 y 37,24%, respectivamente) mientras que en otros casos presenta valores proporcionalmente más altos, es decir, es más activo, como ocurre con los SCN, *M. catarrhalis*, *E. faecalis* y, sobre todo *S. pneumoniae* (que merecería estudio ulterior).

De igual modo, el sarafloxacino y el esparfloxacino, presentan el mismo comportamiento en los cuatro microorganismos en los que se han ensayado. El sarafloxacino, más hidrófilo ( $P=0,337\pm 0,03$ ) se sitúa siempre por debajo de la línea representativa de la correlación, como ocurre con el ofloxacino. Mientras, el esparfloxacino, más lipófilo ( $P=1,165\pm 0,095$ ) se sitúa siempre, a semejanza del grepafloxacino, por encima de la línea representativa de la correlación.

En lo que se refiere a la validación externa de la correlación, el error de predicción de los heterólogos oscila entre 3,43 y 306,85% (Cuadro 4.8). En concreto, por ejemplo para el grepafloxacino, se obtiene un error entre 3,43 y 37,24% según la especie considerada, lo que, en términos de actividad, corresponde a la misma dilución de CMI. Para otras especies oscila entre

72,84 y 125,60% lo que equivale a una dilución  $\log_2$  de diferencia. En *S. pneumoniae* y *E. faecalis*, sin embargo, el error de predicción es mayor, 306,85% y 187,33%, respectivamente, lo que equivale a una diferencia de una a dos diluciones de CMI, que en términos de actividad se considera no significativo. Respecto al ofloxacino, el error de predicción está comprendido entre 26,72% y 73,79%, que en términos de CMI equivale, al igual que para el grepafloxacino, a una desigualdad de una a dos diluciones, es decir, las diferencias no son significativas. Esto mismo se observa con el sarafloxacino y el esparfloxacino cuyo error de predicción en los microorganismos ensayados oscila entre 19,68% y 56,58% para el sarafloxacino, y entre 37,25% y 130,50% para el esparfloxacino, lo que, en términos de actividad, corresponde aproximadamente a la misma o a una dilución  $\log_2$  de diferencia; que se considera no significativo.

Estos resultados confirman, pese a la elevada dispersión y a las desviaciones que ésta produce en los parámetros de las curvas, la capacidad predictiva del modelo bilineal propuesto.

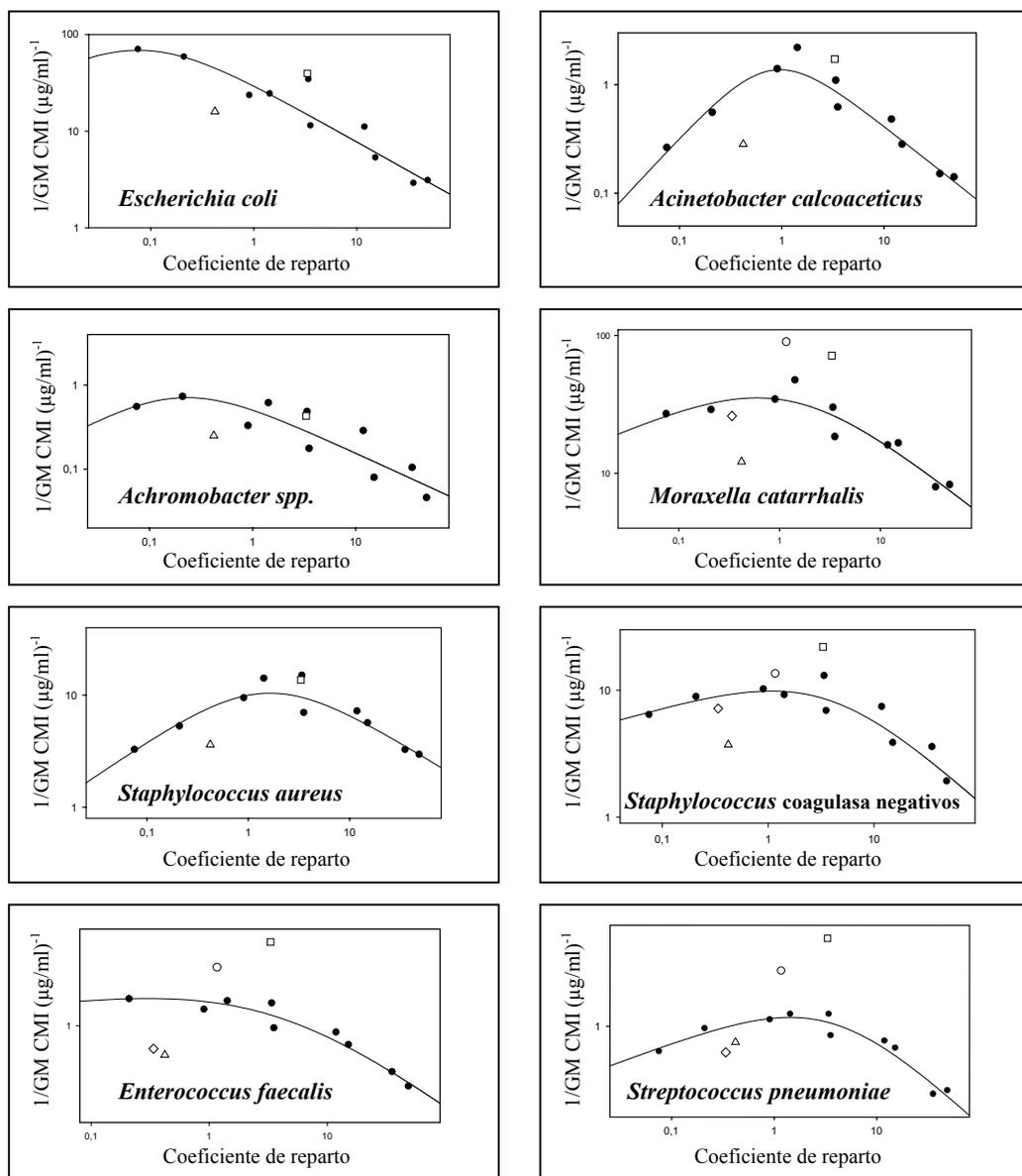
#### 4.4.3. Óptimos de lipofilia ( $P_0$ )

En el Cuadro 4.9 se recogen los valores de  $P_0$  obtenidos para las diferentes curvas representativas de la correlación estructura-actividad y reseñados en las Figuras 3.29 a 3.36. En la tabla se observa claramente que con una sola excepción (la de *Enterococcus faecalis*), existe una tendencia a generar valores  $P_0$  más bajos -y, por consiguiente, más hidrófilos- por parte de las especies Gram negativas, y más altos, en cambio -es decir, más lipófilos- por parte de las especies Gram positivas.

Discusión 260

<b>Especies seleccionadas</b>	<b>Heterólogo</b>	<b>Error predicción (%)</b>	<b>MG<sub>teor</sub>/MG<sub>exp</sub></b>	<b>Diluciones ±log<sub>2</sub></b>
<i>Escherichia coli</i>	GRX	72,84	1,728	+0,9
	OFL	64,34	0,357	-1,4
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	GRX	27,94	1,279	+0,6
	OFL	73,79	0,262	-1,9
<i>Achromobacter spp.</i>	GRX	3,43	1,034	+0,5
	OFL	62,41	0,376	-1,3
<i>Moraxella catarrhalis</i>	GRX	121,34	2,213	+1,1
	OFL	65,11	0,349	-1,4
	SAR	23,90	0,761	-0,7
	SPA	167,03	2,670	+1,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	GRX	37,24	1,372	+0,7
	OFL	53,27	0,467	-1,1
<i>Staphylococcus coagulasa negativos</i>	GRX	125,60	2,256	+1,1
	OFL	59,58	0,404	-1,2
	SAR	19,68	0,803	-0,6
	SPA	37,25	1,373	+0,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	GRX	187,33	2,873	+2,0
	OFL	60,73	0,393	-0,7
	SAR	56,58	0,434	-1,2
	SPA	81,59	1,816	+0,9
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GRX	306,85	4,068	+1,4
	OFL	26,72	0,733	-1,3
	SAR	35,96	0,640	-0,8
	SPA	130,50	2,305	+1,2

**Cuadro 4.8.** Error de predicción de los heterólogos utilizados para la validación externa de la correlación y su equivalencia en términos de actividad.  $MG_{exp}$  y  $MG_{teor}$  corresponden a la media geométrica de las CMI's experimentales y teóricas, respectivamente.



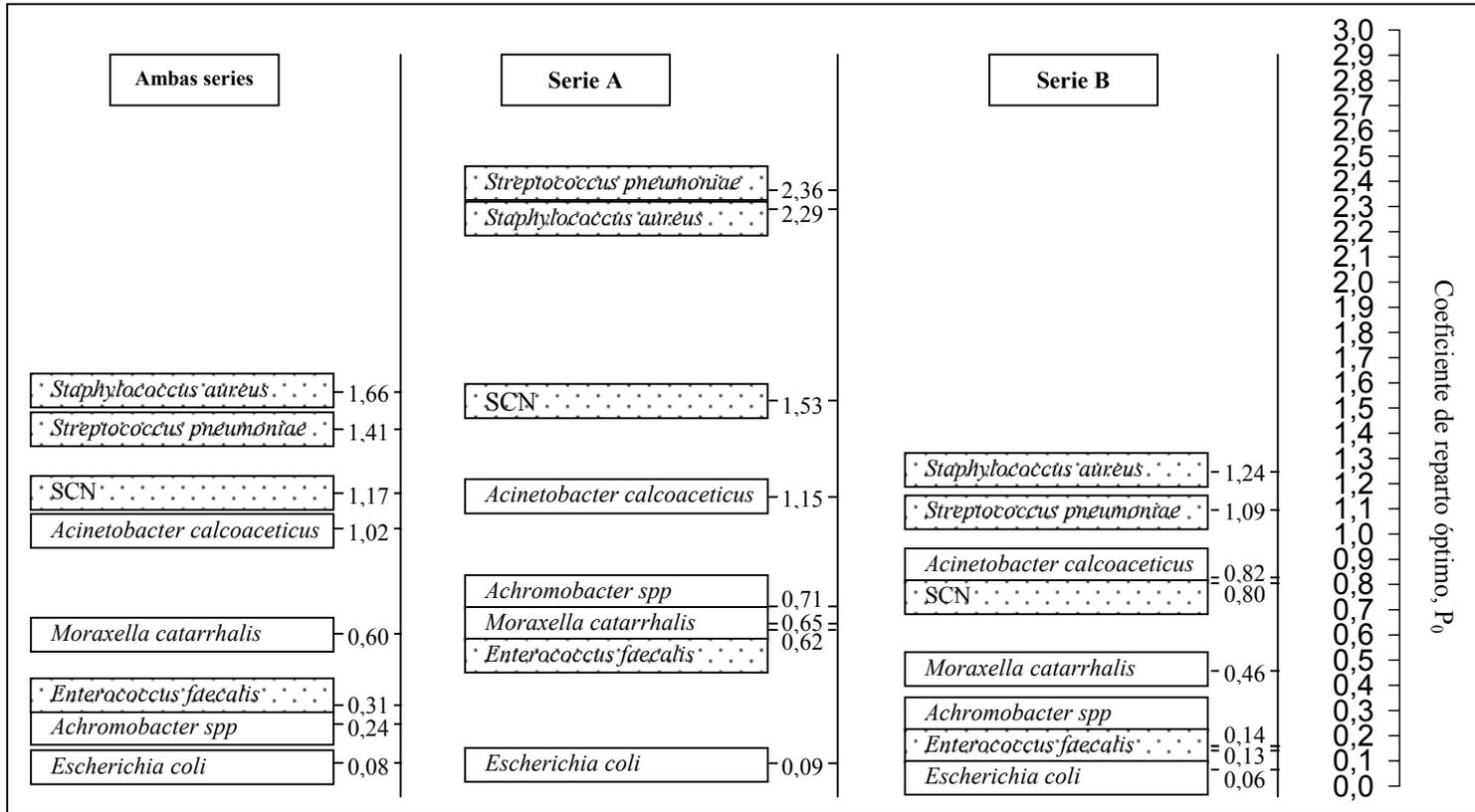
**Figura 4.3.** Situación de grepafloxacino (□), ofloxacino (△), sarafloxacino (◇) y esparfloxacino (○) en la gráfica representativa de la correlación estructura-actividad establecida para cada especie. Su posición es básicamente igual en todos los casos, confirmando así la bondad y la funcionalidad de las correlaciones obtenidas en nuestras condiciones de trabajo.

**Discusión 262**

<b>Especies ensayadas</b>	<b>Todos</b>	<b>Serie A</b>	<b>Serie B</b>
<i>Escherichia coli</i>	0,08	0,09	0,06
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1,02	1,15	0,82
<i>Achromobacter spp.</i>	0,24	0,71	0,14
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0,60	0,65	0,46
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,66	2,29	0,24
<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos	1,17	2,94	0,80
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,31	0,62	0,13
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,41	2,36	1,09

**Cuadro 4.9.** Valores  $P_0$  (óptimos de lipofilia) obtenidos para las quinolonas ensayadas, tanto en los ensayos realizados con todas las disponibles como en los correspondientes a las series A y B.

Como se indica en la Figura 4.4, existe tendencia a la separación entre las especies Gram positivas y Gram negativas, al menos para las seleccionadas en el presente trabajo, con la excepción de *E. faecalis*. Esta zona es, no obstante, muy estrecha, y está comprendida, para fines prácticos, entre 1,02 y 1,17, valores correspondientes a SCN y *A. calcoaceticus*, respectivamente.



**Figura 4.4.** Valores óptimos de lipofilia ( $P_0$ ) hallados para las quinolonas en estudio frente a las especies ensayadas sobre una escala común útil para fines comparativos. Obsérvese que  $P_0$  tiende a ser más bajo para las especies Gram negativas  que para las Gram positivas .

## Discusión 264

Si se considera únicamente las quinolonas de la serie A, esta tendencia se acentúa y se define mucho más claramente, de modo que, si se utilizan los datos expuestos en el Cuadro 4.9, la separación entre Gram positivos y Gram negativos se ensancha, situándose entre 1,15 (primer Gram negativo, *A. calcoaceticus*) y 1,53 (SCN, último Gram positivo).

