

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ANTIBIÓTICOS QUINOLÓNICOS DE  
NUEVA GENERACIÓN E IMMUNEPOTENT CRP SOBRE EL SISTEMA  
INMUNE

Por

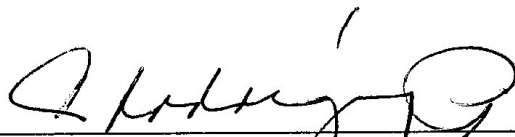
LUIS ANTONIO OCHOA RAMÍREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en Inmunobiología

Marzo, 2011

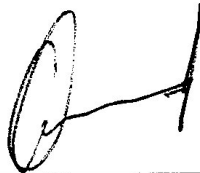
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ANTIBIÓTICOS QUINOLÓNICOS DE  
NUEVA GENERACIÓN E IMMUNEPOTENT CRP SOBRE EL SISTEMA  
INMUNE

Comité de Tesis



---

Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
Director de Tesis



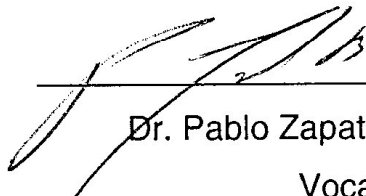
---

Dr. Moisés Armides Franco Molina  
Secretario



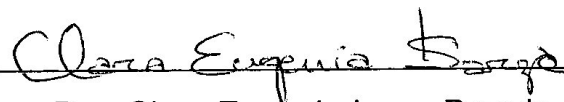
---

Dr. Edgar Mendoza Gamboa  
Vocal



---

Dr. Pablo Zapata Benavides  
Vocal



---

Dra. Clara Eugenia Isaza Brando  
Vocal

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi esposa, Claudia Burgos, por su brindarme su amor, su apoyo y su comprensión a pesar de todas las adversidades durante esta importante etapa de mi vida.

A mi madre, Natividad Ramírez, por darme su amor y su apoyo en todo sentido a lo largo de estos 26 años y fracción que tengo de vida.

A mi padre, Luis Ochoa, por darme su apoyo y cariño para alcanzar esta importante meta.

A mi hermano, David Ochoa, por siempre ser no solo un hermano, sino un verdadero amigo.

A mi directora de tesis, la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por permitirme llevar a cabo mi trabajo de investigación en las instalaciones del Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV), a su cargo.

A mi asesor, el Dr. Moisés Franco, por apoyarme en la realización de la parte experimental de mi tesis y la revisión de la parte escrita de la misma.

A la maestra Herlinda Vielma, por el apoyo técnico y asesoría en la estandarización y realización de las citometrías de flujo.

A los miembros de mi comité de tesis, el Dr. Edgar Mendoza, el Dr. Pablo Zapata y la Dra. Clara Isaza; por sus contribuciones al mejoramiento técnico del proyecto y del escrito de tesis.

A mis compañeros de laboratorio, Crystel, Edgar, Fabiola, José Juan, Luis Felipe y Paloma por brindarme su amistad y hacer mi estancia dentro y fuera del laboratorio de lo mas agradable y divertida.

A todos los compañeros y maestros del LIV, por las contribuciones realizadas durante los seminarios internos y por su disposición de brindar apoyo técnico cuando se requería.

A CONACYT por haberme brindado el apoyo económico para poder realizar mis estudios de maestría en una ciudad lejana a mi lugar de origen.

Al Dr. Salvador Velarde, al Biol. Juan José Rios y al QFB. Silvestre Cázarez, por haberme impulsado por el camino de la investigación.

## INDICE GENERAL

CONTENIDO	PÀGINA
LISTA DE TABLAS .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	v
NOMENCLATURA .....	vi
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. HIPÓTESIS .....	2
III. OBJETIVOS .....	3
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	3
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....	3
IV. ANTECEDENTES .....	4
4.1. EL SISTEMA INMUNOLÓGICO .....	4
4.1.1. Neutrófilos .....	5
4.1.2. Fagocitos mononucleares .....	5
4.1.3. Células dendríticas .....	6
4.1.4. Linfocitos T .....	6
4.1.4.1. Linfocitos T cooperadores .....	7
4.1.4.2. Linfocitos T citotóxicos .....	8
4.1.5. Linfocitos B .....	9
4.1.6. Células NK .....	9
4.1.7. Proteínas circulantes .....	9
4.1.8. Citocinas .....	10
4.2. ANTIBIÓTICOS .....	11
4.2.1. Efectos sobre el sistema inmune .....	12

4.3. QUINOLONAS .....	13
4.3.1. Historia de las quinolonas .....	14
4.3.2. Generalidades de las quinolonas .....	15
4.4. LEVOFLOXACINA .....	18
4.4.1. Estructura y función .....	19
4.4.2. Aspectos farmacológicos .....	20
4.4.3. Interacciones con el sistema inmune .....	20
4.5. MOXIFLOXACINA .....	21
4.5.1. Estructura y función .....	22
4.5.2. Aspectos farmacológicos .....	23
4.5.3. Interacciones con el sistema inmune .....	23
4.6. IMMUNEPOTENT CRP .....	25
4.6.1. Funciones y utilidades del Immunepotent CRP .....	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
5.1. CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC) .....	27
5.2. FÁRMACOS .....	27
5.3. IMMUNEPOTENT CRP .....	28
5.4. TRATAMIENTO DE LAS PBMC .....	28
5.5. VIABILIDAD CELULAR .....	29
5.6. PRODUCCIÓN DE SUPERÓXIDO .....	29
5.7. DETERMINACIÓN DE LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS	30
5.8. PRODUCCIÓN DE CITOCINAS .....	30
5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	31
VI. RESULTADOS .....	32
6.1. VIABILIDAD CELULAR DE PBMC TRATADAS .....	32
6.2. ACTIVIDAD OXIDATIVA DE MONOCITOS .....	32
6.3. EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS .....	33
6.4. PRODUCCIÓN DE CITOCINAS .....	36

VII. DISCUSIÓN .....	38
VIII. CONCLUSIONES .....	44
LITERATURA CITADA .....	45
RESUMEN BIOGRÁFICO .....	52



## ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1. Principales mecanismos de acción de los antibióticos .....	12
Tabla 2. Clasificación de las quinolonas .....	15

## ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1. Principales componentes del sistema inmune .....	4
Figura 2. Tipos de inmunidad adaptativa .....	7
Figura 3. Origen de las quinolonas .....	14
Figura 4. Levofloxacinina .....	19
Figura 5. Moxifloxacinina .....	22
Figura 6. Viabilidad celular relativa de las PBMC .....	32
Figura 7. Producción del anión superóxido en monocitos .....	33
Figura 8. Evaluación del porcentaje de células B y NK en PBMC .....	34
Figura 9. Evaluación del porcentaje de linfocitos T totales, T CD4 <sup>+</sup> y T CD8 <sup>+</sup> en PBMC .....	35
Figura 10. Evaluación de la producción de IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$ en PBMC .	37

## NOMENCLATURA

μL	Microlitros
μg	Microgramos
Abs	Absorbancia
ADCC	Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
T <sub>c</sub>	Linfocitos T citotóxicos
DMSO	Dimetil sulfóxido
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
F	Fluor
FDA	Administración de fármacos y alimentos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos
h	Horas
HBSS	Solución amortiguadora de Hank
ICRP	Immunepotent CRP
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
KDa	Kilodalton
KOH	Hidróxido de potasio
LEVO	Levofloxacin
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfotoxina
mg	Miligramos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
min	Minutos
mL	Mililitros
MOXI	Moxifloxacin
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio
NBT	Cloruro de nitroblue tetrazolio

NK	Asesinas naturales
nm	Nanómetros
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pg	Picogramos
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Forbol miristato acetato
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
spp	Especies
TB	Tuberculosis
T <sub>H</sub>	Linfocitos T cooperadores
TNF	Factor de necrosis tumoral
U	Unidades

## RESUMEN

**Antecedentes:** Las quinolonas son antibióticos de amplio espectro capaces de modular la respuesta inmune del hospedero, mientras que el IMMUNEPOTENT CRP es un agente con propiedades antibacterianas e inmunomoduladoras. Sin embargo, aun se desconocen sus efectos sobre algunos mecanismos del sistema inmune.

**Objetivo:** Evaluar el efecto de las quinolonas levofloxacin y moxifloxacin y del IMMUNEPOTENT CRP en las poblaciones de linfocitos y la producción de mediadores inmunológicos en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

**Material y métodos:** Se obtuvieron PBMC por gradiente de densidad a partir de sangre periférica de individuos sanos, se trataron con las quinolonas e IMMUNEPOTENT CRP y sus combinaciones. Se evaluó viabilidad celular relativa por MTT, actividad oxidativa de monocitos por NBT, porcentaje de linfocitos B, NK, T totales, T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> por citometría de flujo y producción de citocinas IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$  por ELISA.

**Resultados:** Los tratamientos no afectaron la viabilidad de las PBMC. No se encontraron diferencias significativas en la actividad oxidativa de monocitos, ni en los porcentajes de ninguna población de linfocitos evaluadas entre los tratamientos y el control. La producción de IL-2 se incrementó en los tratamientos con levofloxacin y moxifloxacin ( $p < 0.01$ ) pero no se afectó en los de IMMUNEPOTENT CRP y las combinaciones. La producción de IL-10 se disminuyó en los tratamientos con levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP ( $p < 0.05$ ). La producción de IFN- $\gamma$  no se afectó con los tratamientos con levofloxacin, pero los tratamientos con moxifloxacin (50  $\mu\text{g/mL}$ ), IMMUNEPOTENT CRP y sus combinaciones, disminuyeron la producción de esta citocina ( $p < 0.01$ ).

**Conclusiones:** La levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP no afectaron la viabilidad de PBMC, la actividad de fagocitos y las poblaciones de linfocitos; no obstante, modulan la producción de las citocinas IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$ .

## ABSTRACT

**Background:** Quinolones are broad spectrum antibiotics capable of modulating host's immune response, while IMMUNEPOTENT CRP is an agent with antibacterial and immunomodulating properties. However, their effects on certain mechanisms of the immune system are still unknown.

**Objective:** To evaluate the effect of the quinolones (levofloxacin and moxifloxacin) and IMMUNEPOTENT CRP on lymphocyte populations and the production of immunologic mediators on peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

**Material and methods:** PBMC were isolated by density gradient of blood samples of healthy donors, and treated with the quinolones and IMMUNEPOTENT CRP and their combinations. Relative cell viability was evaluated by MTT assay, oxidative burst of monocytes by NBT assay, percentage of B, NK, T total, T CD4<sup>+</sup> and T CD8<sup>+</sup> lymphocytes by flow cytometry, and production of IL-2, IL-10 and IFN- $\gamma$  cytokines by ELISA.

**Results:** Treatments didn't affect the viability of PBMC. There was not significant difference in the oxidative burst of monocytes or in the percentages of the lymphocyte populations evaluated between the treatments and the control. The treatments with levofloxacin and moxifloxacin induced a significant increase on IL-2 production ( $p < 0.01$ ), but IMMUNEPOTENT CRP and combined treatments did not. IL-10 production was decreased with levofloxacin, moxifloxacin and IMMUNEPOTENT CRP treatments ( $p < 0.05$ ). The IFN- $\gamma$  production was not affected with levofloxacin treatments, but moxifloxacin (50  $\mu\text{g/mL}$ ) and IMMUNEPOTENT CRP treatments and their combinations decreased the production of this cytokine ( $p < 0.01$ ).

**Conclusions:** Levofloxacin, moxifloxacin and IMMUNEPOTENT CRP did not affect PBMC viability, phagocyte activity and lymphocyte populations; however they were capable to modulate the production of IL-2, IL-10 and IFN- $\gamma$  cytokines.

## I. INTRODUCCIÓN

Las quinolonas son un grupo de agentes antimicrobianos que inhiben las ADN girasas bacterianas dando como resultado la inhibición de la síntesis de ADN (Azuma and Ohura, 2003). Estos fármacos poseen un amplio espectro de acción y por lo tanto un gran uso terapéutico. Además de sus propiedades bactericidas, existen reportes de que también son capaces de ejercer efectos moduladores sobre el sistema inmune (Dalhoff, 2005; Dalhoff and Shalit 2003). No obstante, los estudios se han enfocado en el efecto de estos antibióticos sobre la actividad de factores de transcripción relacionados con el sistema inmune (p.ej. NFκB) y la producción de citocinas proinflamatorias (p.ej. TNF- $\alpha$ , IL-1 y IL-6); sin encontrarse estudios que evalúen su efecto sobre otros parámetros de la respuesta inmune como son la evaluación de las poblaciones de linfocitos y la producción de otros mediadores inmunológicos.