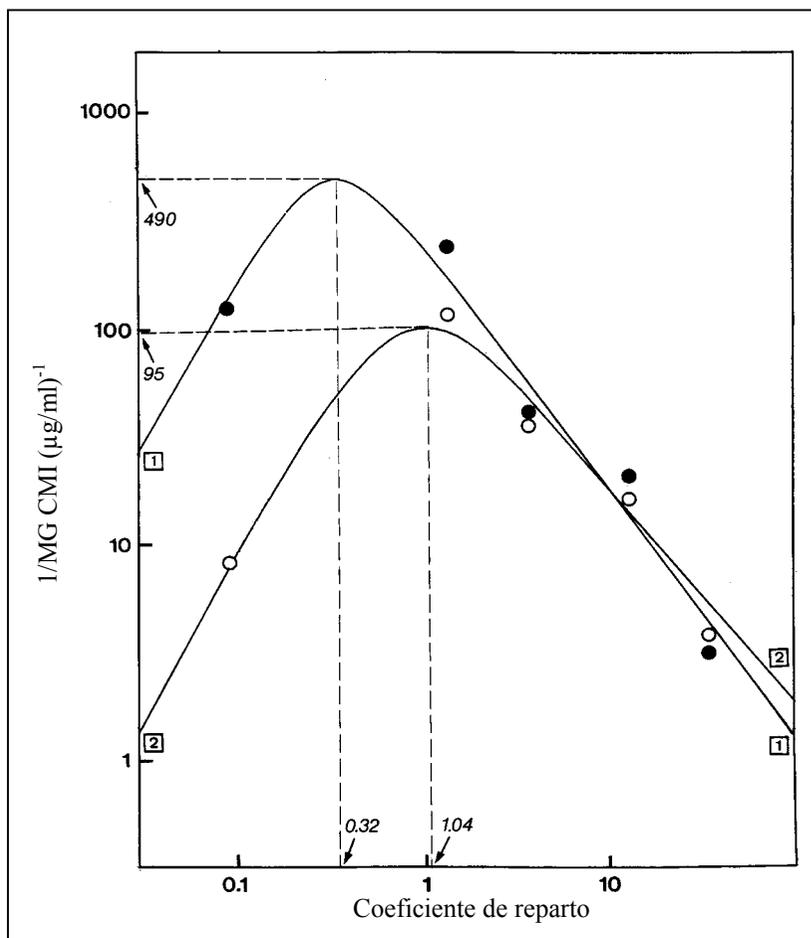
En la serie B, contrariamente a lo que ocurre con la anterior, los límites de  $P_0$  entre especies Gram positivas y Gram negativas se hacen más difusos, produciéndose incluso alguna inversión. Además los valores de  $P_0$  se reducen respecto a la serie A, en especial para los gérmenes Gram positivos.

Así, la especie *A. calcoaceticus*, Gram negativa, se sitúa por encima de las especies de SCN, Gram positivas. No puede decirse, pues, que exista en este caso una zona de separación, aunque sí de transición y mixta (por la situación de sus componentes). Para las restantes especies se observa, no obstante, la misma tendencia en cuanto a posiciones: bajas para las Gram negativas y más o menos altas para las Gram positivas, aunque todas ellas presentan valores  $P_0$  considerablemente menores que los que poseen para los elementos de la serie A.

También en otros casos, a partir de la comparación de los valores (1/MG CMI) para las mismas especies, las diferencias en  $P_0$  halladas para las series A y B, comparativamente hablando, podrían tener cierta relación con la actividad.

En los ensayos realizados con especies de referencia (cepas ATCC), si se ajustan aparte las especies Gram negativas y las Gram positivas, se obtienen valores  $P_0$  globales que no se alejan mucho de los que se han comentado anteriormente. Así, en las curvas de la Figura 4.5, que recogen los

datos del Cuadro 3.1 del capítulo de Resultados para las cepas de referencia, se obtiene un valor  $P_0=0,32$  para el conjunto de los microorganismos Gram negativos y un  $P_0=1,04$  para el de los Gram positivos.



**Figura 4.5.** Correlaciones estructura-actividad obtenidas para los componentes de la serie A frente a las medias geométricas (valores promediados) de los microorganismos Gram negativos (-•-, curva 1) y Gram positivos (-o-, curva 2) de referencia ATCC, cuyos valores CMI se indican en el Cuadro 3.1.

#### 4.4.3.1. Significación del óptimo de lipofilia

Es posible que las interacciones quinolona-receptor sean las responsables de la actividad de estos compuestos, pero parece muy posible también que el factor limitativo de su acción farmacológica sea la permeabilidad a través de las membranas de los diferentes microorganismos o, si se quiere, del entorno adyacente al lugar de acción. Si éste fuera el caso, se podría afirmar, a partir de las observaciones realizadas hasta hoy, que cuanto más hidrófilo es el fármaco ensayado, más probabilidades existen de que actúe eficazmente sobre los gérmenes Gram negativos (para los cuales el óptimo de lipofilia para las series estudiadas oscila entre 0,05 y 1,45 aproximadamente). Los gérmenes Gram positivos, en cambio, requerirían para una mayor eficacia, fármacos algo más lipófilos ( $P_0$  entre 1,0 y 3,5 aproximadamente).

Particularizando más, el ciprofloxacino, su derivado 3'metilado y el 4'N-metilciprofloxacino serían, de todos los ensayados, los más activos sobre los microorganismos Gram negativos, en tanto que para los Gram positivos los candidatos de elección deberían buscarse entre el 4'N-etilciprofloxacino, el 4'N-metilciprofloxacino y el 3'metil,4'N-metilciprofloxacino principalmente. Estos dos últimos serían también aconsejables para las especies de carácter intermedio, cuyo representante más típico es aquí *Acinetobacter calcoaceticus*. Obsérvese que, de todas las quinolonas ensayadas, el único elemento común es el 4'N-metilciprofloxacino, probablemente el candidato más completo y polivalente de todos los ensayados y, curiosamente, no utilizado hasta el momento como antibacteriano a tenor de los datos bibliográficos disponibles. Estas observaciones pueden también ser interesantes en principio, para el enfoque

del diseño y el desarrollo de nuevas quinolonas, en especial cuando se trata de encontrar fármacos activos contra determinados microorganismos (especies o cepas resistentes a otros antibacterianos).

Otro punto de interés digno de atención, que plantea interrogantes de difícil respuesta, es el hecho de que las membranas de las especies bacterianas Gram negativas poseen mayor proporción de lípidos que las de las Gram positivas, lo que está en contradicción con el comportamiento general descrito. La bibliografía revela que este comportamiento aparentemente contradictorio es, también, el que presentan otros agentes antimicrobianos (120, 176). Por desgracia, la interpretación biofísica que hacen del fenómeno algunos autores (177), no es convincente si sólo se considera la lipofilia intrínseca de la membrana microbiana.

Recientes estudios (119, 185, 219) sobre esta última parecen indicar que la pared celular de los gérmenes Gram positivos -formada, en elevada proporción, por peptidoglicanos-, es unas 15 veces más gruesa que la de los gérmenes Gram negativos, mucho más compacta debido a la presencia de numerosos enlaces transversales oligopeptídicos, que le confieren una extraordinaria rigidez, y dotada de menor número de canales acuosos susceptibles de franquear el paso de moléculas muy hidrófilas al interior de la célula o, en este caso, a las biofases. La pared celular de los microorganismos Gram negativos, por el contrario, contiene gran variedad de lípidos, polisacáridos y proteínas (entre ellas, porinas que parecen implicadas en el transporte de pequeñas moléculas hidrófilas), así como varias enzimas. Esta disposición podría favorecer la formación de canales hidrófilos que podrían facilitar el paso de moléculas altamente hidrófilas hasta sus biofases. Esta ultraestructura podría explicar de forma meramente especulativa los

resultados obtenidos. Lo cierto es que, hasta el momento actual, no se ha estudiado este fenómeno, aparentemente paradójico, que podría ilustrar de forma indirecta acerca de la constitución de los microorganismos.

#### **4.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS EN *Streptococcus pneumoniae***

Con el propósito de conocer la diana específica de los derivados alquilados, proporcionar información acerca del modo de acción de estos compuestos y comprobar si ello permite explicar las diferencias en la actividad observada con respecto a la de ciprofloxacino, se ha seleccionado *Streptococcus pneumoniae* por ser uno de los microorganismos más estudiados.

La girasa se ha considerado como la primera diana de las quinolonas en la mayoría de bacterias Gram negativas (132) y micobacterias (285), mientras que la topoisomerasa IV parece ser la primera diana de las fluoroquinolonas en bacterias Gram positivas como *S. aureus* (91), *S. pneumoniae* (204, 226) y *Enterococcus sp.* (153).

Sin embargo en *S. pneumoniae*, la actividad bactericida puede producirse a través de girasa, topoisomerasa IV o ambas, dependiendo de la estructura de la quinolona (228, 230). Además, puesto que ambas enzimas tienen funciones distintas en la célula bacteriana, la respuesta a las quinolonas por parte del microorganismo difiere según cual sea la primera diana en cada caso (79). Se cree que la formación del complejo ternario con la girasa provocaría una muerte rápida de la bacteria, mientras que con la

topoisomerasa IV sería un proceso lento (148). Así, como se ha descrito en el capítulo de Antecedentes (epígrafe 1.3.2), las fluoroquinolonas se pueden agrupar en tres clases (228, 230) según el orden de las consecutivas mutaciones QRDR en las topoisomerasas de mutantes resistentes seleccionados en *S. pneumoniae*. El primer grupo selecciona mutaciones QRDR en la topoisomerasa IV antes que en la girasa (98, 204, 226, 227); un segundo grupo selecciona las mutaciones en la girasa antes que en la topoisomerasa IV (9, 98, 99, 230) y finalmente, el tercer grupo selecciona ambas dianas (124, 125, 228).

La existencia de estos tres grupos pone de manifiesto que la estructura de las quinolonas determina su modo de acción en *S. pneumoniae* (9, 230). Así recientemente se ha descrito en la bibliografía nuevas sustituciones en las posiciones C<sub>7</sub> y C<sub>8</sub> que cambian la primera diana de acción de topoisomerasa IV a girasa o a ambas, mejorando en gran medida la actividad antibacteriana comparada con las quinolonas del grupo del ciprofloxacino (9, 322).

Nuestro estudio se ha restringido a la influencia de la posición en C<sub>7</sub>, cuyo sustituyente parece determinar no sólo la potencia sino también la diana preferente de las fluoroquinolonas. En este sentido se manifiestan Alovero y col. (9) quienes establecen que el aumento de la potencia que muestra una nueva serie de fluoroquinolonas idénticas al ciprofloxacino excepto por la adición de un grupo bencenosulfonamida en el anillo piperacínico de la posición 7, se asocia con la preferencia de la girasa como primera diana. Este estudio es coherente con el modelo propuesto por Shen y col. (268) que postula que el sustituyente en C<sub>7</sub> está relacionado con las interacciones fármaco-enzima. También el estudio de Gootz y col. (111) demuestra que la adición de un grupo metilo en el anillo piperacínico del C<sub>7</sub> de las quinolonas

parece establecer contactos críticos con la enzima que determina el reconocimiento de la diana bacteriana *in vivo* e *in vitro*.

Según estas consideraciones es posible formular la hipótesis, dada la estructura de las quinolonas en estudio, de que un cambio de la primera diana de acción pudiera ser responsable de la mayor actividad de estos compuestos en este microorganismo.

De hecho, estos compuestos, en especial el 97-100, poseen una estructura intermedia entre quinolonas del grupo uno y dos. En este sentido, se comprueba que la única discrepancia estructural de grepafloxacino (Figura 1.4) y gatifloxacino (Figura 1.5) -grupo 2- con respecto a ciprofloxacino (Figura 1.3) -grupo 1- consiste en dos metilos uno en C<sub>5</sub> y otro en 3' en el grepafloxacino y un grupo metilo en 3' y un radical metoxi en C<sub>8</sub> en el gatifloxacino. Es decir, el derivado 97-100 se diferencia del grepafloxacino en el grupo metilo de C<sub>5</sub>, y del gatifloxacino en el grupo metoxi en C<sub>8</sub>, constituyendo un compuesto intermedio entre el ciprofloxacino y estas dos quinolonas. Por ello, se intentó esclarecer cual es el grupo responsable del cambio de diana, pues es crítico a la hora de decidir la estructura adecuada en el diseño de fármacos.

Se procedió al ensayo de la actividad antibacteriana de las dos series de quinolonas en cepas de *S. pneumoniae* con mutaciones conocidas en las QRDR de la girasa y topoisomerasa IV de las mismas, cuyos resultados se presentaron en el capítulo anterior. Se demuestra que la alquilación simple en posición 7 del anillo piperacínico del ciprofloxacino no conduce a un cambio en la selección de la primera diana en *S. pneumoniae* y la topoisomerasa IV continúa siendo la principal diana para estos compuestos como lo es para el patrón. Este hecho parece indicar que el grupo responsable del cambio de

diana es, precisamente, el grupo metilo en C<sub>5</sub> del grepafloxacino y el radical metoxi en C<sub>8</sub> del gatifloxacino.

En lo que respecta al gatifloxacino, estas conclusiones ratifican las expuestas por Fukuda y col. que han intentado esclarecer este mismo aspecto y, en un trabajo muy reciente (99), demuestran que el grupo metoxi es el responsable del cambio de diana. Estos autores se apoyan en el estudio de dos compuestos intermedios entre ciprofloxacino y gatifloxacino; el AM-1147, que presenta un radical metoxi en C<sub>8</sub>, y el AM-1121 que estructuralmente coincide con el 97-100. Este grupo de investigadores observó que el ciprofloxacino y el compuesto AM-1121 seleccionaban como primera diana la topoisomerasa IV, mientras que, por el contrario, el gatifloxacino y el derivado AM-1147 distinguían en primer lugar a la girasa y presentaban mayor actividad que los respectivos contrapuestos 8-H frente a la cepa libre de mutaciones.

De este modo, sería interesante profundizar en la contribución de los sustituyentes en C<sub>7</sub> y C<sub>8</sub> en el establecimiento de la preferencia por la diana y la actividad antibacteriana, pues permitiría diseñar quinolonas que actuaran selectivamente en una u otra enzima o en ambas a la vez.

En este contexto se ha investigado acerca de la formación *in vitro* del complejo ternario entre fármaco, ADN y enzima, en presencia de la topoisomerasa IV, y también de la girasa, con los derivados alquilados del ciprofloxacino en comparación con éste. De esta forma se evalúan las posibles diferencias en la afinidad por la enzima.

Los resultados obtenidos demuestran que la formación del complejo ternario depende de la concentración de quinolona ensayada y que el ciprofloxacino es el compuesto con menor valor CC<sub>25</sub>, tanto en presencia de

girasa como topoisomerasa IV. Sólo el derivado 97-100 muestra la misma  $CC_{25}$  que el compuesto de referencia. El resto de quinolonas presentan una  $CC_{25}$  mucho mayor, que parece aumentar con la lipofilia del compuesto. Este hecho sugiere que la adición de un grupo alquílico en el anillo piperacínico de  $C_7$  del ciprofloxacino no favorece la formación del “cleavage”. Además a medida que este radical aumenta de tamaño (desde el grupo metílico hasta el butílico) la  $CC_{25}$  también aumenta.

Por lo tanto, la hipótesis inicial debe descartarse, si bien queda establecido que el sustituyente en  $C_7$  afecta a las interacciones entre fármaco y enzima como queda reflejado en la  $CC_{25}$ .

En consecuencia, sólo parece restar la acumulación intracelular como factor a tener en cuenta, puesto que aunque la afinidad por las dianas continúa siendo el parámetro más importante para conocer la potencia de las quinolonas, para un microorganismo dado ambos parámetros dependen de las propiedades fisicoquímicas de la quinolona.