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de las quinolonas, levofloxacin y moxifloxacin, sobre el sistema inmunológico, enfocándose en los mecanismos de actividad oxidativa de monocitos, poblaciones de linfocitos y su producción de citocinas; contribuyendo al acervo del conocimiento de estos antibióticos; ya que son los más empleados y considerados como de nueva generación. Por otra parte, se evalúa la acción del IMMUNEPOTENT CRP, producido y comercializado por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, el cual tiene actividad antibacteriana y anti-inflamatoria (Franco-Molina *et al.*, 2007); sobre estos mismos parámetros, que anteriormente no habían sido evaluados.

## **II. HIPÓTESIS**

Los antibióticos quinolónicos de nueva generación (levofloxacin y moxifloxacin) y el IMMUNEPOTENT CRP afectan las poblaciones de linfocitos y la producción de mediadores inmunológicos en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).



### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP sobre las poblaciones de linfocitos y la producci3n de mediadores inmunol3gicos en PBMC.

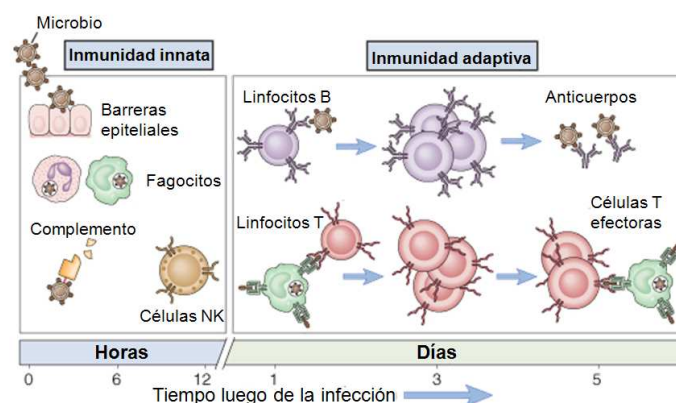
#### **3.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar el efecto de la levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad celular de PBMC.
- Determinar la producci3n intracelular del anion super3xido en monocitos aislados de PBMC tratadas con levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP.
- Evaluar el efecto de la levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP sobre los porcentajes de las poblaciones de linfocitos extraidos de PBMC.
- Determinar el efecto de la levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP en la producci3n de las citocinas IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$  en PBMC.

## IV. ANTECEDENTES

### 4.1. EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

El sistema inmunológico es una organización de células y moléculas con funciones especializadas en la defensa contra infecciones. Existen dos tipos de respuestas a microbios invasores: las respuestas innatas (naturales) que ocurren en la misma intensidad sin importar cuantas veces se encuentren con un mismo agente infeccioso; y las respuestas adquiridas (adaptativas) que mejoran ante la exposición repetida a una determinada infección (Delves and Roitt, 2000 a). Ambos tipos de inmunidad trabajan en conjunto para proteger al cuerpo de infecciones. La falta o defecto de uno o más componentes de la respuesta inmune conducen a una susceptibilidad a enfermedades infecciosas cuya severidad dependerá de la célula afectada y del tipo de defecto. Los principales componentes tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa se muestran en la Figura 1 y son descritas más a detalle en los siguientes apartados.



**Figura 1. Principales componentes de sistema inmune.** Se muestran los principales componentes del sistema inmune tanto innato como adaptativo (Abbas and Lichtman, 2005).

Independientemente del tipo de respuesta que lleven a cabo, los principales efectores del sistema inmune se dividen en células y factores solubles. Entre las células tenemos a las de origen mielóide como neutrófilos, fagocitos mononucleares y células dendríticas; y a las de origen linfóide como linfocitos T, B y NK. Entre los factores solubles tenemos a las proteínas circulantes y a las citocinas. Dichos componentes, que como se verá más adelante son susceptibles de modulación por fármacos y agentes terapéuticos, se describen a continuación.

#### **4.1.1. Neutrófilos**

Los neutrófilos constituyen la mayoría de los leucocitos circulantes y suelen ser los primeros en migrar hacia el sitio de la inflamación. Los neutrófilos forman parte de la inmunidad innata y se caracterizan por poseer gránulos, por lo que se les considera granulocitos. Los gránulos pueden ser de dos tipos: los específicos, llenos de enzimas como lisozima, colagenasa y elastasa; y los azurofílicos, que contienen enzimas y sustancias microbicidas incluyendo defensinas y catelicidinas (Abbas *et al.*, 2010). Los neutrófilos pueden disponer de los gránulos para eliminar microbios de forma extracelular o liberando su contenido intracelular.

#### **4.1.2. Fagocitos mononucleares**

Están constituidos por monocitos y macrófagos. Los primeros existen en circulación y una vez que entran a tejido maduran y se convierten en los segundos. En ese sentido los macrófagos son los que llevan a cabo las funciones efectoras de este grupo. Dichas funciones incluyen la ingesta y eliminación de microbios a nivel tisular.

Como los neutrófilos, los macrófagos pertenecen a la inmunidad innata. Ambos son capaces de eliminar agentes extraños por medio de la fagocitosis. El primer paso de este proceso consiste en reconocer al microbio, lo cual logran debido a que expresan receptores que reconocen específicamente ciertos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los microbios que son reconocidos por receptores de membrana son endocitados dentro de un fagosoma que posteriormente se fusiona con el lisosoma (que contiene enzimas hidrolíticas) para formar el fagolisosoma, eliminando al microbio ingerido. Además, tras su activación con productos bacterianos como lipopolisacáridos (LPS) o citocinas como interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), los fagocitos pueden utilizar especies reactivas de oxígeno que contribuyen a la eliminación de microbios al activar a enzimas como la elastasa y la catepsina G, presentes en los gránulos de neutrófilos (Rosenzweig and Holland, 2004); y óxido nítrico y sus derivados que son, por sí solos, tóxicos para microorganismos (Goldsby *et al.*, 2003). Los macrófagos activados también desempeñan importantes funciones

en la respuesta inflamatoria, potencian la respuesta adaptativa y participan en la remodelación de tejidos al secretar factores de crecimiento de fibroblastos y células endoteliales (Abbas *et al.*, 2010).