Como norma general se considera que un tamaño voluminoso, la carga negativa y un aumento de la hidrofobicidad retrasan la penetración de los antibacterianos en los microorganismos Gram negativos a través de los canales de las porinas (119). Por otro lado, las moléculas hidrofóbicas parecen utilizar una ruta alternativa de difusión a través de lipopolisacáridos (54, 219). Algunos autores (19) han demostrado que la hidrofobicidad de los compuestos parece tener relevancia tanto en Gram positivos como en Gram negativos, mientras que el elevado peso molecular es un factor limitante sólo para los microorganismos Gram negativos. Además las moléculas hidrofóbicas cargadas positivamente parecen mostrar una mejor penetración en las bacterias Gram positivas. También cabría considerar un posible efecto

derivado de la bomba de secreción PmrA, puesto que se cree que la baja afinidad de algunas quinolonas por estos transportadores contribuye a aumentar su potencia (132). No obstante es importante destacar que la expresión de esta bomba en la cepa libre de mutaciones suele ser pequeña, por lo que este efecto no debería influir en gran medida en la actividad de los derivados con respecto al ciprofloxacino.

Según estas observaciones y a la vista de los resultados de que se dispone parece lógico pensar que la mejora en la actividad de estos compuestos puede deberse a la mayor penetración de los mismos al interior de la célula, aunque una vez allí su afinidad por la diana es inferior conforme aumenta la lipofilia. De esta forma serían dos factores que se contrarrestan el uno al otro y su equilibrio es lo que se refleja en la CMI. No obstante serían necesarios estudios de penetración para comprobar esta hipótesis.

#### **4.6. ELECCIÓN DE CANDIDATOS: BALANCE ACTIVIDAD-BIODISPONIBILIDAD**

Es muy cierto que la actividad y seguridad en su utilización condicionan, en principio, la elección de un candidato a fármaco. Sin embargo, cuando se utiliza la vía oral de administración, el candidato seleccionado debería presentar, además, unas características de biodisponibilidad apropiadas.

La experiencia ha puesto reiteradamente de manifiesto que muchos candidatos a fármacos, al parecer excelentes en lo que se refiere a actividad y seguridad, no han alcanzado en el mercado el éxito esperado por presentar

una biodisponibilidad escasa, irregular o variable según las condiciones de administración. Por este motivo, muchos científicos (280) opinan que los estudios de desarrollo de fármacos deberían incluir información sobre la biodisponibilidad de los compuestos que se ensayan.

El ciprofloxacino, compuesto base de nuestro estudio, pese a todas las ventajas que presenta desde el punto de vista farmacoterapéutico (y que le han situado en el mercado en puestos punteros), no es, en este aspecto, un modelo de perfección. Su biodisponibilidad oral absoluta, más por irregularidad y variabilidad que por escasez, es, sin duda, mejorable. De hecho, en la literatura se citan valores comprendidos entre 0,31 y 0,79 (21, 63, 164, 300), con grandes variaciones interindividuales e intraindividuales atribuibles a su hidrofilia ( $P=0,075\pm 0,003$  en n-octanol/tampón acuoso), que no facilitaría un buen rendimiento en su difusión por membrana (194), a su superficie útil de absorción en el tracto intestinal, escasa y sometida a pérdidas por secreción de la fracción absorbida hacia el fluido luminal y las heces en último término (112, 313), a su facilidad de interacción con excipientes y coadyuvantes en las operaciones tecnológicas (300), a factores dietéticos (213) y a otras causas.

No cabe duda de que el hallazgo de una nueva quinolona que uniera las cualidades farmacoterapéuticas del ciprofloxacino y una mejora en su biodisponibilidad constituiría un hito importante en la terapéutica con quinolonas, si bien algunas de ellas cumplen parcialmente estos requisitos. La mejora no excluye, en modo alguno, la variedad y menos en este caso, en el que se intenta mantener al máximo las características químicas del ciprofloxacino, totalmente acreditadas.

Recordemos que, cuando no existen pérdidas presistémicas sustanciales (como ocurre con la inmensa mayoría de las quinolonas), un aumento de lipofilia supone normalmente una absorción más rápida y más lucrativa en el tracto intestinal (es decir, un aumento en la biodisponibilidad absoluta,  $F$ ), así como una penetración más rápida en tejidos, circunstancias ambas generalmente favorables para la acción farmacológica; el compuesto de elección será, en condiciones normales, el que se encuentre más cerca del óptimo de la curva bilineal representativa de la correlación estructura-actividad, pero suponiendo que su biodisponibilidad sea adecuada. Si existen en la serie otros elementos que presentan parecida actividad *in vitro* (es decir, una  $1/\text{MG CMI}$  similar) el candidato de elección debería ser el que presente mayor biodisponibilidad. Más todavía, si existe un elemento muy activo y poco biodisponible (por ejemplo,  $1/\text{MG CMI}=18$  y  $F=0,37$ ) y otro con menor actividad pero con una biodisponibilidad muy superior ( $1/\text{MG CMI}=15$  y  $F=0,88$ , por ejemplo), el candidato de elección será, sin duda, este último.

Se podría expresar este hecho abogando por la existencia de un equilibrio o balance entre actividad y biodisponibilidad que, cuando es óptimo, caracteriza claramente al candidato de elección. Y esto nos lleva a considerar las posibilidades de estimación de la biodisponibilidad en este tipo de ensayos.

Parece lógico, pues, utilizar para la selección de los mejores candidatos a fármacos (que, por supuesto, deberán someterse a ulteriores estudios de toxicidad y, en su caso, a ensayos en fase II y III) dos criterios fundamentales:

- 1) Actividad antimicrobiana comparada.

2) Biodisponibilidad comparada.

de los cuales sólo el primero se ha desarrollado en la presente Memoria. Sin embargo, estimamos que es necesario, de acuerdo con los objetivos del proyecto global, enfrentar estos datos a los que se poseen, relativos a la absorción intestinal intrínseca, obtenidos en ratas. El balance o equilibrio entre los dos criterios antes citados permitirá la selección de los candidatos óptimos.

En el Cuadro 3.37 se muestran los valores de CF, que oscilan entre 1,54 y 2,25 y señalan que los derivados tendrían una biodisponibilidad aproximadamente doble a la del ciprofloxacino. De este modo, la actividad esperada frente a la mayoría de especies bacterianas podría, de hecho, aumentar con respecto a la mostrada *in vitro*. Cabe sin embargo, que los valores de biodisponibilidad predicha en la rata difieran de los calculados en humanos, pero no descartarían su uso en la práctica ya que mantendrían su carácter de escala. Su validez como predicción se corrobora al comparar los datos experimentales disponibles (Cuadro 3.36) con lo que pueden aceptarse como buenas aproximaciones al valor real, y así evitar las determinaciones de  $F_{det}$  que resultan, en la práctica, tan complejas, prolongadas y engorrosas que no pueden recomendarse como métodos generales para su inclusión en un estudio de desarrollo de fármacos.

Por otro lado, se podría argumentar que los derivados 4'-N-alquilados del ciprofloxacino tienden a generar en mayor o menor proporción ciprofloxacino como metabolito. No obstante, no deben considerarse únicamente como profármacos, como se ha propuesto alguna vez (160), sino que, como se ha demostrado en la presente Memoria son diferentes del

fármaco del que derivan tanto en actividad como en biodisponibilidad. Además, ya desde 1990 existen trabajos en la bibliografía que respaldan esta idea (87, 116). Por ello, podrían utilizarse como candidatos a fármacos e incluso como modelos de referencia que pueden extrapolarse a cualquier otra serie de quinolonas que pudieran ensayarse en el futuro.

Relativo a este aspecto, en la bibliografía se ha encontrado un trabajo realizado con el 4'-etilciprofloxacino por Cester y Toutain (42). Estos autores demuestran que tras la administración de una única dosis por vía oral a perros, los niveles de este compuesto son mucho más elevados que los de su principal metabolito (ciprofloxacino) durante las primeras 6-8 h tras la administración, por lo que el 4'-etilciprofloxacino es el responsable de los efectos terapéuticos. La cantidad total de ciprofloxacino excretado como metabolito es alrededor del 40%. Otros trabajos similares más recientes sostienen la misma idea (85, 118, 246).

En resumen, para la selección de candidatos se ha utilizado, en principio, el criterio BAB, más formal que especulativo. Los parámetros se exponen en el Cuadro 3.37. Cualquier elemento que posea la misma o similar actividad que el ciprofloxacino y que mejore la biodisponibilidad oral de éste es digno de ser seleccionado, sea para la generalidad de los microorganismos o para un determinado germen en particular. En este sentido, los resultados de BAB muestran un claro aumento de la eficacia de los derivados relativa a ciprofloxacino. La selección sería definitiva si las pruebas subsiguientes de desarrollo farmacológico y toxicológico aconsejaran ulteriores estudios en la especie humana. En este sentido, en el compuesto patrón (ciprofloxacino) y el 4'-etilciprofloxacino (enrofloxacino), usados habitualmente en medicina

humana y veterinaria, respectivamente, estos aspectos son bien conocidos. Es posible que la existencia de fármacos similares en su constitución, utilizados ya en Terapéutica (por ejemplo, el pefloxacino) haya desviado la atención y relegado el estudio de estos derivados hasta el momento. Pero, a tenor de nuestros resultados, este proceder es injustificado.

En todo caso, a falta de estas pruebas, según los valores de BAB mostrados en el Cuadro 3.37, existen tres compuestos que presentan las mejores propiedades en conjunto:

➤ **4’N-metilciprofloxacino.** La adición de un grupo metilo en la posición 4’N del ciprofloxacino puede aumentar no sólo su biodisponibilidad (87), sino también su actividad antibacteriana. De hecho, resulta el compuesto con mejores propiedades en todos los microorganismos Gram negativos a excepción de *E. coli*. En especial, la eficacia de este compuesto frente a *Acinetobacter calcoaceticus* (BAB=17,0) sería mucho mayor que la del compuesto de referencia. También en *Staphylococcus aureus* (BAB=8,8) y *Streptococcus pneumoniae* (BAB=4,0), aunque no es el derivado de elección, la eficacia de este compuesto sería mayor a la de ciprofloxacino. Por todo ello, el homólogo 4’N metilado podría ser un excelente candidato para reemplazar al compuesto patrón en las enfermedades causadas por estos microorganismos.

➤ **4’N-etilciprofloxacino.** El sustituyente 4’N etilo hace que este compuesto sea muy eficaz frente a los microorganismos Gram positivos, siendo el derivado de elección en todos los casos. También presenta buenas propiedades en los microorganismos Gram negativos en especial frente a *A.*

*calcoaceticus* (BAB=9,0). Sería por ello un buen candidato para reemplazar al ciprofloxacino.

➤ **3'-metilciprofloxacino** (97-100). La adición del grupo metilo en posición 3' del ciprofloxacino proporciona una eficacia en general mejor a la del patrón en todas las especies estudiadas. Sin embargo sólo resulta el candidato de primera elección en *E. coli*, en el que la mayoría de compuestos son menos activos que el ciprofloxacino.

Conviene destacar además que el resto de derivados también podrían resultar de interés en algunos de los microorganismos estudiados. Así, frente a *A. calcoaceticus*, *S. aureus* y *S. pneumoniae* todos los homólogos presentan mejores propiedades que el ciprofloxacino y podrían ser eficaces en el tratamiento de las enfermedades causadas por estas especies. En los demás microorganismos, a excepción de *E. coli* y *Achromobacter spp.* el aumento de la eficacia no es tan significativo y depende del compuesto, pero en general todos muestran mejores propiedades que el ciprofloxacino a excepción de los que contienen un radical butilo en 4'N.

Debido a que todos los homólogos presentan mejores propiedades que el ciprofloxacino y podrían ser eficaces en el tratamiento de las enfermedades causadas por *A. calcoaceticus*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*, parece conveniente comentar el interés que podrían tener en estos casos, puesto que se trata de microorganismos que se encuentran en el medio hospitalario y se les implica cada vez con mayor frecuencia, como importantes patógenos nosocomiales.

La neumonía adquirida en la comunidad es una enfermedad común y grave, cuyo principal agente causal es *S. pneumoniae* (que ya se ha considerado a lo largo de la Memoria), que origina más del 50% de los casos, con una mortalidad del 7 al 36% (189). Sin embargo, más de 100 microorganismos pueden ser el origen de dicha enfermedad (187). Aunque existe cierto solapamiento, los microorganismos causantes de neumonía nosocomial difieren enormemente de los que producen la neumonía adquirida en la comunidad. La neumonía nosocomial ocurre con una frecuencia de 0,5 a 1,5% de todos los pacientes hospitalizados y de 10 a 30% de aquellos sometidos a ventilación artificial (88). En ellas, los gérmenes predominantes son generalmente bacilos Gram negativos y algunos cocos Gram positivos, especialmente *S. aureus* (88, 188).

Entre los microorganismos Gram negativos que juegan un papel importante en las infecciones nosocomiales, el género *Acinetobacter* ha atraído la atención durante las últimas dos décadas (23). *A. calcoaceticus* es un bacilo Gram negativo al que se suele implicar en casos de neumonías nosocomiales graves, especialmente en enfermos inmunodeprimidos y en pacientes de las unidades de Cuidados intensivos (UCI) (22). Además, se le ha relacionado con diferentes infecciones nosocomiales incluyendo bacteriemias, infecciones del tracto urinario y meningitis (22, 23).

Durante los últimos 20 años, se ha observado un importante aumento de resistencia antimicrobiana en *Acinetobacter*, de manera que las infecciones producidas por estos microorganismos resultan muy difíciles de tratar. Hasta entonces se trataban con éxito mediante gentamicina, minociclina, ácido nalidíxico, ampicilina o carbenicilina. Entre los antibióticos destinados a resolver los problemas de resistencias se utilizaron

las fluoroquinolonas, para las que existen datos de sensibilidad controvertidos, aunque las CMI's están aumentando cada vez más (104).

Así las especies de *Acinetobacter* tienen una extraordinaria capacidad para desarrollar mecanismos de resistencia múltiples contra la mayoría de clases de antibióticos. Son resistentes a los betalactámicos de amplio espectro (cefalosporinas de tercera generación, carboxipenicilinas y carbapenemes). Además produce un amplio ámbito de enzimas inactivantes de aminoglucósidos, y últimamente la mayoría de las cepas son resistentes a las fluoroquinolonas (23).

Entre los patógenos Gram positivos, *Staphylococcus aureus* es uno de los microorganismos que se aísla con mayor frecuencia en los pacientes con neumonía nosocomial (88). Además es, entre otros, uno de los principales causantes de la mayoría de los casos de neumonía hospitalaria leve o moderada, aunque también produce casi todas las neumonías nosocomiales graves que aparecen en los primeros cinco días de ingreso hospitalario de pacientes sin factores de riesgo de infección por estos patógenos (218). De hecho es la principal causa de muerte por neumonía nosocomial (28).

Esta especie desarrolló una resistencia progresiva a los betalactámicos y en los años 80 emergieron cepas resistentes a meticilina. En consecuencia la vancomicina se ha convertido en el fármaco de elección para el tratamiento de esta infección durante la última década basado en pruebas de sensibilidad y los niveles de antimicrobiano en suero. Sin embargo la mitad de los pacientes tratados con este fármaco perdieron la vida, por ello mantener los niveles en tejidos por encima de la CMI es vital para el éxito clínico. Optimizar el tratamiento y nuevos agentes antimicrobianos proporcionarán nuevas oportunidades para aumentar el porcentaje de supervivencia (28).

En conclusión, después de lo expuesto se puede afirmar que los derivados 4'-N-alquilados y, en particular, el metílico y el etílico podrían ser una buena solución para este tipo de infecciones, puesto que han demostrado ser más activos que el ciprofloxacino y no pueden considerarse, bajo ningún concepto, como meros profármacos del compuesto original. Y si a ello añadimos el hecho de que poseen, además, una mayor biodisponibilidad, la consecuencia lógica es que deberían estudiarse sus características de toxicidad y seguridad y potenciarse y promocionarse su empleo si, como parece probable, ambos son inocuos y seguros. De hecho, el derivado etilado o enrofloxacino goza de un enorme consumo en el campo veterinario y los conocimientos que se poseen acerca de sus características son alentadores desde este punto de vista. Es posible que su estudio pudiera simplificarse considerablemente con vistas a su incorporación al arsenal terapéutico actual en medicina humana.

## *Capítulo V: Resumen y conclusiones*

---

La palabra “quinolona” es una transformación del término 4-oxo-1,4-dihidro quinoleína, la estructura común de los derivados de la quinoleína. Al margen del ácido oxolínico, al comienzo de la década de los 80, los laboratorios de investigación de la industria farmacéutica han puesto en práctica programas destinados a la síntesis de derivados de la 4-quinolona, haciendo especial hincapié en la obtención de compuestos cuyo núcleo común está constituido por la 7-piperacino-4-quinolona, a la que se incorporan uno, dos y hasta tres átomos de flúor, lo que da lugar a las denominadas quinolonas fluoradas o fluoroquinolonas, que poseen un espectro más amplio y mayor actividad antibacteriana que los compuestos

precedentes (ácido nalidíxico, oxolínico, piromídico, pipemídico, cinoxacino, rosoxacino). Existe un antecedente de quinolona (el flumequino) sintetizado en 1973, que contiene un átomo de flúor en su estructura, pero que no goza de las características farmacocinéticas de las nuevas fluoroquinolonas. La primera de éstas, el norfloxacino, se sintetizó en 1980. La última no es fácil de averiguar, porque la investigación en este campo es continua.

Las fluoroquinolonas se han convertido en agentes importantes en quimioterapia, especialmente en pacientes con infecciones graves que requieran fármacos potentes administrados por vía oral. Sin embargo, la aparición de resistencias a las quinolonas, que se han desarrollado durante el tratamiento con las mismas, ha llevado a la búsqueda de nuevas moléculas, principalmente incluyendo modificaciones en el núcleo base de la benzopiridona, lo que ha llevado al hallazgo y comercialización de nuevas quinolonas, más activas pero, en muchos casos, más tóxicas, hasta el punto de que algunas han dejado de utilizarse o han sido retiradas del mercado tras haberse demostrado su peligrosidad a medio o largo plazo.

En este contexto, y en la actualidad, el **ciprofloxacino** es una de las quinolonas más clásicas y de uso más extendido por su amplio espectro de acción, su eficacia, su excelente tolerancia y por permitir su administración tanto por vía parenteral como por vía oral, si bien es cierto que presenta el problema de poseer una biodisponibilidad oral relativamente baja e irregular. Por este motivo y tomando esta quinolona como referencia de actividad, se ha intentado sintetizar nuevos derivados con los que se pretende obtener un aumento en la biodisponibilidad. En esta línea se incluye el **Proyecto de Investigación SAF 96-1710** titulado “Predicción de la biodisponibilidad en los estudios de desarrollo de fármacos: nuevas quinolonas”.

La realización de este Proyecto va encaminada, entre otros fines, a la búsqueda de nuevas quinolonas más biodisponibles que las ya existentes, para su administración por vía oral, y que mantengan o mejoren la actividad del patrón. Por ello, es necesaria la determinación de la actividad antibacteriana, como parámetro microbiológico, y relacionarlo con la biodisponibilidad, como parámetro farmacocinético. Es decir, se pretende comprobar que el aumento de biodisponibilidad esperado en los derivados sintetizados no afecta a la actividad antimicrobiana, tanto en su espectro de acción como en la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de los microorganismos (CMI).

Para el trabajo con nuevas quinolonas, se han sintetizado varios elementos homólogos pertenecientes a dos series: 4'-N-alquilciprofloxacino y 3'-metil,4'-N-alquilciprofloxacino, cuya estructura ya se ha indicado en capítulos anteriores y cuya actividad constituye el objeto de estudio en la presente Memoria.

En resumen, en la presente Memoria se ha estudiado y comparado la actividad de estos homólogos pertenecientes a dos series con la del ciprofloxacino. Para ello, se ha determinado la CMI de los derivados, sobre 160 cepas bacterianas de origen clínico, utilizando el método de diluciones dobles seriadas en agar Müller-Hinton siguiendo las especificaciones del NCCLS.

Además se ha estudiado la cinética de letalidad de algunos de estos compuestos en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Este estudio permite obtener información dinámica sobre el crecimiento y la letalidad de los microorganismos y proporciona una serie de parámetros de gran interés en lo que se refiere al mecanismo de acción.

Por otro lado, debido a que los antibióticos estudiados en la presente Memoria pertenecen a series homólogas, ha sido posible establecer relaciones entre la estructura y la actividad de estos compuestos. Este tipo de relaciones, se han establecido utilizando como parámetro estructural la lipofilia y como índice de actividad, la inversa de la media geométrica de la CMI.

Por último, se ha investigado acerca del mecanismo de acción de estas quinolonas a nivel molecular. En concreto, la investigación se ha centrado en *Streptococcus pneumoniae*, determinando los efectos de inhibición de las quinolonas ensayadas en la ADN girasa y topoisomerasa IV bacteriana *in vitro*, con el propósito de conocer la diana específica de los derivados alquilados en comparación con el ciprofloxacino, proporcionar información acerca del modo de acción de estos compuestos y comprobar si ello permite explicar las diferencias en la actividad observadas sobre este microorganismo. Esta última parte del trabajo se ha desarrollado en el St. George's Hospital Medical School, University of London, bajo la dirección del Doctor L. M. Fisher.

Del trabajo realizado se extraen las siguientes

## CONCLUSIONES

1. La adición del sustituyente alquílico en 4'N no altera el espectro de acción del ciprofloxacino. Sin embargo, los compuestos sintetizados presentan diferente actividad frente a los gérmenes ensayados.
2. Respecto a la serie 4'N-alquilciprofloxacino, el compuesto con un radical metilo es el más activo frente a los microorganismos Gram negativos. El derivado 4'N-etilado es el más activo frente a los Gram positivos.

En cuanto a la serie 3'metil,4'N-alquilciprofloxacino, el derivado metilado (97-101) es el más activo frente a *A. calcoaceticus*, *M. catarrhalis*, *S. aureus*, SCN y *S. pneumoniae*. El derivado no sustituido (97-100) es el más activo frente a *Achromobacter spp.*

En lo que se refiere a los heterólogos estudiados, en general, el grepafloxacino es el compuesto más activo. El ofloxacino y el sarafloxacino presentan una actividad muy similar a la del ciprofloxacino, y el flumequino es el menos activo.

3. La dinámica de crecimiento y letalidad que presentan los homólogos del ciprofloxacino es la misma que su patrón en *S. aureus*, puesto que siguen la misma cinética bactericida y muestran un efecto paradójico similar. El antibiótico que presenta mayor velocidad de letalidad es el 3'metil,4'N-metilciprofloxacino (97-101).

4. La mayor letalidad del 3'metil,4'N-metilciprofloxacino no se debe a un cambio en la selección de la diana intracelular, puesto que actúa en primer lugar sobre la topoisomerasa IV en *S. aureus*, al igual que el ciprofloxacino.

5. La relación estructura-actividad se ajusta a una ecuación bilineal y permite seleccionar el coeficiente de reparto óptimo para las especies estudiadas. Este óptimo de lipofilia coincide con los derivados más activos. En general, es más bajo para los microorganismos Gram negativos y más elevado para los Gram positivos.

6. La topoisomerasa IV es la principal diana de los homólogos del ciprofloxacino de ambas series en *S. pneumoniae*, a semejanza del patrón. El

sustituyente en C<sub>7</sub> afecta a las interacciones entre fármaco y enzima, según queda reflejado en la CC<sub>25</sub> de estos compuestos. Sin embargo, no producen mayor formación del complejo ternario con la topoisomerasa IV ni con la girasa, lo que indica que la alquilación en 4'N del anillo piperacínico del ciprofloxacino no es favorable.

7. Si se utiliza el balance o equilibrio actividad-biodisponibilidad para la selección de candidatos, destacan tres compuestos: **4'N-metilciprofloxacino**, para todos los microorganismos Gram negativos, a excepción de *E. coli*; **4'N-etilciprofloxacino**, muy eficaz frente a Gram positivos y **3'-metilciprofloxacino** (97-100), candidato de primera elección en *E. coli*.

El resto de derivados también podrían ser interesantes en algunos de los microorganismos estudiados (*A. calcoaceticus*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*) pues presentan mejores propiedades que el ciprofloxacino en dichas especies.

## Capítulo VI: Bibliografía

---

1. **Agencia Española del Medicamento.** *Suspensión desde 15 de Junio de la comercialización de las especialidades “Trovan” y “Turvel”, con trovafloxacino y alatrofloxacino como principios activos.* Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud 1999; **23**: 95.

2. **Agui H, Mitani T, Izawa A, Komatsu T, Nakagome T.** *Studies on quinolone derivatives and related compounds. Synthesis and antimicrobial activity of novel 1-alkoxy-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolone carboxylic acids.* J Med Chem 1977; **20**: 791-796.

3. **Ahmed M, Borsch CM, Neyfakh AA, Schuldiner S.** *Mutants of the Bacillus subtilis multidrug transporter Bmr with altered sensitivity to the antihypertensive alkaloid reserpine.* J Biol Chem 1993; **268**: 11086-11089.
4. **Akahane K, Sekiguchi M, Une T, Osada Y.** *Structure-epileptogenicity relationship of quinolones with special reference to their interaction with gamma-aminobutyric acid receptor sites.* Antimicrob Agents Chemother 1989; **33**: 1704-1708.
5. **Akalin HE.** *Role of quinolones in the treatment of diarrhoeal diseases.* Drugs 1995; **49** Suppl 2: 128-131.
6. **Akasaka T, Kurosaka S, Uchida Y, Tanaka M, Sato K, Hayakawa I.** *Antibacterial activities and inhibitory effects of sitafloxacin (DU-6859a) and its optical isomers against type II topoisomerases.* Antimicrob Agents Chemother 1998; **42**: 1284-1287.
7. **Akasaka T, Onodera Y, Tanaka M, Sato K.** *Cloning, expression, and enzymatic characterization of Pseudomonas aeruginosa topoisomerase IV.* Antimicrob Agents Chemother 1999; **43**: 530-536.
8. **Albrecht R.** *Development of antibacterial agents of the nalidixic acid type.* Prog Drug Res 1977; **21**: 9-104.
9. **Alovero FL, Pan X-S, Morris JE, Manzo RH, Fisher LM.** *Engineering the specificity of antibacterial fluoroquinolones: benzenesulfonamide modifications at C-7 of ciprofloxacin change its primary target in Streptococcus pneumoniae from topoisomerase IV to gyrase.* Antimicrob Agents Chemother 2000; **44**: 320-325.

10. **American Hospital Formulary Service.** *Grepafloxacin withdrawn on October, 27, from the U.S. market by Glaxo.* AHFS Drug Information 1999; Supplement B. Brief (page 45).
11. **Appelbaum PC.** *Quinolone activity against anaerobes.* Drugs 1999; **58** Suppl 2: 60-64.
12. **Arimori K, Nakano M.** *Drug exsorption from blood into the gastrointestinal tract.* Pharm Res 1998; **15**: 371-376.
13. **Ball P, Tillotson G.** *Tolerability of fluoroquinolone antibiotics. Past, present and future.* Drug Saf 1995; **13**: 343-358.
14. **Ball P.** *New Fluoroquinolones: Real and Potential Roles.* Curr Infect Dis Rep 1999; **1**: 470-479.
15. **Barbarics E, Kronauge JF, Cohen D, Davison A, Jones AG, Croop JM.** *Characterization of P-glycoprotein transport and inhibition in vivo.* Cancer Res 1998; **58**: 276-282.
16. **Bartlett JG, Mundy LM.** *Community-acquired pneumonia.* N Engl J Med 1995; **333**: 1618-1624.
17. **Barre J, Houin G, Tillement JP.** *Dose-dependent pharmacokinetic study of pefloxacin, a new antibacterial agent, in humans.* J Pharm Sci 1984; **73**: 1379-1382.
18. **Bauernfeind A.** *Comparison of the antibacterial activities of the quinolones BAY 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin.* J Antimicrob Chemother 1997; **40**: 639-651.

19. **Bazile S, Moreau N, Bouzard D, Essiz M.** *Relationships among antibacterial activity, inhibition of DNA gyrase, and intracellular accumulation of 11 fluoroquinolones.* Antimicrob Agents Chemother 1992; **36**: 2622-2627.
20. **Bergan T.** *Pharmacokinetics of the fluoroquinolones* 152-157 en The Quinolones 5. Editado por Andriole VT. Academic Press 1998.
21. **Bergeron MG.** *The pharmacokinetics and tissue penetration of the fluoroquinolones.* Clin Invest Med 1989; **12** Suppl 1: 20-27.
22. **Bergogne-Berezin E, Towner KJ.** *Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features.* Clin Microbiol Rev 1996; **9**: 148-165.
23. **Bergogne-Berezin E.** *The Increasing Role of Acinetobacter Species As Nosocomial Pathogens.* Curr Infect Dis Rep 2001; **3**: 440-444.
24. **Bermejo MV, Merino V, Garrigues TM, Plá-Delfina JM, Mulet A, Vizet P, Trouiller G, Mercier C.** *Validation of a biophysical drug absorption model by the PATQSAR system.* J Pharm Sci 1999; **88**: 398-405.
25. **Bertino JJr, Fish D.** *The safety profile of the fluoroquinolones.* Clin Ther 2000; **22**: 798-817; discussion 797.
26. **Blondeau JM.** *A review of the comparative in-vitro activities of 12 antimicrobial agents, with a focus on five new "respiratory quinolones".* J Antimicrob Chemother 1999; **43** Suppl B: 1-11.
27. **Blondeau JM.** *Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review.* Clin Ther 1999; **21**: 3-40.

28. **Bodi M, Ardanuy C, Rello J.** *Impact of Gram-positive resistance on outcome of nosocomial pneumonia.* Crit Care Med 2001; **29** (4 Suppl): N82-N86.
29. **Borner K, Höffken G, Lode H, Koeppe P, Prinzing C, Glatzel P, Wiley R, Olschewski P, Sievers B, Reinitz D.** *Pharmacokinetics of ciprofloxacin in healthy volunteers after oral and intravenous administration.* Eur J Clin Microbiol 1986; **5**: 179-186.
30. **Bouvet O, Bressolle F, Courtieu C, Galtier M.** *Penetration of pefloxacin into gynaecological tissues.* J Antimicrob Chemother 1992; **29** Suppl 5: 579-587.
31. **Boyd DB, Herron DK, Lunn WHW, Spitzer WA.** *Parabolic relationships between antibacterial activity of cephalosporins and beta-lactam reactivity predicted from molecular calculations.* J Am Chem Soc 1980; **102**: 1812-1814.
32. **Brenwald NP, Gill MJ, Wise R.** *Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of streptococcus pneumoniae.* Antimicrob Agents Chemother 1998; **42**: 2032-2035.
33. **Brogard JM, Jehl F, Arnaud JP, Levy P, Peladan F, Blicke JF, Monteil H.** *Ciprofloxacin: evaluation of its biliary elimination in man.* Schweiz Med Wochenschr 1985; **115**: 448-453.
34. **Bryskier A, Chantot JF.** *Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones.* Drugs 1995; **49** Suppl 2: 16-28.