#### **4.1.3. Células dendríticas**

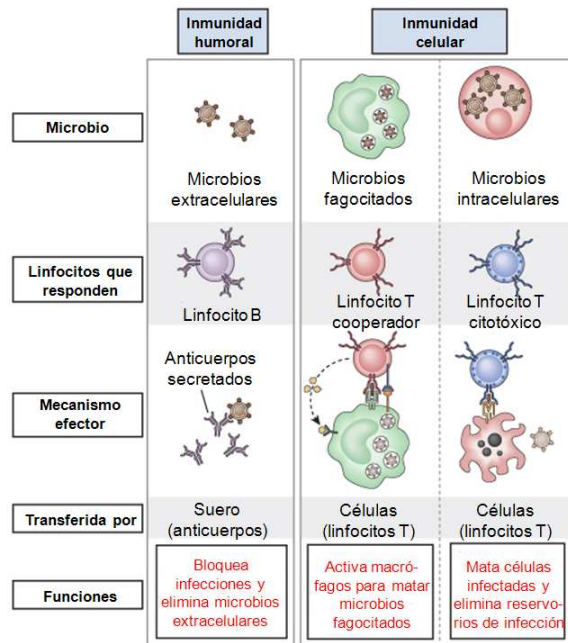
Las células dendríticas reciben su nombre debido a que poseen largas extensiones membranosas que asemejan a las dendritas de las neuronas. Estas células derivan de monocitos al igual que los macrófagos, y como estos son hábiles células fagocíticas. Poseen un importante rol como nexo entre inmunidad innata y adaptativa al ser generalmente las primeras que llevan a cabo el proceso de presentación de antígeno a células T. Esto es debido a que su membrana expresan una alta cantidad de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) de clase II y de coestimuladores de la familia B7 (Goldsby *et al.*, 2003), además de poseer receptores quimiotácticos que promueven su migración hacia la zona de células T de los ganglios linfáticos.

El proceso de presentación de antígeno involucra el procesamiento intracelular del antígeno, es decir, su fragmentación y asociación a moléculas de MHC de clase I o II, el primero para antígenos citosólicos y el segundo para antígenos fagocitados; y su presentación en membrana a linfocitos T, ya sean CD4<sup>+</sup>, antígeno unido a MHC clase II; o CD8<sup>+</sup>, antígeno unido a MHC clase I (Abbas *et al.*, 2010).

#### **4.1.4. Linfocitos T**

La inmunidad adaptativa puede dividirse en dos tipos: la celular y la humoral. Los linfocitos T son los principales efectores de la inmunidad adaptativa de tipo celular, mientras que los anticuerpos secretados por linfocitos B media la de tipo humoral (Figura 2). Existen diversas subpoblaciones de linfocitos T pero solo aquellos con TCR  $\alpha\beta$  con capacidad de sufrir rearreglo somático participan como efectores de la inmunidad adaptativa celular (Abbas *et al.*, 2010). Los linfocitos T pueden dividirse en dos grandes subpoblaciones: los CD4<sup>+</sup> y los CD8<sup>+</sup> que, tras el proceso de

presentación de antígeno, se diferencian en linfocitos T cooperadores ( $T_H$ ) y linfocitos T citotóxicos ( $T_c$ ), respectivamente (Goldsby *et al.*, 2003). Dichas subpoblaciones se describen a continuación.



**Figura 2. Tipos de inmunidad adaptativa.** Se muestran los procesos y funciones principales de los dos tipos de inmunidad adaptativa: la humoral y la celular (tomada de Abbas & Lichtman, 2005).

#### 4.1.4.1. Linfocitos T cooperadores

Las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores ( $T_H$ ) mejor definidas y comprendidas son las  $T_H1$  y las  $T_H2$ . La primera secreta  $IFN-\gamma$  el cual promueve mayor diferenciación a  $T_H1$ , a la vez que inhibe la proliferación de células  $T_H2$ ; mientras que la segunda secreta interleucina-4 (IL-4) que promueve la diferenciación a  $T_H2$ , e IL-10 que inhibe el desarrollo de células  $T_H1$  (Abbas *et al.*, 2010). La diferenciación a  $T_H1$  se da en respuesta a infecciones de bacterias y parásitos intracelulares y virus, mientras que la diferenciación a  $T_H2$  es promovida por helmintos o alérgenos que causan estimulación persistente o repetida de células T sin desatar potentes respuestas innatas, que son necesarias para la diferenciación a  $T_H1$  (van Veerdonk *et al.*, 2009).

Las funciones efectoras de los linfocitos  $T_H$  difieren entre subpoblaciones. La principal función de los  $T_H1$  es la activación de macrófagos para la eliminación de microbios fagocitados, la cual logran al ponerse en contacto con macrófagos a través del receptor CD40, y se potencia por la secreción de  $IFN-\gamma$  por parte del linfocito

$T_H1$ . Los  $T_H1$  también pueden activar a neutrófilos por medio de la secreción de citocinas como linfotoxina (LT) y factor de necrosis tumoral (TNF). Otras funciones de los linfocitos  $T_H1$  es la activación de células B para el cambio de isotipo a anticuerpos opsonizantes y fijadores de complemento (van Veerdonk *et al.*, 2009).

Las funciones de los linfocitos  $T_H2$  están más enfocadas a la erradicación de patógenos extracelulares. Destacan la activación de células B para la producción de anticuerpos principalmente IgE, que promueven la degranulación de mastocitos y de eosinófilos, importantes en el desarrollo de respuestas alérgicas y en defensa contra helmintos, respectivamente; y activación de macrófagos para realizar sus funciones alternas tales como la reparación de tejidos y la supresión de la inflamación (Abbas *et al.*, 2010).

#### **4.1.4.1. Linfocitos T citotóxicos**

Los linfocitos T citotóxicos ( $T_C$ ) tienen capacidades líticas, poseen un papel crítico en el reconocimiento y eliminación de células propias alteradas (células infectadas por virus y células tumorales) y en reacciones de rechazo a trasplante. Generalmente son  $CD8^+$  por lo que están restringidos al MHC de clase I. La activación de los linfocitos  $T_C$  está estrechamente relacionada con la de los  $T_H1$ , ya que requieren de los mismos factores, incluidas las citocinas IL-2 e IL-12 (Goldsby *et al.*, 2003).

Los linfocitos  $T_C$  pueden eliminar a sus células diana a través de dos mecanismos. El primero consiste en la liberación de perforinas que producen poros a través de los cuales pasan las granzimas (también secretadas por los  $T_C$ ) que activan la cascada de caspasas que media la apoptosis de la célula blanco (Delves and Roitt, 2000 b). El segundo consiste en la unión a la molécula Fas en la célula diana a través del ligando de Fas, propio de los linfocitos  $T_C$ ; proceso que también activa a las caspasas y consecuentemente induce apoptosis (Delves and Roitt, 2000 b). Además, los linfocitos  $T_C$  también refuerzan la inmunidad innata al secretar citocinas como TNF- $\alpha$ , LT e IFN- $\gamma$  (Abbas *et al.*, 2010).