35. **Cantón E, Gobernado M, Jiménez T, Izquierdo R.** *Lomefloxacin: laboratory study of antibacterial activity.* Rev Esp Quimioterap 1989; **2**: 237-244.
36. **Carbone M, Fera MT, Cecchetti V, Tabarrini O, Losi E, Cusumano V, Teti G.** *In vitro activities of new quinolones against Helicobacter pylori.* Antimicrob Agents Chemother 1997; **41**: 2790-2792.
37. **Cavet ME, West M, Simmons NL.** *Fluoroquinolone (ciprofloxacin) secretion by human intestinal epithelial (Caco-2) cells.* Br J Pharmacol 1997; **121**: 1567-1578.
38. **Cecchetti V, Clementi S, Cruciani G, Fravolini A, Pagella PG, Savino A, Tabarrini O.** *6-aminoquinolones: a new class of quinolone antibacterials?* J Med Chem 1995; **38**: 973-982.
39. **Cecchetti V, Fravolini A, Lorenzini MC, Tabarrini O, Terni P, Xin T.** *Studies on 6-aminoquinolones: synthesis and antibacterial evaluation of 6-amino-8-methylquinolones.* J Med Chem 1996; **39**: 436-445.
40. **Cecchetti V, Fravolini A, Palumbo M, Sissi C, Tabarrini O, Terni P, Xin T.** *Potent 6-desfluoro-8-methylquinolones as a new lead compounds in antibacterial chemotherapy.* J Med Chem 1996; **39**: 4952-4957.
41. **Cecchetti V, Parolin C, Moro S, Pecere T, Filipponi E, Calistri A, Tabarrini O, Gatto B, Palumbo M, Fravolini A, Palu' G.** *6-Aminoquinolones as new potential anti-HIV agents.* J Med Chem 2000; **43**: 3799-3802.

42. **Cester CC, Toutain PL.** *A comprehensive model for enrofloxacin to ciprofloxacin transformation and disposition in dog.* J Pharm Sci 1997; **86**: 1148-1155.
43. **Cohen SP, Hooper DC, Wolfson JS, Souza KS, McMurry LM, Levy SB.** *Endogenous active efflux of norfloxacin in susceptible Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother 1988; **32**: 1187-1191.
44. **Cohen SP, McMurry LM, Hooper DC, Wolfson JS, Levy SB.** *Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) Escherichia coli selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition of OmpF reduction.* Antimicrob Agents Chemother 1989; **33**: 1318-1325.
45. **Cohen SP, McMurry LM, Levy SB.** *marA locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic resistant (Mar) mutants of Escherichia coli.* J Bacteriol 1988; **170**: 5416-5422.
46. **Cormet E, Barlier AM, Huneau JF, Rubinstein E, Carbón C, Farinotti R, Tomé D.** *Sparfloxacin secretion across Caco-2 cells involves a multidrug resistance-like mechanism.* Drugs 1995; **49**: 307-309.
47. **Cormet-Boyaka E, Huneau JF, Mordrelle A, Boyaka PN, Carbon C, Rubinstein E, Tome D.** *Secretion of sparfloxacin from the human intestinal Caco-2 cell line is altered by P-glycoprotein inhibitors.* Antimicrob Agents Chemother 1998; **42**: 2607-2611.
48. **Craig WA, Vogelman B.** *The postantibiotic effect.* Ann Intern Med 1987; **106**: 900-902.

49. **Cruciani M, Bassetti D.** *The fluoroquinolones as treatment for infections caused by gram-positive bacteria.* J Antimicrob Chemother 1994; **33**: 403-417.
50. **Crumplin GC, Kenwright M, Hirst T.** *Investigations into the mechanism of action of antibacterial agent norfloxacin.* J Antimicrob Chemother 1984; **13** Suppl B: 9-23.
51. **Crumplin GC, Smith JT.** *Nalidixic acid: an antibacterial paradox.* Antimicrob Agents Chemother 1975; **8**: 251-261.
52. **Cullen ME, Wyke AW, Kuroda R, Fisher LM.** *Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from Escherichia coli that confers clinical resistance to 4-quinolones.* Antimicrob Agents Chemother 1989; **33**: 886-894.
53. **Chang T, Black A, Dunky A, Wolf R, Sedman A, Latts J, Welling PG.** *Pharmacokinetics of intravenous and oral enoxacin in healthy volunteers.* J Antimicrob Chemother 1988; **22**: 371-375.
54. **Chapman JS, Georgopapadakou NH.** *Routes of quinolone permeation in Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother 1988; **32**: 438-442.
55. **Chen CR, Malik M, Snyder M, Drlica K.** *DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage.* J Mol Biol 1996; **258**: 627-637.
56. **Child J, Andrews JM, Wise R.** *Pharmacokinetics and tissue penetration of the new fluoroquinolone grepafloxacin.* Antimicrob Agents Chemother 1995; **39**: 513-515.

57. **Chin NX, Neu H.** *Comparative in vitro activity of the new fluoroquinolone BMY-40062.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; **9**: 620-624.
58. **Chiou WL, Chung SM, Wu TC.** *Potential role of P-glycoprotein in affecting hepatic metabolism of drugs.* Pharm Res 2000; **17**: 903-905.
59. **Chow RT, Dougherty TJ, Fraimow HS, Bellin EY, Miller MH.** *Association between early inhibition of DNA synthesis and the MICs and MBCs of carboxyquinolone antimicrobial agents for wild-type and mutant [*gyrA nfxB(ompF) acrA*] Escherichia coli K-12.* Antimicrob Agents Chemother 1988; **32**: 1113-1118.
60. **Chu DTW, Fernandes PB, Claiborne AK, Shen L, Pernet AG.** *Structure-activity relationships in quinolone antibacterials: design, synthesis and biological activities of novel isothiazoloquinolones.* Drugs Exp Clin Res 1988; **14**: 379-383.
61. **Chu DTW, Fernandes PB.** *Recent developments in the field of quinolone antibacterial agents.* Advances in Drug Research, Vol. **21** (Testa, B., Ed.), pp.39-144. Academic Press, New York 1991.
62. **Chu DTW, Lico IM, Claiborne AK, Plattner JJ, Pernet AG.** *Structure-activity relationship of quinolone antibacterial agents: the effects of C-2 substitution.* Drugs Exp Clin Res 1990; **16**: 215-224.
63. **Chukwuani CM, Coker HA, Oduola AM, Sowunmi A, Ifudu ND.** *Bioavailability of ciprofloxacin and fleroxacin: results of a preliminary investigation in healthy adult Nigerian male volunteers.* Biol Pharm Bull 2000; **23**: 968-972.

64. **Dalhoff A.** *Comparative in vitro and in vivo activity of the C-8 methoxy quinolone moxifloxacin and the C-8 chlorine quinolone BAY y 3118.* Clin Infect Dis 2001; **32** Suppl 1: S16-22.

65. **Dámaso D.** *Quimioterápicos II. Acido Nalidíxico y análogos.* Quinolonas. Fluoroquinolonas 533-538 en Antibacterianos: 24. Marketing Pharm SA. 1990.

66. **Darouiche RO, Hamill RJ.** *Antibiotic penetration of and bactericidal activity within endothelial cells.* Antimicrob Agents Chemother 1994; **38**: 1059-1064.

67. **De Sarro A, De Sarro G.** *Adverse reactions to fluoroquinolones. An overview on mechanistic aspects.* Curr Med Chem 2001; **8**: 371-384.

68. **Dean F, Krasnow MA, Otter R, Matzuk MM, Spengler SJ, Cozzarelli NR.** *Escherichia coli type-I topoisomerases: Identification, mechanism and role in recombination.* Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1982; **47**: 769-777.

69. **Deppermann KM, Lode H.** *Fluoroquinolones: interaction profile during enteral absorption.* Drugs 1993; **45** Suppl 3: 65-72.

70. **Dietz VH, Cook TM, Gross WA.** *Mechanism of action of nalidixic acid on Escherichia coli. III conditions required for lethality.* J Bacteriol 1966; **91**: 768-773.

71. **DiGate RJ, Marians KJ.** *Escherichia coli topoisomerase III-catalyzed cleavage of RNA.* J Biol Chem 1992; **267**: 20532-20535.

72. **Dinardo S, Voelkel KA, Sternglanz R, Reynolds AE, Wright A.** *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutation in DNA gyrase genes. Cell 1982; **31**:43-52.
73. **Domagala JM, Bridges AJ, Culbertson TP, Gambino L, Hagen SE, Karrick G, Porter K, Sanchez JP, Sesnie JA, Spense FG, et al.** Synthesis and biological activity of 5-amino and 5-hydroxyquinolones, and the overwhelming influence of the remote  $N_1$ -substituent in determining the structure-activity relationship. J Med Chem 1991; **34**: 1142-1154.
74. **Domagala JM, Hagen SE, Joannides T, Kiely JS, Laborde E, Schroeder MC, Sesnie JA, Shapiro MA, Suto MJ, Vanderroest S.** Quinolone antibacterials containing the new 7-[3-(1-aminoethyl)-1-pyrrolidinyl] side chain: the effects of the 1-aminoethyl moiety and its stereochemical configurations on potency and in-vivo efficacy. J Med Chem 1993; **36**: 871-882.
75. **Domagala JM, Hanna LD, Heifetz CL, Hutt MP, Mich TF, Sanchez JP, Salomon M.** New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a ADN gyrase assay. J Med Chem 1986; **29**: 394-404.
76. **Domagala JM.** Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. J Antimicrob Chemother 1994; **33**: 685-706.
77. **Dorman CJ, Lynch AS, Bhriain NN, Higgins CF.** DNA supercoiling in *Escherichia coli*: topA mutations can be suppressed by DNA amplifications involving the tolC locus. Mol Microbiol 1989; **3**: 531-540.

78. **Drlica K, Engle EC, Manes SH.** *DNA gyrase on the bacterial chromosome: possibility of two levels of action.* Proc Natl Acad Sci USA 1980; **77**: 6879-6883.

79. **Drlica K, Zhao X.** *DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones.* Microbiol Mol Biol Rev 1997; **61**: 377-392.

80. **Dudley M, Ericson J, Zinner SH.** *Effects of dose on serum pharmacokinetics of intravenous ciprofloxacin with identification and characterization of extravascular compartments using noncompartmental and compartmental pharmacokinetics models.* Antimicrob Agents Chemother 1987; **31**: 1782-1786.

81. **Eagle H, Musselman A.** *The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity, at high concentrations against certain organisms.* J Exp Med 1948; **88**: 99-131.

82. **Easmon CS, Crane JP.** *Uptake of ciprofloxacin by human neutrophils.* J Antimicrob Chemother 1985; **16**: 67-73.

83. **Efthymiopoulos C, Bramer SL, Maroli A.** *Pharmacokinetics of grepafloxacin after oral administration of single and repeat doses in healthy young males.* Clin Pharmacokinet 1997; **33** Suppl 1: 1-8.

84. **Efthymiopoulos C.** *Pharmacokinetics of grepafloxacin.* J Antimicrob Chemother 1997; **40** Suppl A: 35-43.

85. **Elmas M, Tras B, Kaya S, Bas AL, Yazar E, Yarsan E.** *Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular administration in Angora goats.* Can J Vet Res 2001; **65**: 64-67.

86. **Engle EC, Manes SH, Drlica K.** *Differential effects of antibiotics inhibiting gyrase.* J Bacteriol 1982; **149**: 92-98.
87. **Escribano E, Calpena AC, Garrigues TM, Freixas J, Doménech J, Moreno-Dalmau J.** *Structure-absorption relationships of a series of 6-fluoroquinolones.* Antimicrob Agents Chemother 1997; **41**: 1996-2000.
88. **Fagon JY.** *Epidemiology and antibiotic therapy in nosocomial pneumonia.* Rev Pneumol Clin 2001; **57**: 132-138.
89. **Fang G, Brennen C, Wagener M.** *Use of ciprofloxacin versus use of aminoglycosides for therapy of complicated urinary tract infection: Prospective, randomised clinical and pharmacokinetic study.* Antimicrob Agents Chemother 1991; **35**: 1849-1855.
90. **Felmingham D, O'Hare MD, Robbins MJ, Wall RA, Williams AH et al.** *Comparative in vitro studies with 4-quinolones antimicrobials.* Drug Exp Clin Res 1985; **11**: 317-329.
91. **Ferrero L, Cameron B, Manse B, Lagneaux D, Crouzet J, Famechon A, Blanche F.** *Cloning and primary structure of Staphylococcus aureus DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones.* Mol Microbiol 1994; **13**: 641-653.
92. **Fish DN, Chow AT.** *The clinical pharmacokinetics of levofloxacin.* Clin Pharmacokinet 1997; **32**:101-119.
93. **Fisher LM, Austin CA, Hopewell R, Margerrison EE, Oram M, Patel S, Plummer K, Sng JH, Sreedharan S.** *DNA supercoiling and*

*relaxation by ATP-dependent DNA topoisomerases.* Phil Trans Royal Soc Lond Biol Sci 1992; **B 336**: 83-91.

94. **Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services.** *List of drug products that have been withdrawn or removed from the market for reasons of safety or effectiveness.* Federal Register Thursday, October 8, 1998, Vol. **63**, No. 195: 54082-54089.

95. **Freeman CD, Nicolau DP, Belliveau PP, Nightingale CH.** *Lomefloxacin clinical pharmacokinetics.* Clin Pharmacokinet 1993; **25**: 6-19.

96. **Frost RW, Carlson JD, Dietz AJ Jr, Heyd A, Lettieri JT.** *Ciprofloxacin pharmacokinetics after a standar or high-fat/high-calcium breakfast.* J Clin Pharmacol 1989; **29**: 953-955.

97. **Frydman AM, Le Roux Y, Lefebvre MA, Djebbar F, Fourtillan JB, Gaillot J.** *Pharmacokinetics of pefloxacin after repeated intravenous and oral administration (400 mg bid) in young healthy volunteers.* J Antimicrob Chemother 1986; **17** Suppl B: 65-79.

98. **Fukuda H, Hiramatsu K.** *Primary targets of fluoroquinolones in Streptococcus pneumoniae.* Antimicrob Agents Chemother 1999; **43**: 410-412.

99. **Fukuda H, Kishii R, Takei M, Hosaka M.** *Contributions of the 8-methoxy group of gatifloxacin to resistance selectivity, target preference, and antibacterial activity against Streptococcus pneumoniae.* Antimicrob Agents Chemother 2001; **45**: 1649-1653.

100. **Fung-Tomc JC, Gradelski E, Valera L, Kolek B, Bonner DP.** *Comparative killing rates of fluoroquinolones and cell wall-active agents.* Antimicrob Agents Chemother 2000; **44**: 1377-1380.
101. **García I, Pascual A, Guzman MC, Perea EJ.** *Uptake and intracellular activity of sparfloxacin in human polymorphonuclear leukocytes and tissue culture cells.* Antimicrob Agents Chemother 1992; **36**: 1053-1056.
102. **García I, Pascual A, Perea EJ.** *Effect of several antimicrobial agents on ciprofloxacin uptake by human neutrophils.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; **11**: 260-262.
103. **García I, Pascual A, Perea EJ.** *Intracellular penetration and activity of BAY Y 3118 in human polymorphonuclear leukocytes.* Antimicrob Agents Chemother 1994; **38**: 2426-2429.
104. **García-Arata MI, Alarcón T, López-Brea M.** *Emergence of resistant isolates of Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii complex in a Spanish hospital over a five-year period.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; **15**: 512-515.
105. **Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Nash HA.** *DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA.* Proc Natl Acad Sci USA 1976; **73**: 3872-3876.
106. **Gentry LO.** *Therapy with newer oral  $\beta$ -lactam and quinolone agents for infections of the skin and skin structures: a review.* Clin Infect Dis 1992; **14**: 285-297.
107. **Gerster JF.** Ger Pat Ricker 1973; **2**: 264.

108. **Giamarellou H, Kolokythas E, Petrikkos G, Gazis J, Aravantino D, Sfikakis P.** *Pharmacokinetics of three newer quinolones in pregnant and lactating women.* Am J Med 1989; **87** Suppl 5A: 49-51.
109. **Gill MJ, Brenwald NP, Wise R.** *Identification of an efflux pump gene, pmrA, associated with fluoroquinolone resistance in Streptococcus pneumoniae.* Antimicrob Agents Chemother 1999; **43**: 187-189.
110. **Goa KL, Bryson HM., Markhan A.** *Sparfloxacin.* Drugs 1997; **53**: 799-725.
111. **Gootz TD, McGuirk PR, Moynihan MS, Haskell SL.** *Placement of alkyl substituents on the C-7 piperazine ring of fluoroquinolones: dramatic effects on mammalian topoisomerase II and DNA gyrase.* Antimicrob Agents Chemother 1994; **38**: 130-133.
112. **Griffiths NM, Hirst BH, Simmons NL.** *Active intestinal secretion of the fluoroquinolone antibacterials ciprofloxacin, norfloxacin and pefloxacin; a common secretory pathway?* J Pharmacol Exp Ther 1994; **269**: 496-502.
113. **Griffiths NM, Hirst BH, Simmons NL.** *Active secretion of the fluoroquinolone ciprofloxacin by human intestinal epithelial Caco-2 cell layers.* Br J Pharmacol 1993; **108**: 575-576.
114. **Grohe K, Heitzer H.** *Cycloaracylation of enamines. I synthesis of 4-quinolone-3-carboxylic acids.* Liebigs Ann Chem 1987; 29-38.
115. *Grupos terapéuticos y Principios activos de mayor consumo en el Sistema Nacional de Salud durante 1999.* Información Terapéutica de Sistema Nacional de Salud. 2000; vol. **24**, Nº3.

116. **Haemers A, Leysen DC, Bollaert W, Zhang MQ, Pattyn SR.** *Influence of N substitution on antimycobacterial activity of ciprofloxacin.* Antimicrob Agents Chemother 1990; **34**: 496-497.
117. **Hagen SE, Domagala JM, Gracheck SJ, Sesnie JA, Stier MA, Suto MJ.** *Synthesis and antibacterial activity of new quinolones containing a 7-[3-(1-amino-1-methylethyl)-1-pyrrolidinyl] moiety. Gram-positive agents with excellent oral activity and low side-effect potential.* J Med Chem 1994; **37**: 733-738.
118. **Haines GR, Brown MP, Gronwall RR, Merritt KA.** *Serum concentrations and pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intragastric administration to mares.* Can J Vet Res 2000; **64**: 171-177.
119. **Hancock REW.** *Role of porin in outer membrane permeability.* J Bacteriol 1987; **169**: 929-934.
120. **Hansch C, Clayton JM.** *Lipophilic character and biological activity of drugs. II. The parabolic case.* J Pharm Sci 1973; **62**: 1-21.
121. **Hansch C, Dunn WJ 3<sup>rd</sup>.** *Linear relationships between lipophilic character and biological activity of drugs.* J Pharm Sci 1972; **61**: 1-19.
122. **Hansch C.** *Quantitative structure-activity relationships in Drug Design.* In: Drug Design. Ariens EJ Ed., 1<sup>st</sup> ed. New York : Academic Press 1971; vol. **1**: 271-379.
123. **Harrel RM.** *Fluroquinolone-induced tendinopathy: What do we know?* South Med J 1999; **92**: 622-625.
124. **Heaton VJ, Ambler JE, Fisher LM.** *Potent antineumococcal activity of gemifloxacin is associated with dual targeting of gyrase and*

*topoisomerase IV, an in vivo target preference for gyrase, and enhanced stabilization of cleavage complexes in vitro.* Antimicrob Agents Chemother 2000; **44**: 3112-3117.

125. **Heaton VJ, Goldsmith CG, Ambler JE, Fisher LM.** *Activity of gemifloxacin against penicillin- and ciprofloxacin-resistant Streptococcus pneumoniae displaying topoisomerase- and efflux- mediated resistance mechanisms.* Antimicrob Agents Chemother 1999; **43**: 2998-3000.

126. **Heisig P.** *Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother 1996; **40**: 879-855.

127. **Higgins NP, Peebles CL, Suguino A, Cozzarelli NR.** *Purification of subunits of Escherichia coli DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity.* Proc Natl Acad Sci USA 1978; **75**: 1773-1777.

128. **Höffken G, Lode H, Prinzing C, Borner K, Koeppe P.** *Pharmacokinetic of ciprofloxacin after oral and parenteral administration.* Antimicrob Agents Chemother 1985; **27**: 375-379.

129. **Höffler D, Dalhoff A, Gau W, Beermann D, Michl A.** *Dose- and sex-independent disposition of ciprofloxacin.* Eur J Clin Microbiol 1984; **3**: 363-366.

130. **Hooper DC.** *Clinical applications of quinolones.* Biochim Biophys Acta 1998; **1400** (1-3): 45-61.

131. **Hooper DC.** *New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance.* Clin Infect Dis 2000; **30**: 243-254.

132. **Hooper DC.** *Quinolone mode of action.* Drugs 1995; **49** suppl 2: 10-15.
133. **Huband MD, Cohen MA, Meservey MA, Roland GE, Yoder SL, Dazer ME, Domagala JM.** *In vitro antibacterial activities of PD 138312 and PD 140248, new fluoronaphthyridines with outstanding Gram positive potency.* Antimicrob Agents Chemother 1993; **37**: 2563-2570.
134. **Hurault de Ligny B, Sirbat D, Kessler M, Trechot P, Chanliau J.** *Effets secondaires oculaires de la fluméquine. Trois observations d'atteintes maculaires.* Therapie 1984; **39**: 595-600.
135. **Hyatt JM, McKinnon PS, Zimmer GS, Schentag JJ.** *The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents.* Clin Pharmacokinet 1995; **28**: 143-160.
136. **Imada T, Miyazaki S, Nishida M, Yamaguchi K, Goto S.** *In vitro and in vivo antibacterial activities of a new quinolone, OPC-17116.* Antimicrob Agents Chemother 1992; **36**: 573-579.
137. **Irwing VP, Quigley JM, Tinseny RF.** *Quantitative relationships between in vitro antibacterial activities of cephalosporins and their n-octanol/water partition coefficients.* Int J Pharm 1987; **34**: 241-246.
138. **Ito A, Hirai K, Inoue M, Koga H, Suzue S, Irikura T, Mitsuhashi S.** *In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog.* Antimicrob Agents Chemother 1980; **17**:103-138.

139. **Ito T, Otsuki M, Nishino T.** *In-vitro antibacterial activity of Q-35, a new fluoroquinolone.* Antimicrob Agents Chemother 1992; **36**: 1708-1714.
140. **Jacobs MR.** *Activity of quinolones against mycobacteria.* Drugs 1999; **59** Suppl 2: 19-22.
141. **Jiménez T, Cantón E, Ramón MS, Gobernado M.** *Estudio cinético de la actividad bactericida de lomefloxacino sobre S. aureus Sa-1 y P. aeruginosa Psa-1.* Rev Esp Quimioterap 1990; **3**: 357-361.
142. **Johnson PC, Ericsson CD, Morgan DR, Dupont HL, Cabada FJ.** *Lack of emergence of resistant fecal flora during successful prophylaxis of traveler's diarrhea with norfloxacin.* Antimicrob Agents Chemother 1986; **30**: 671-674.
143. **Jones RN.** *Perspectives on the development of new antimicrobial agents for resistant gram-positive pathogens.* Braz J Infect Dis 2000; **4**: 1-8.
144. **Juliano C, Piu L, Gavini E, Zanetti S, Fadda G.** *In vitro antibacterial activity of antiseptics against vaginal lactobacilli.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; **11**: 1166-1169.
145. **Kato J, Nishimura Y, Imamura R, Niki H, Higara S, Suzuki H.** *New topoisomerase essential for chromosome segregation in E. coli.* Cell 1990; **63**: 393-404.
146. **Kenny GE, Cartwright FD.** *Susceptibilities of Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum to a new quinolone, trovafloxacin (CP-99219).* Antimicrob Agents Chemother 1996; **40**: 1048-1049.

147. **Kevan L, Wang JC.** *Deoxyribonucleic acid gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base-pairs of deoxyribonucleic acid and  $\alpha_2\beta_2$  protein core.* Biochemistry 1980; **19**: 5229-5234.
148. **Khodursky AB, Cozzarelli NR.** *The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials.* J Biol Chem 1998; **273**: 27668-27677.
149. **Kidwai M, Misra P, Kumar R.** *The fluorinated quinolones.* Curr Pharm Des 1998; **4**: 101-118.
150. **Klopman G, Fercu D, Renau TE, Jacobs MR.** *N-1-tert-butyl-substituted quinolones: in vitro anti-Mycobacterium avium activities and structure-activity relationship studies.* Antimicrob Agents Chemother 1996; **40**: 2637-2643.
151. **Koga H.** *Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8- disubstitutes 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids.* J Med Chem 1980; **23**: 1358-1363.
152. **Komatsu Y, Yoshida S, Mitsuhashi S.** *Antibacterial activity of Y-26611, a new quinolone.* Program and Abstracts of the Thirty-First Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, IL, 1991. Abstract 1500. American Society for Microbiology Washington, DC.
153. **Korten V, Huang WM, Murray BE.** *Analysis by PCR and direct DNA sequencing of gyrA mutations associated with fluoroquinolone*

*resistance in Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 1994; **38**: 2091-2094.

154. **Korten V, Tomayko JF, Murray BE**. *Comparative in vitro activity of DU 6859a, a new fluoroquinolone agent, against gram-positive-cocci*. Antimicrob Agents Chemother 1994; **38**: 611-615.

155. **Krcmery VJr**. *The use of quinolones as therapy in granulocytopenic cancer patients. Comparison with other antimicrobials*. Drugs 1995; **49** Suppl 2:139-143.

156. **Kubinyi H, Kehrhahn OH**. *Quantitative structure-activity relationships. VI. Non-linear dependence of biological activity on hydrophobic character: calculation procedures for bilinear model*. Arzneimittelforschung 1978; **28**: 598-601.

157. **Kubinyi H**. *Lipophilicity and biological activity. Drug transport and drug distribution in model systems and in biological systems*. Arzneimittelforschung 1979; **29**: 1067-1080.

158. **Kubinyi H**. *Nonlinear dependence of biological activity on hydrophobic character: the bilinear model*. Farmaco [Sci] 1979; **34**: 248-276.

159. **Kubinyi H**. *Quantitative structure-activity relationships. IV. Non-linear dependence of biological activity on hydrophobic character: a new model*. Arzneimittelforschung 1976; **26**: 1991-1997.

160. **Kung K, Riond JL, Wanner M**. *Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral*

*administration of enrofloxacin in dogs.* J Vet Pharmacol Ther 1993; **16**: 462-468.

161. **Lamp KC, Bailey EM, Rybak MJ.** *Ofloxacin clinical pharmacokinetics.* Clin Pharmacokinet 1992; **22**: 32-46.

162. **Le Bel M, Vallee F, Bergeron MG.** *Tissue penetration of ciprofloxacin after single and multiple doses.* Antimicrob Agents Chemother 1986; **29**: 501-505.

163. **Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP.** *1,8 naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents.* J Med Pharm Chem 1962; **5**: 1063-1065.

164. **Lettieri JT, Rogge MC, Kaiser L, Echols RM, Heller AH.** *Pharmacokinetic profiles of ciprofloxacin after single intravenous and oral doses.* Antimicrob Agents Chemother 1992; **36**: 993-996.

165. **Levêque D, Jehl F.** *P-glycoprotein and pharmacokinetics.* Anticancer Res 1995; **15**: 331-336.

166. **Levine C, Hiasa H, Marians KJ.** *DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities.* Biochim Biophys Acta 1998; **1400** (1-3): 29-43.

167. **Lew DP, Waldvogel FA.** *Use of quinolones in osteomyelitis and infected orthopaedic prosthesis.* Drugs 1999; **58** Suppl 2: 85-91.

168. **Lewin CS, Amyes SGB, Smith JT.** *Bactericidal activity of enoxacin and lomefloxacin against Escherichia coli KL16.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; **8**: 731-733.

169. **Lewin CS, Amyes SGB.** *Bactericidal action of PD127,391, an enhanced spectrum quinolone.* J Med Microbiol 1990; **33**: 67-70.

170. **Lewin CS, Howard BM, Ratcliffe NT, Smith JT.** *4-quinolones and the SOS response.* J Med Microbiol 1989; **29**: 139-144.

171. **Lewin CS, Howard BM, Smith JT.** *Protein- and RNA-synthesis independent bactericidal activity of ciprofloxacin that involves the A subunit of DNA gyrase.* J Med Microbiol 1991; **34**: 19-22.

172. **Lewin CS, Morrissey I, Smith JT.** *The fluoroquinolones exert a reduced rate of kill against Enterococcus faecalis.* J Pharm Pharmacol 1991; **43**: 492-494.

173. **Lewin CS, Smith JT.** *Bactericidal activity of ciprofloxacin against Staphylococcus aureus.* J Antimicrob Chemother 1989; **24**: 84-85.

174. **Lewin CS, Smith JT.** *Bactericidal mechanisms of ofloxacin.* J Antimicrob Chemother 1988; **22** Suppl C: 1-8.

175. **Li W, Wang JC.** *Mammalian DNA topoisomerase III $\alpha$  is essential in early embryogenesis.* Proc Natl Acad Sci USA 1998; **95**:1010-1013.

176. **Lien EJ, Hansch C, Anderson SM.** *Structure-activity correlations for antibacterial agents on gram-positive and gram-negative cells.* J Med Chem 1968; **11**: 430-441.

177. **Lien EJ.** *Structure-Absorption-Distribution Relationships: Significance for Drug Desing. Antibacterial and Antifungal Agents.* En Drug Desing vol. **5**. Ed. EJ Ariëns. Academic Press Inc. London 1975; pp 111-119.