#### **4.1.5. Linfocitos B**

Los linfocitos B son las células encargadas de la producción de anticuerpos, que median la inmunidad adaptativa de tipo humoral (Figura 2). Los anticuerpos se encuentran asociados a membrana en linfocitos B. Se requiere que los linfocitos B reconozcan antígeno a través de su receptor de membrana (una Ig) para que estos se activen y se diferencien en células plasmáticas que son las encargadas de la secreción de anticuerpos (Delves and Roitt, 2000 b). Sin embargo, la respuesta de anticuerpos en contra de la mayoría de los antígenos (antígenos proteicos) necesita de la cooperación de los linfocitos T<sub>H</sub>, es decir, es dependiente de T (Abbas *et al.*, 2010).

#### **4.1.6. Células NK**

El nombre de asesinas naturales (natural killer, NK) deriva del hecho de que al aislarlas, estas células son capaces de eliminar diversas células blanco sin necesidad de activación adicional, además de ser una importante fuente de IFN- $\gamma$  (Abbas *et al.*, 2010). Las células NK pertenecen al linaje linfoide y contribuyen a la inmunidad innata eliminando células infectadas o transformadas al ser capaces de reconocer: moléculas codificadas por patógenos, sobreexpresión, ausencia o disminución de la expresión de proteínas propias (Raulet, 2004). No obstante, hoy en día se sabe que estas células también están involucradas en la inmunidad adaptativa, principalmente debido a su estrecha interacción con las células dendríticas (Raulet, 2004; Moretta *et al.*, 2008).

#### **4.1.7. Proteínas circulantes**

Entre las proteínas circulantes más importantes tenemos a los anticuerpos que, como ya se mencionó, median la inmunidad adaptativa humoral. Las principales funciones efectoras de los anticuerpos son el bloqueo de microbios y toxinas a receptores celulares y la opsonización de microbios y otras partículas para su fagocitosis. Además, pueden marcar células para su eliminación, evento llamado citotoxicidad

mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y activar la cascada del complemento (Abbas *et al.*, 2010).

Otras proteínas circulantes de importancia son las del sistema de complemento, las pentraxinas, las colectinas y las ficolinas, que pertenecen a la inmunidad innata, y cuyas funciones consisten en reconocer, opsonizar y eliminar microorganismos y células en apoptosis (Goldsby *et al.*, 2003).

#### **4.1.8. Citocinas**

Las citocinas son proteínas secretadas por células en respuesta a estímulos externos y median diversas funciones inmunológicas y en general tienen una vida media corta. Diferentes citocinas pueden mediar y/o regular respuestas innatas o adaptativas.

Las principales citocinas de la respuesta innata son TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, las quimiocinas, IL-12 e IL-10. El TNF- $\alpha$  y la IL-1, producidas por fagocitos mononucleares activados, son los principales mediadores de la respuesta inflamatoria aguda (Abbas *et al.*, 2010); la IL-6 regula la producción de proteínas de fase aguda y es secretada por diversas células tras estimulación con IL-1 (Chida *et al.*, 2006), las quimiocinas promueven la migración de leucocitos de sangre a tejido (Goldsby *et al.*, 2003) y la IL-12 promueve la diferenciación de linfocitos T hacia el polo T<sub>H</sub>1, la secreción de IFN- $\gamma$  y citotoxicidad de células T<sub>C</sub> y NK (Trinchieri, 2003). La IL-10, secretada por macrófagos, células dendríticas y linfocitos T<sub>H</sub>2 y de tipo regulador, ejerce un efecto anti-inflamatorio al inhibir las funciones de la IL-12, así como su producción y al inhibir la expresión de coestimuladores y moléculas de MHC clase II en macrófagos y células dendríticas (Couper *et al.*, 2008).

Las principales citocinas de la respuesta adaptativa son IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$ . La IL-2, secretada en su mayoría por linfocitos T CD4<sup>+</sup>; es un factor de crecimiento, de supervivencia y de diferenciación de linfocitos T y también es necesaria en el mantenimiento de la tolerancia a antígenos propios (Malek, 2003). La IL-4 y la IL-5 son secretadas por células T<sub>H</sub>2, la primera promueve la producción de anticuerpos IgE y la diferenciación de linfocitos T vírgenes a T<sub>H</sub>2; y la segunda, la activación,



desarrollo y diferenciación de eosinófilos (Abbas *et al.*, 2010). El IFN-  $\gamma$ , secretado por células NK, T<sub>H1</sub> y T<sub>C</sub>, es una citocina crucial en la activación de la inmunidad adaptativa celular cuyas funciones principales son: la activación de macrófagos para eliminar microbios fagocitados, promoción de la diferenciación a T<sub>H1</sub> e inhibición de la diferenciación a T<sub>H2</sub> y estimulación de la expresión de moléculas del MHC de clase I y clase II, y coestimuladores en macrófagos y células dendríticas (Stark *et al.*, 1998).

## 4.2. ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son ampliamente utilizados como fármacos bacteriostáticos o bactericidas en la terapia de infecciones por bacterias. Se clasifican con base en su estructura química y mecanismo de acción de la siguiente manera: 1) sustancias que inhiben la síntesis de las paredes celulares bacterianas, 2) sustancias que actúan directamente en la membrana celular del microorganismo, aumentando la permeabilidad y provocando la salida de compuestos intracelulares; 3) sustancias que alteran la función de las subunidades ribosómicas 30S y 50S para inhibir en forma reversible la síntesis de proteínas, que suelen ser bacteriostáticos; 4) sustancias que se adhieren a la subunidad ribosómica 30S y alteran la síntesis de proteínas, que suelen ser bactericidas; 5) sustancias que modifican el metabolismo del ácido nucleico bacteriano, y 6) los antimetabolitos que bloquean a ciertas enzimas esenciales del metabolismo del folato (Brunton *et al.*, 2008). Esta clasificación se muestra en la Tabla 1.