178. **Lode H, Höffken G, Boeckk M, Deppermann N, Borner K, Koeppe P.** *Quinolone pharmacokinetics and metabolism.* J Antimicrob Chemother 1990; **26** Suppl B: 41-49.
179. **Lode H, Höffken G, Borner K, Koeppe P.** *Unique aspects of quinolone pharmacokinetics.* Clin Pharmacokin 1989; **16** Suppl 1: 1- 4.
180. **Lode H, Vorgel F, Elies W.** *Grepafloxacin: a review of its safety profile based on clinical and postmarketing surveillance.* Clin Ther 1999; **21**: 61-47.
181. **Lode H.** *Evidence of different profiles of side effects and drug-drug interactions among the quinolones-the pharmacokinetic standpoint.* Chemotherapy 2001; **47** Suppl 3: 24-31; discussion 44-48.
182. **Lorian V, Silletti RP, Biondo FX, De Freitas CC.** *Paradoxical effect of aminoglycoside antibiotics on the growth of Gram-negative bacilli.* J Antimicrob Chemother 1979; **5**: 613-616.
183. **Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Kikaido H, Hearst JE.** *Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*.* J Mol Microbiol 1995; **16**: 45-55.
184. **Ma Z, Chu DT, Cooper CS, Li Q, Fung AK, Wang S, Shen LL, Flamm RK, Nilus AM, Alder JD, Meulbroek JA, Or YS.** *Synthesis and antimicrobial activity of 4H-4-oxoquinolizine derivatives: consequences of structural modification at the C-8 position.* J Med Chem 1999; **42**: 4202-4213.

**Bibliografia 314**

185. **Madigan MT, Martinko JM, Parker J.** *Brock Biology of Microorganisms*, 8<sup>th</sup> edn. Prentice Hall Inc. Simon and Schuster/A Viacom Company. Upper Saddle River, N.J., USA. 1997 pp. 62-83.

186. **Manes SH, Pruss GJ, Drlica K.** *Inhibition of RNA synthesis by oxolinic acid is unrelated to average DNA supercoiling.* J Bacteriol 1983; **155**: 420-423.

187. **Marrie TJ** *Community-acquired pneumonia: epidemiology, etiology, treatment.* Infect Dis Clin North Am 1998; **12**: 723-740.

188. **Marrie TJ.** *Community-acquired pneumonia.* Clin Infect Dis 1994; **18**: 501-513.

189. **Marrie TJ.** *Pneumococcal pneumonia: epidemiology and clinical features.* Semin Respir Infect 1999; **14**: 227-236.

190. **McEvoy GK.** *Quinolones.* En American Hospital Formulary Service. Drug Information: 426-444. American Society of Hospital Pharmacists Inc. Bethesda. 1991.

191. **McQueen CA, Way BM, Queener SM, Schluter G, Williams GM.** *Study of potential in vitro and in vivo genotoxicity in hepatocytes of quinolone antibiotics.* Toxicol Appl Pharmacol 1991; **111**: 255-262.

192. **Melnik G, Schwesinger WH, Teng R, Dogolo LC, Vincent J.** *Hepatobiliary elimination of trovafloxacin and metabolites following single oral doses in healthy volunteers.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; **17**: 424-426.

193. **Merino V, Freixas J, Bermejo MV, Garrigues TM, Moreno-Dalmau J, Plá-Delfina JM.** *Biophysical models as an approach to study*

*passive absorption in drug development: 6-fluoroquinolones.* J Pharm Sci 1995; **84**: 777-782.

194. **Merino V, Martín-Algarra RV, Rocher A, Garrigues TM, Freixas J, Polache A.** *Effects of ethanol on intestinal absorption of drugs. I. In situ studies with ciprofloxacin analogs in normal and chronic alcohol-fed rats.* Alcohol Clin Exp Res 1997; **21**: 326-333.

195. **Mevius DJ, Breukink HJ, Van Miert AS.** *In vitro activity of flumequine in comparison with several other antimicrobial agents against five pathogens isolated in calves in the Netherlands.* Vet Q 1990; **12**, 212-220.

196. **Mitscher LA, Zavod RM, Sharma PN.** *Structure-activity relationships of the newer quinolone antibacterial agents.* En: Fernandes PB ed, Quinolones. Barcelona: Prous Science Publishers, 1989: 3-20.

197. **Mitsuhashi S.** *Fluorinated quinolones-new quinolone antimicrobials.* Progress in Drug Research, Vol. **38** (Junker, E., Ed.), pp. 9-148. Birkhäuser Verlag, Basle 1992.

198. **Mitsuyama J.** *Structures of existing and new quinolones and relationship to bactericidal activity against Streptococcus pneumoniae.* J Antimicrob Chemother 1999; **44**: 201-207.

199. **Mizuuchi K, Fisher LM, O'Dea MH, Gellert M.** *DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA.* Proc Natl Acad Sci USA 1980; **77**: 1847-1851.

200. **Mizuuchi K, O'Dea MH, Gellert M.** *DNA gyrase: subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme.* Proc the Natl Acad Sci USA 1978; **75**: 5960-5963.

201. **Morais Cabral JH, Jackson AP, Smith CV, Shikotra N, Maxwell A, Liddington RC.** *Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase.* Nature 1997; **388**: 903-906.

202. **Morham SG, Kluckman KD, Voulomanos N, Smithies O.** *Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection.* Mol Cell Biol 1996; **16**: 6804-6809.

203. **Morrissey I.** *Bactericidal index: a new way to assess quinolone bactericidal activity in vitro.* J Antimicrob Chemother 1997; **39**: 713-717.

204. **Muñoz R, De la Campa AG.** *ParC subunit of DNA topoisomerase IV of Streptococcus pneumoniae is a primary target of quinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype.* Antimicrob Agents Chemother 1996; **40**: 2252-2257.

205. **Naber KG.** *Use of quinolones in urinary tract infections and prostatitis.* Rev Infect Dis 1989; **11** Suppl 5: S1321-S1337.

206. **Nakamura S.** *Mechanisms of quinolone resistance.* J Infect Chemother 1997; **3**:128-138.

207. **Nakane T, Iyobe S, Sato K, Mitsuhashi S.** *In vitro antibacterial activity of DU 6859a, a new fluoroquinolone.* Antimicrob Agents Chemother 1995; **39**: 2822-2826.

208. **Naruhashi K, Tamai I, Inoue N, Muraoka H, Sai Y, Suzuki N, Tsuji A** *Active intestinal secretion of new quinolone antimicrobials and the*

*partial contribution of P-glycoprotein.* J Pharm Pharmacol 2001; **53**: 699-709.

209. **National Committee for clinical laboratory Standards.** *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.* Approved standard M7-A5, 5th ed. NCCLS, Wayne, Pa. 2000.

210. **National Committee for clinical laboratory Standards.** *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents.* Approved standard M26-A. NCCLS, Wayne, Pa. 1999.

211. **Neu HC.** *Chemical evolution of the fluoroquinolone antimicrobial agents.* Am J Med 1989; **87** Suppl 6C: 2S-9S.

212. **Neuman M.** *Clinical pharmacokinetics of the newer antibacterial 4-quinolones.* Clin Pharmacokin 1988; **14**: 96-121.

213. **Neuvonen PJ, Kivisto KT, Lehto P.** *Interference of dairy products with the absorption of ciprofloxacin.* Clin Pharmacol Ther 1991; **50** (5 Pt 1): 498-502.

214. **Neyfakh AA, Bidnenko VE, Chen LB.** *Efflux-mediated multidrug resistance in Bacillus subtilis: similarities and dissimilarities with the mammalian system.* Proc Natl Acad Sci USA 1991; **88**: 4781-4785.

215. **Neyfakh AA.** *The multidrug efflux transporter of Bacillus subtilis is a structural and functional homolog of the Staphylococcus NorA protein.* Antimicrob Agents Chemother 1992; **36**: 484-485.

216. **Ng EYW, Trucksis M, Hooper DC.** *Quinolone resistance mediated by norA: physiologic characterization and relationship to flqB, a*

*quinolone resistance locus on the Staphylococcus aureus chromosome.* Antimicrob Agents Chemother 1994; **38**: 1345-1355.

217. **Ng EYW, Trucksis M, Hooper DC.** *Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: relationship to the flqA locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother 1996; **40**: 1881-1888.

218. **Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, Bass JB, Broughton WA, Campbell GD, Dean N, File T, Fine MJ, Gross PA, Martinez F, Marrie TJ, Plouffe JF, Ramirez J, Sarosi GA, Torres A, Wilson R, Yu VL; American Thoracic Society.** *Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention.* Am J Respir Crit Care Med 2001; **163**: 1730-1754.

219. **Nikaido H, Thanassi DG.** *Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples.* Antimicrob Agents Chemoter 1993; **37**: 1393-1399.

220. **Nikaido H, Zgurskaya HI.** *AcrAB and related multidrug efflux pumps of Escherichia coli.* J Mol Microbiol Biotechnol 2001; **3**: 215-218.

221. **Nikaido H.** *Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria.* J Bacteriol 1996; **178**: 5853-5859.

222. **Nikaido H.** *Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria.* Semin Cell Dev Biol 2001; **12**: 215-23.
223. **Niki Y, Itokawa K, Okazaki O.** *Effects of DU-6859a, a new quinolone antimicrobial, on theophylline metabolism in in vitro and in vivo studies.* Antimicrob Agents Chemother 1998; **42**: 1751-1755.
224. **Nix DE, Norman A, Schentag JJ.** *Inhibition of norfloxacin absorption by antacids.* Antimicrob Agents Chemother 1990; **34**: 432-435.
225. **Ozaki M, Tomii Y, Matsuda M, Segawa J, Kitano M, Kise M, Nishino T.** *In vivo antibacterial activity of a prodrug of NM394, a thiazetoquinoline carboxylic acid derivative.* Chemotherapy 1998; **44**: 21-30.
226. **Pan X-S, Ambler J, Mehtar S, Fisher LM.** *Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in Streptococcus pneumoniae.* Antimicrob Agents Chemother 1996; **40**: 2321-2326.
227. **Pan X-S, Fisher LM.** *Cloning and characterization of the parC and parE genes of Streptococcus pneumoniae encoding DNA topoisomerase IV: role in fluoroquinolone resistance.* J Bacteriol 1996; **178**: 4060-4069.
228. **Pan X-S, Fisher LM.** *DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in Streptococcus pneumoniae.* Antimicrob Agents Chemother 1998; **42**: 2810-2816.
229. **Pan X-S, Fisher LM.** *Streptococcus pneumoniae DNA gyrase and topoisomerase IV: overexpression, purification and differential inhibition by fluoroquinolones.* Antimicrob Agents Chemother 1999; **43**: 1129-1136.

**Bibliografía 320**

230. **Pan X-S, Fisher LM.** *Targeting of DNA gyrase in Streptococcus pneumoniae by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones.* Antimicrob Agents Chemother 1997; **41**: 471-474.

231. **Pascual A, García I, Ballesta S, Perea EJ.** *Uptake and intracellular activity of trovafloxacin in human phagocytes and tissue-cultured epithelial cells.* Antimicrob Agents Chemother 1997; **41**: 274-277.

232. **Pascual A, García I, Perea EJ.** *Effect of antimicrobial agents on the uptake of ofloxacin and its optically active isomer (-)-ofloxacin by human polymorphonuclear leucocytes.* J Antimicrob Chemother 1991; **28**: 727-730.

233. **Pascual A, García I, Perea EJ.** *Entry of lomefloxacin and temafloxacin into human neutrophils, peritoneal macrophages, and tissue culture cells.* Diagn Microbiol Infect Dis 1992; **15**: 393-398.

234. **Pastor A, Cantón E, Gobernado M.** *Efecto postantibiótico (EPA). I. Métodos de estudio y factores influyentes.* Rev Esp Quinioterap 1992; **5**: 201-210.

235. **Pastor A, Cantón E, Gobernado M.** *Efecto postantibiótico (EPA). II. Antimicrobianos en que se ha descrito EPA, con especial referencia a las quinolonas.* Rev Esp Quinioterap 1992; **5**: 211-218.

236. **Pemán J, Cantón E, Ramón MS, Jiménez MT, Gobernado M.** *Penetración y actividad de los antimicrobianos en el interior de los fagocitos.* Rev Esp Quinioterap 1991; **4**: 27-36.

237. **Pestova E, Beyer R, Cianciotto NP, Noskin GA, Peterson LR.** *Contribution of topoisomerase IV and DNA gyrase mutations in*

*Streptococcus pneumoniae* to resistance to novel fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 1999; **43**: 2000-2004.

238. **Pestova E, Millichap JJ, Noskin GA, Peterson LR.** *Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones.* J Antimicrob Chemother 2000; **45**: 583-590.

239. **Piddock LJV, Jin YF, Griggs DJ.** *Effect of hydrophobicity and molecular mass on the accumulation of fluoroquinolones by Staphylococcus aureus.* J Antimicrob Chemother 2001; **47**: 261-270.

240. **Piddock LJV.** *New quinolones and gram-positive bacteria.* Antimicrob Agents Chemother 1994; **38**: 163-169.

241. **Plá-Delfina JM, Pérez-Buendía MD, Casabó VG, Peris-Ribera JE, Sánchez-Moyano E, Martín-Villodre A.** *Absorption-partition relationships for true homologous series of xenobiotics as a possible approach to study mechanisms of surfactants in absorption. Aromatic amines in rat colon.* Int J Phar 1987; **37**: 49-64.

242. **Poole K, Krebs K, McNally C, Neshat S.** *Multiple antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: evidence for involvement of an efflux operon.* J Bacteriol 1993; **175**: 7363-7372.

243. **Prescott JF, Yielding KM.** *In vitro susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin.* Can J Vet Res 1990; **54**: 195-197.

244. **Price JR.** *Some reactions of 1-methyl-4quinolone-3carboxylic acid, a degradation product of alcaloids.* J Sci Res 1949; **217**: 272-281.

245. **Ramón MS, Cantón E, Pemán J, Pastor A, Martínez JP.** *Mechanisms of action of quinolones against staphylococci and relationship with their in vitro bactericidal activity.* Chemotherapy 1999; **45**: 175-182.

246. **Rao GS, Ramesh S, Ahmad AH, Tripathi HC, Sharma LD, Malik JK.** *Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intramuscular administration of enrofloxacin in goats.* Vet Res Commun 2001; **25**: 197-204.

247. **Ratcliffe NT, Smith JT.** *Ciprofloxacin and ofloxacin exhibit a rifampicin-resistant bactericidal mechanism not detectable in other 4-quinolone antibacterial agents.* J Pharm Pharmacol 1984; **36**: 59.

248. **Ratcliffe NT, Smith JT.** *Norfloxacin has a novel bactericidal mechanism unrelated to that of other 4-quinolones.* J Pharm Pharmacol 1985; **37**: Sppl 2P-93P.

249. **Remuzon P, Bouzard D, Guiol C, Jacquet JP.** *Fluoronaphthyridines as antibacterial agents. 6. Synthesis and structure-activity relationships of new chiral 7-(1-, 3-, 4-, and 6-methyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)naphthyridine analogues of 7-[(1R,4R)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-yl]-1-(1,1-dimethylethyl)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid. Influence of the configuration on blood pressure in dogs. A quinolone-class effect.* J Med Chem 1992; **35**: 2898-2909.

250. **Renau TE, Gage JW, Dever JA, Roland GE, Joannides ET, Shapiro MA, Sanchez JP, Gracheck SJ, Domagala JM, Jacobs MR, Reynolds RC.** *Structure-activity relationships of quinolone agents against*

*mycobacteria: effect of structural modifications at the 8 position.* Antimicrob Agents Chemother 1996; **40**: 2363-2368.

251. **Renau TE, Sanchez JP, Gage JW, Dever JA, Shapiro MA, Gracheck SJ, Domagala JM.** *Structure-activity relationships of the quinolone antibacterials against mycobacteria: effect of structural changes at N<sub>1</sub> and C<sub>7</sub>.* J Med Chem 1996; **39**: 729-735.

252. **Ridgway GL.** *Quinolones in sexually transmitted diseases: state of the art.* Drugs 1999; **58** Suppl 2: 92-95.

253. **Rohlfing SR, Gerster JF, Kvam DC.** *Bioevaluation of the antibacterial flumequine for urinary tract use.* Antimicrob Agents Chemother 1976; **10**: 20-24.

254. **Rohlfing SR, Gerster JF, Kvam DC.** *Bioevaluation of the antibacterial flumequine for enteric use.* J Antimicrob Chemother 1977; **3**: 615-20.

255. **Rohwedder RW, Bergan T, Thorsteinsson SB, Scholl H.** *Transintestinal elimination of ciprofloxacin.* Chemotherapy 1990; **36**: 77-84.

256. **Ronald A.** *The quinolones and renal infection.* Drugs 1999; **58** Suppl 2: 96-98.

257. **Rose TF, Ellis-Pegler R, Collins J, Small M.** *Oral pefloxacin mesylate in the treatment of continuous ambulatory peritoneal dialysis associated peritonitis: An open non-comparative study.* J Antimicrob Chemother 1990; **25**: 853-859.

258. **Roy C, Segura C.** *Las nuevas quinolonas.* Medicina 1986; **73**: 73-79.

259. **Sanchez JP, Domagala JM, Hagen SE, Heifetz CL, Hutt MP, Nichols JB, Trehan AK.** *Quinolone antibacterial agents. Synthesis and structure-activity relationships of 8-substituted quinoline-3-carboxylic acids and 1,8-naphthyridine-3-carboxylic acids.* J Med Chem 1988; **31**: 983-991.
260. **Sánchez-Castaño G, Ruíz-García A, Bañón N, Bermejo MV, Merino V, Freixas J, Garrigues TM, Plá-Delfina JM.** *Intrinsic absolute bioavailability prediction based on in situ absorption rate constants, and/or in vitro partition coefficients: 6-fluoroquinolones.* J Pharm Sci 2000; **89**: 1395-1403.
261. **Schinkel AH.** *Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice.* Int J Clin Pharmacol Ther 1998; **36**: 9-13.
262. **Schinkel AH.** *The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins.* Semin Cancer Biol 1997; **8**: 161-170.
263. **Schulte JM, Schmid GP.** *Recommendations for treatment of chancroid.* Clin Infect. Dis 1993; **20**: S39-S46.
264. **Seelig A, Landwojtowicz E.** *Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers.* Eur J Pharm Sci 2000; **12**: 31-40.
265. **Segev S, Rehavi M, Rubinstein E.** *Quinolones, theophylline, and diclofenac interactions with the gamma-aminobutyric acid receptor.* Antimicrob Agents Chemother 1988; **32**: 1624-1626.
266. **Shah PM, Troche G, Stille W.** *Effect of concentration on bactericidal activity of cefotaxime.* J Antimicrob Chemother 1979; **5**: 419-422.

267. **Shapiro MA, Dever JA, Joannides ET, Sesnie JC, Vanderroest SR.** *In vivo therapeutic efficacies of PD 138312 and PD 140248, two novel fluoronaphthyridines with outstanding gram-positive potency.* Antimicrob Agents Chemother 1995; **39**: 2183-2186.
268. **Shen LL, Mitscher LA, Sharma PN, O'Donnell TJ, Chu DW, Cooper CS, Rosen T, Pernet AG.** *Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model.* Biochemistry 1989; **28**: 3886-3894.
269. **Shiba K, Sakamoto M, Nakazawa Y, Sakai O.** *Effects of antacid on absorption and excretion of new quinolones.* Drugs 1995; **49** Suppl 2: 360-361.
270. **Shimada J, Yamaji T, Ueda Y, Uchida H, Kusajima H, Irikura T.** *Mechanism of renal excretion of AM-715, a new quinolonecarboxylic acid derivative, in rabbits, dogs and humans.* Antimicrob Agents Chemother 1983; **23**: 1-7.
271. **Shimizu M, Nakamura S, Takase Y.** *Piromidic acid, a new antibacterial agent: antibacterial properties.* Antimicrob Agents Chemother 1970; **10**: 117-122.
272. **Shimuzu M, Takase Y, Nakamura S, Katae H, Minami A, Nakata K, Inoue S, Ishiyama M and Kubo Y.** *Pipemidic acid, a new antibacterial agent active against Pseudomonas aeruginosa: in vitro proprieties.* Antimicrob Agents Chemother 1975; **8**: 132-138.
273. **Smith JT.** *The mode of action of 4-quinolones and possible mechanism of resistance.* J Antimicrob Chemother 1986; **18** Sppl D: 21-29.

274. **Solomkin JS, Dellinger EP, Bohnen JM, Rostein OD.** *The role of oral antimicrobials for the management of intra-abdominal infections.* New Horiz 1998; **6** (2 Suppl):S46-52.

275. **Solomkin JS, Wilson SE, Christou NV, Rotstein OD, Dellinger EP, Bennion RS, Pak R, Tack K.** *Results of a clinical trial of clinafloxacin versus imipenem/cilastatin for intraabdominal infections.* Ann Surg 2001; **233**: 79-87.

276. **Srivenugopal KS, Lockshon D, Morris DR.** *Escherichia coli DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme.* Biochemistry 1984; **23**: 1899-1906.

277. **Stahlmann R, Lode H.** *Toxicity of quinolones.* Drugs 1999; **58** Suppl 2: 37-42.

278. **Stass H, Kubitzka D.** *Pharmacokinetics and elimination of moxifloxacin after oral and intravenous administration in man.* J Antimicrob Chemother 1999; **43** Suppl B: 83-90.

279. **Stein GE.** *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of newer fluoroquinolones.* Clin Infect Dis 1996; **23** Suppl 1: S19-S24.

280. **Stewart BH, Chan OH, Jezyk N, Fleiser D.** *Discrimination between drug candidates using models for evaluation of intestinal absorption.* Adv Drug Deliv Rev 1997; **23**: 27-45.

281. **Suto MJ, Domagala JM, Roland GE, Mailloux GB, Cohen MA.** *Fluoroquinolones: relationships between structural variations, mammalian cell cytotoxicity, and antimicrobial activity.* J Med Chem 1992; **35**: 4745-4750.

282. **Swanson BN, Boppana VK, Vlasses PH, Rotmensch HH, Ferguson RK.** *Norfloxacin disposition after sequentially increasing oral doses.* *Antimicrob Agents Chemother* 1983; **23**: 284-288.

283. **Tabarrini O, Sissi C, Fravolini A, Palumbo M.** *6-hydroxy derivative as new desfluoroquinolone (DFQ): synthesis and DNA-binding study.* *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2000; **19**:1327-1336.

284. **Takenouchi T, Tabata F, Iwata Y, Hanzawa H, Sugawara M, Ohya S.** *Hydrophilicity of quinolones is not an exclusive factor for decrease activity in efflux-mediated resistant mutants of staphylococcus aureus.* *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 1835-1842.

285. **Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, Cole ST, Jacobs WR Jr, Telenti A.** *Cloning and nucleotide sequence of Mycobacterium tuberculosis gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations.* *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**: 773-780.

286. **Taléns R.** *Actividad antimicrobiana de homólogos del ciprofloxacino.* Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia 1999.

287. **Talley JH.** *Fluoroquinolones. New miracle drugs?.* *Postgrad Med* 1991; **89**: 101-103, 106-108, 111-113.

288. **Tamai I.** *Molecular characterization of intestinal absorption of drugs by carrier-mediated transport mechanisms.* *Yakugaku Zasshi* 1997; **117**: 415-434.

289. **Tartaglione TA, Raffalovich AC, Poynor WJ, Espinelingroff A, Kerkering TM.** *Pharmacokinetics and tolerance of ciprofloxacin after sequential increasing oral doses.* Antimicrob Agents Chemother 1986; **29**: 62-66.

290. **Teng R, Liston TE, Harris SC.** *Multiple-dose pharmacokinetics and safety of trovafloxacin in healthy volunteers.* J Antimicrob Chemother 1996; **37**: 955-963.

291. **Trucksis M, Depew R.** *Identification and localization of a gene that specifies production of Escherichia coli DNA topoisomerase I.* Proc Natl Acad Sci USA 1981; **78**: 2164-2168.

292. **Tse-Dinh YC, Wang JC.** *Complete nucleotide sequence of the topA gene encoding Escherichia coli DNA topoisomerase I.* J Mol Biol 1986; **191**: 321-331.

293. **Tsuji A, Sato H, Kume Y, Tamai I, Okezaki E, Nagata O, Kato H.** *Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on gamma-aminobutyric acid binding to receptor sites in rat brain membranes.* Antimicrob Agents Chemother 1988; **32**: 190-194.

294. **Tulkens PM.** *Intracellular pharmacokinetics and localization of antibiotics as predictors of their efficacy against intraphagocytic infections.* Scand J Infect Dis 1990; (Suppl 74): 209-217.

295. **Turner FJ, Ringel SM, Martin JF, Storino PJ, Daly JM, Schwartz BS.** *Oxolinic acid, a new synthetic antimicrobial agent. I. In vitro and in vivo activity.* Antimicrob Agents Chemother 1967; **7**: 475-479.

296. **Turnidge JD, Gudmundsson S, Vogelmann B, Craig WA.** *The postantibiotic effect of antifungal agents against common pathogenic yeasts.* J Antimicrob Chemother 1994; **34**: 83-92.
297. **Ubukata K, Itoh-Yamashita N, Konno M.** *Cloning and expression of the norA gene for fluoroquinolone resistance in Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother 1989; **33**: 1535-1539.
298. **Van Asperen J, Van Tellingen O, Beijnen JH.** *The pharmacological role of P-glycoprotein in the intestinal epithelium.* Pharmacol Res 1998; **37**: 429-435.
299. **Van der Auwera P.** *Interactions between antibiotics and phagocytosis in bacterial killing.* Scand J Infect Dis 1990; (Suppl 74): 42-48.
300. **Vance-Bryan K, Guay DRP, Rotschafer JC.** *Clinical pharmacokinetics of ciprofloxacin.* Clin Pharmacokinet 1990; **19**: 434-61.
301. **Vazquez JL, Merino S, Domenech O, Berlanga M, Vinas M, Montero MT, Hernandez-Borrell J.** *Determination of the partition coefficients of a homologous series of ciprofloxacin: influence of the N-4 piperazinyl alkylation on the antimicrobial activity.* Int J Pharm 2001; **220**: 53-62.
302. **Wagner J.G.** *Measures of fit.* En "Pharmacokinetics for the pharmaceutical scientist", Lancaster. Pennsylvania 1993; **17**, 293-298.
303. **Wakebe H and Mitsuhashi S.** *Comparative in vitro activities of a new quinolone, OPC-17116, possessing potent activity against gram-positive bacteria.* Antimicrob Agents Chemother 1992; **36**: 2185-2191.

**Bibliografia 330**

304. **Wang JC.** *DNA topoisomerases.* Annu Rev Biochem 1996; **65**: 635-692.
305. **Wang JC.** *Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega.* J Mol Biol 1971; **55**: 523-533.
306. **Weidekamm E, Portmann R, Suter K, Partos C, Dell D, Lucker PW.** *Single- and multiple-dose pharmacokinetics of fleroxacin, a trifluorinated quinolone, in humans.* Antimicrob Agents Chemother 1987; **31**: 1909-1914.
307. **Wick WE, Preston DA, White WA, Gordee RS.** *Compound 64716, a new synthetic antibacterial agent.* Antimicrob Agents Chemother 1973; **4**: 415-420.
308. **Wingender W, Graefe KH, Gau W, Forster D, Beermann D, Schacht P.** *Pharmacokinetics of ciprofloxacin after oral and intravenous administration in healthy volunteers.* Eur J Clin Microbiol 1984; **3**: 355-359.
309. **Winshell EB, Rosenkraz HS.** *Nalidixic acid and the metabolism of E. coli.* J Bacteriol 1970; **104**: 1168-1175.
310. **Wolf R, Eberl R, Dunky A, Mertz N, Chang T, Goulet JR, Latts J.** *The clinical pharmacokinetics and tolerance of enoxacin in healthy volunteers.* J Antimicrob Chemother 1984; **14** Suppl C: 63-69.
311. **Wolff M, Boutron L, Singlas E, Clair B, Decazes JM, Regnier B.** *Penetration of ciprofloxacin into cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis.* Antimicrob Agents Chemother 1987; **31**: 899-902.
312. **Wolfson JS, Hooper DC.** *Fluoroquinolone antimicrobial agents.* Clin Microbiol Rev 1989; **2**: 378-424.

313. **Wolfson JS, Hooper DC.** *Pharmacokinetics of quinolones: newer aspects.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991; **10**: 267-274.
314. **Wolfson JS, Hooper DC.** *The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro.* Antimicrob Agents Chemother 1985; **28**: 581-586.
315. **Worcel A.** *Studies on the folded chromosome of E. coli. En: Mechanism and regulation of DNA replication. (Kolber AR & Kohiyama M Eds.)* New York and London: Plenum Press, 1974; 201-224.
316. **Yamamoto T, Kusajima H, Hosaka M, Fukuda H, Oomori Y, Shinoda H.** *Uptake and intracellular activity of AM-1155 in phagocytic cells.* Antimicrob Agents Chemother 1996; **40**: 2756-2759.
317. **Yoshida F, Topliss JG.** *QSAR model for drug human oral bioavailability.* J Med Chem 2000; **43**: 2575-2585.
318. **Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S.** *Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother 1990; **34**: 1271-1272.
319. **Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM, Nakamura S.** *Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrB gene of Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother 1991; **35**: 1647-1650.
320. **Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M.** *Nucleotide sequence and characterization of the staphylococcus aureus norA gene, which confer resistance to quinolones.* J Bacteriol 1990; **172**: 6942-6949.

**Bibliografia 332**

321. **Zechiedrich EL, Cozzarelli NR.** *Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in Escherichia coli.* Genes Dev 1995; **9**: 2859-2869.

322. **Zhao X, Xu C, Domagala J, Drlica K.** *DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance.* Proc Natl Acad Sci USA 1997; **94**: 13991-13996.

323. **Ziegler C, Stary A, Mailer H, Dopp W, Gebhart W, Soltz-Szots J.** *Quinolones as an alternative treatment of chlamydial, mycoplasma and gonococcal urogenital infections.* Dermatology 1992; **185**:128-131.

324. **Zweerink MM, Edison A.** *Inhibition of Micrococcus luteus DNA gyrase by norfloxacin and 10 other quinolone carboxylic acids.* Antimicrob Agents Chemother 1986; **29**: 598-601.