Además de la clasificación anterior, los antibióticos también pueden clasificarse en clases en relación a su estructura química o, en ocasiones, en relación a su uso clínico. En ese sentido tenemos a las sulfonamidas, los lactámicos- $\beta$ , incluyendo a las penicilinas y cefalosporinas; los aminoglucósidos, las tetraciclinas, los macrólidos, las rifamicinas y las quinolonas (Brunton *et al.*, 2008); cada una con sus respectivos representantes. Además, existen otros antibióticos que no se encuentran dentro de familias tales como el linezolid, el cloranfenicol, la isoniazida, el etambutol, el trimetoprim, entre otros.

**Tabla 1. Principales mecanismos de acción de los antibióticos.** Se muestra una clasificación de los antibióticos con respecto a su mecanismo de acción (compilada de Brunton *et al.*, 2008).

MECANISMO	CLASES	EJEMPLOS
Inhibición de la síntesis la pared celular	Lactámicos- $\beta$ Otros	Penicilinas, Cefalosporinas Cicloserina, Vancomicina, Bacitracina
Aumento de la permeabilidad de membrana celular	Daptomicina	Daptomicina
Inhibición reversible de síntesis proteica	Tetraciclinas Macrólidos Otros	Doxiciclina Eritromicina Cloranfenicol, Clindamicina, Linezolid
Alteración de la síntesis proteica	Aminoglucósidos	Estreptomicina, Gentamicina
Alteración del metabolismo de ácidos nucleicos	Rifamicinas Quinolonas	Rifampicina, Rifabutina Levofloxacin, Moxifloxacin
Antimetabolitos	Sulfonamidas Otros	Sulfametoxazol, Sulfadiazina Trimetoprim

#### 4.2.1. Efectos sobre el sistema inmune

Es bien conocido que la actividad bacteriostática y/o bactericida de los antibióticos se encuentra estrechamente vinculada con el sistema inmune (Choi *et al.*, 2003). La mayoría de estos fármacos tienen efectos sobre el sistema inmune específico y sobre la activación del complemento (Dalhoff and Shalit, 2003), entre los que se incluyen: la alteración de la fagocitosis, quimiotaxis, liberación de endotoxinas, producción de citocinas, recuperación hematopoyética tras inmunosupresión y la inducción o inhibición de la apoptosis (Choi *et al.*, 2003).

Existen numerosos reportes acerca de los efectos ejercidos sobre el sistema inmune para diversos antibióticos. Al respecto, hoy se sabe que el sulfametoxazol y otras sulfonamidas por sí solas son capaces de regular negativamente la actividad del NF $\kappa$ B (Xie *et al.*, 2008), además de disminuir la respuesta inmune innata al igual que otros antibióticos bacteriostáticos (Kristian *et al.*, 2007). Respecto a los lactámicos- $\beta$ ,

se ha observado que son capaces de disminuir la producción de IFN- $\gamma$  (Pandovan *et al.*, 1999; Brooks *et al.*, 2005).

Una de las clases de antibióticos más representativas en el tema de modulación inmune es la de los macrólidos, ya que presentan diversas propiedades anti-inflamatorias, entre las que destacan la disminución del reclutamiento de neutrófilos, inhibición de la activación del NF $\kappa$ B (Tamaoki, 2004; Ichiyama *et al.*, 2001) y la disminución de la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-8, IL-6 e IL-12 (Yamauchi *et al.*, 2009), entre otras. Tales efectos han resultado ser benéficos principalmente en enfermedades respiratorias crónicas como panbronquiolitis difusa, fibrosis quística (Ribeiro *et al.*, 2009), asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Hodge *et al.*, 2008; Sevilla-Sánchez *et al.*, 2010).

Las tetraciclinas también tienen efecto sobre las células inmunes, ya que son capaces de inhibir respuestas proliferativas de linfocitos inducidas por mitógenos (Thong and Ferrante, 1979), además de modular la respuesta humoral inducida por vacunas, efecto también observado en macrólidos y lactámicos- $\beta$  (Woo *et al.*, 1999).

Otros fármacos antimicrobianos que presentan acción anti-inflamatoria son la clofazimina y el rifampicina. Ambos se utilizan en contra de infecciones micobacterianas, el primero principalmente para lepra y el segundo para tuberculosis (Brunton *et al.*, 2008). La acción de la clofazimina consiste en la inhibición de la activación de la vía NFAT en linfocitos T debido a que perturba la oscilación interna de iones de calcio (Ren *et al.*, 2008), mientras que la de la rifampicina consiste en el aumento de producción de óxido nítrico inducido por citocinas (Yuhás *et al.*, 2006).

Uno de los grupos de antibióticos ampliamente estudiados respecto a sus efectos inmunomoduladores es el de las quinolonas.

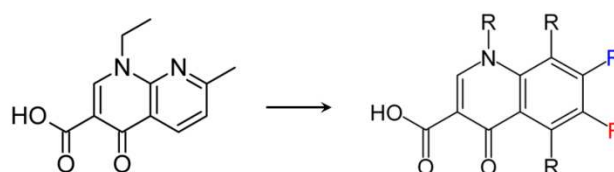
### **4.3. QUINOLONAS**

Las quinolonas son agentes antimicrobianos sintéticos de amplio espectro de uso común para una variedad de infecciones incluyendo las infecciones sistémicas en

pacientes inmunocomprometidos (Weiss *et al.*, 2004). Estos antibióticos han ganado gran popularidad a medida que la resistencia bacteriana erosiona la efectividad de otros agentes (Drlica *et al.*, 2008).

### 4.3.1. Historia de las quinolonas

La primera quinolona, el ácido nalidíxico, se obtuvo en forma de producto intermedio de la síntesis de la cloroquina (Brunton *et al.*, 2008) y fue introducido en 1962 con el nombre comercial NegGram (Oliphant and Green, 2002). El ácido nalidíxico, pese a su limitada actividad antibacteriana, pobre biodisponibilidad y rápido desarrollo de resistencia bacteriana, es el padre de todos los derivados quinolónicos y fluoroquinolónicos (Figura 4) (Mandell and Tillotson, 2002).



**Figura 3. Origen de las quinolonas.** El ácido nalidíxico (izquierda) fue la primer quinolona sintetizada y de él se sintetizaron otras quinolonas adicionando grupos funcionales y un átomo de flúor, en el caso de las quinolonas fluoradas.

Las quinolonas son agrupadas en generaciones en base a su composición y espectro de acción. La primera generación de quinolonas está compuesta por el ácido nalidíxico y sus derivados directos, que poseen actividad limitada en contra de bacterias Gram-negativas (Oliphant and Green, 2002). La adición del átomo de flúor al anillo quinolónico constituyó el paso a la segunda generación. Este evento también dio lugar a un aumento de su espectro, ya que la segunda generación presenta mayor actividad contra Gram-negativos que la primera, aunque su actividad contra Gram-positivos es muy limitada (Alós, 2003).

Dentro de la segunda generación existe una segunda clase, la clase II que incluye a la ofloxacina y la ciprofloxacina, que conserva las características de la clase I (norfloxacina, lomefloxacina) pero con mayor actividad contra Gram-positivos y patógenos atípicos (Alós, 2003). Las de la tercera generación presentan el mismo

efecto que las de segunda generación de clase II pero además son efectivas en contra de Gram-positivos como estreptococos (Oliphant and Green, 2002). El espectro de las de cuarta generación incluye el de las generaciones pasadas además de presentar efectividad en contra de bacterias anaerobias (Oliphant and Green, 2002). Las generaciones de quinolonas se muestran de manera resumida en la Tabla 2.

**Tabla 2. Clasificación de las quinolonas.** Se muestran los antibióticos más representativos de cada generación así como su espectro de acción (modificada de Oliphant and Green, 2002).

GENERACIÓN	ANTIBIÓTICOS	ESPECTRO
Primera	Ácido nalidíxico	Enterobacterias, Gram-negativos –
Segunda		
- Clase I	Norfloxacin	Enterobacterias, Gram-negativos +, Gram-positivos –
- Clase II	Ciprofloxacina, ofloxacina	Enterobacterias, patógenos atípicos, Gram-negativos #, Gram-positivos –
Tercera	Levofloxacina, moxifloxacina, esparfloxacina	Enterobacterias, patógenos atípicos, Gram-negativos #, Gram-positivos +, estreptococos +
Cuarta	Gemifloxacina	Enterobacterias, patógenos atípicos, anaerobios, Gram-negativos #, Gram-positivos #, estreptococos #

Los símbolos indican el espectro: –, limitado; +, moderado; #, amplio

#### 4.3.2. Generalidades de las quinolonas

Las quinolonas difieren en estructura, espectro de acción y usos clínicos pero su mecanismo de acción se conserva en todas ellas. En general, las quinolonas interfieren con los procesos bacterianos de replicación celular, transcripción y reparación de ADN al inhabilitar dos enzimas bacterianas cruciales para tales procesos: la ADN girasa (antiguamente conocida como topoisomerasa II) y la topoisomerasa IV (Bolon, 2009). La girasa tiende a ser el blanco primario en bacterias Gram-negativas, mientras que la topoisomerasa IV es inhibida en organismos Gram-positivos (Drlica *et al.*, 2008). Además, se ha visto que algunas

quinolonas son capaces de permeabilizar la membrana de bacterias Gram-negativas, sensibilizándolas a péptidos antimicrobianos (Campos *et al.*, 2006).

Las quinolonas eliminan bacterias de manera dependiente de dosis. Generalmente comparten la característica de ser rápidamente absorbidas luego de su administración oral, alcanzando una concentración máxima en un periodo de 1 a 3 horas (Appelbaum *et al.*, 2004). La concentración en algunos tejidos rebasa a la concentración sérica, esto sucede en el tracto respiratorio (mucosa bronquial y epitelio pulmonar) y en macrófagos alveolares (Saravolatz and Leggett, 2003), donde las quinolonas son capaces de expresar efectos antibacterianos intracelulares (Takeyama *et al.*, 2007). La mayoría de las quinolonas son excretadas vía renal, aunque algunas son excretadas vía hepática tales como la moxifloxacina o la esparfloxacina (Oliphant and Green, 2002). Un caso particular es la gemifloxacina, la cual puede ser excretada por vía renal y hepática (Saravolatz and Leggett, 2003).

Como se mencionó en el apartado anterior, el espectro de acción de las quinolonas varía de generación a generación, siendo las más nuevas las que poseen un espectro más amplio. Además, las quinolonas de nueva generación poseen menor potencial de inducción de resistencia bacteriana (Patel and Wilson, 2006). Sin embargo, dado su amplio espectro, las quinolonas se utilizan de manera frecuente en la práctica clínica lo que ha conducido al desarrollo de resistencia bacteriana a estos compuestos. Los principales mecanismos de resistencia a quinolonas consisten en alteraciones de las enzimas blanco y el decremento en la acumulación dentro de la bacteria debido a impermeabilidad de la membrana y/o a la sobreexpresión de sistemas de bombas de eflujo, ambos mediados cromosómicamente (Ruiz, 2003). También existe la resistencia mediada por plásmidos a través del gen *qnr*, que codifica para proteínas que protegen de la inhibición de la ADN girasa y topoisomerasa IV mediada por quinolonas (Wang *et al.*, 2009).

El uso terapéutico de las quinolonas es muy variado. Hoy día las principales quinolonas utilizadas son la ciprofloxacina, la levofloxacina, la moxifloxacina y la gemifloxacina, siendo útiles para: infecciones de tracto genitourinario (McGregor *et al.*, 2008), infecciones del tracto gastrointestinal (Brunton *et al.*, 2008; Falagas *et al.*, 2007), infecciones respiratorias (Ferrara, 2007; Patel and Wilson, 2006), infecciones

de huesos y articulaciones (Brunton *et al.*, 2008; Bolon, 2009) e infecciones de la piel y su estructura (Giordano *et al.*, 2007; Guay, 2006). Además, en combinación con otros antibióticos son útiles para tratar enfermedades como brucelosis (Falagas and Bliziotis, 2006), tuberculosis (Peloquin *et al.*, 2008) e infecciones por patógenos como *Bacillus anthracis* (Bolon, 2009), *Francisella tularensis* (Oliphant and Green, 2002) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (Shopsin *et al.*, 2004).

Como la mayoría de los fármacos, las quinolonas pueden presentar efectos adversos luego de su consumo. Los efectos adversos más frecuentes son gastrointestinales (3-17%) y del sistema nervioso central (SNC) (1-10%) (Alós, 2003). Los efectos gastrointestinales consisten en náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal; y en el SNC, dolor de cabeza, vértigo, mareos, somnolencia, confusión, insomnio, fatiga, agitación y temblores (Alós, 2003). Otros efectos secundarios generales para esta clase son la tendinitis y rotura de tendones (Shortt *et al.*, 2006), el alargamiento del intervalo QT que puede provocar arritmias ventriculares (Bolon, 2009); las disglucemias, ya sea hipoglucemia o hiperglucemia (Bolon, 2009; Khaira *et al.*, 2009) y la fototoxicidad (Bolon, 2009). Algunas quinolonas fueron retiradas del mercado y otras no fueron aprobadas para su empleo clínico, debido a que inducían hepatotoxicidad (Cheung *et al.*, 2004). Estos efectos guardan relación con su estructura, lo que explica que no todas las quinolonas presenten los mismos efectos adversos (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

Las interacciones de las quinolonas con el sistema inmune son diversas y el efecto ejercido depende de la quinolona utilizada. El efecto más notable de las quinolonas es la modulación de la producción de citocinas. Diversos estudios *in vitro* han mostrado que, en general, estos fármacos disminuyen la producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8 por parte de monocitos humanos (Yoshimura *et al.*, 1996; Araujo *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003; Dalhoff and Shalit, 2003; Takeyama *et al.*, 2007; Blau *et al.*, 2007). Algunas quinolonas como la norfloxacin, la ofloxacin y el ácido nalidíxico disminuyen además la producción de las citocinas factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF) e IFN- $\gamma$  (Yoshimura *et al.*, 1996; Dalhoff, 2005). Por otro lado, se ha observado que la exposición a quinolonas, particularmente a ciprofloxacina, incrementa la producción de IL-2 de linfocitos estimulados con mitógenos (Riesbeck *et al.*, 1998; Dalhoff,

2005) y algunas investigaciones muestran que son capaces de inducir la producción del mediador inflamatorio prostaglandina  $E_2$  en monocitos a través de la inducción de la cicloxigenasa-2 (Takahashi *et al.*, 2005). Los hallazgos del efecto de las quinolonas sobre la producción de citocinas también han sido reportados en modelos *in vivo*, así como en diversos estudios clínicos (Dalhoff and Shalit, 2003; Dalhoff, 2005). En este tipo de estudios se ha observado además que la inmunomodulación generada por la administración de quinolonas es capaz de promover un incremento de la respuesta inmune humoral del hospedero en contra de bacterias, así como su eliminación independientemente del efecto antibacterial del fármaco, lo que favorece la recuperación del individuo ante la infección (Gollapudi *et al.*, 1993; Klimpel *et al.*, 2008).

Se cree que el mecanismo detrás del efecto inmunomodulador de las quinolonas está relacionado con su capacidad de afectar la actividad de diversos factores de transcripción relacionados con la expresión de genes de citocinas tales como NF- $\kappa$ B, MAP-kinasa, AP-1 y NFAT (Dalhoff and Shalit, 2003; Weiss *et al.*, 2004; Shalit *et al.*, 2006); así como de otras moléculas de señalización intracelular tales como adenosin monofosfato cíclico (cAMP) y fosfodiesterasas (Dalhoff and Shalit, 2003). Estas interacciones han mostrado tener también repercusiones en los mecanismos apoptosis, como lo demuestran estudios con la quinolona tosufloxacin que causa un retardamiento del proceso apoptótico (Azuma and Ohura, 2003).

#### **4.4. LEVOFLOXACINA**

La levofloxacin es una quinolona de tercera generación. Sus presentaciones comerciales incluyen a Elequine de Janssen-Cilag, Levaquin de Ortho-McNeil y Tavanic de Aventis (ver Figura 5) y puede ser encontrada en presentación oral o intravenosa (TB alliance, 2008 a). Es una de las quinolonas de mayor uso terapéutico en la actualidad y cuenta con la aprobación de la administración de fármacos y alimentos (FDA) para su uso clínico en diversas enfermedades urinarias, respiratorias y dermatológicas.



#### 4.4.1. Estructura y función

La levofloxacinina es el estereoisómero levo de la ofloxacinina (Kiangkitiwan *et al.*, 2008). Su nomenclatura química es: ácido 9-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7H-pirido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-carboxílico y su fórmula química es  $C_{18}H_{20}FN_3O_4$  (TB alliance, 2008 a). Su estructura química y presentación comercial se muestran en la Figura 5.



**Figura 4. Levofloxacinina.** Se muestra la estructura química de la levofloxacinina (izquierda), así como ejemplos de su presentación comercial (derecha).

La levofloxacinina presenta actividad bactericida contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Giordano *et al.*, 2007). Además, tiene actividad contra complejos de micobacterias como el de *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium tuberculosis* y otras bacterias que infectan el tracto respiratorio como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* (TB alliance, 2008 a).

Sus principales usos clínicos son en infecciones urinarias complicadas y pielonefritis aguda (McGregor *et al.*, 2008), infecciones de la piel y su estructura (Giordano *et al.*, 2007), exacerbaciones agudas de EPOC (Patel and Wilson, 2006) y otras enfermedades respiratorias como neumonía nosocomial y adquirida en la comunidad (Bolon, 2009) y es efectiva en la profilaxis del ántrax (Oliphant and Green, 2002). La levofloxacinina además es segura para su uso en pacientes infectados con virus de inmunodeficiencia humana (Chien *et al.*, 1997) y estudios en modelos murinos

demonstraron que protege contra infecciones respiratorias por *Francisella tularensis* (Klimpel *et al.*, 2008).

#### **4.4.2. Aspectos farmacológicos**

La biodisponibilidad oral de la levofloxacin es de 85-95% (TB alliance, 2008 a). Tiene una vida media aproximada de 7.6 h luego de múltiples dosis de 500 mg (McGregor *et al.*, 2008). Su concentración en tejido urinario llega a ser tan alta como la concentración máxima en plasma con una adecuada penetración a próstata y a piel (McGregor *et al.*, 2008; Giordano *et al.*, 2007). También se acumula intracelularmente en macrófagos alveolares y en neutrófilos (Vazifeh *et al.*, 1999). La levofloxacin es eliminada principalmente por vía renal, vía filtración glomerular y secreción tubular (Giordano *et al.*, 2007).

Sus efectos adversos incluyen todos los comunes para las quinolonas tales como desordenes gastrointestinales, reacciones de hipersensibilidad, tendinitis, fotosensibilidad y prolongación del intervalo QT (TB alliance, 2008 a). También se ha visto que causa reacciones adversas en relación al SNC como jaquecas (6%), mareos (3%) y eventos menos comunes incluyen confusión, insomnio y raramente psicosis (Kiangkitiwan *et al.*, 2008; Mandell and Tillotson, 2002).

#### **4.4.3. Interacciones con el sistema inmune**

Se han reportado diversas funciones de modulación inmunológica para la levofloxacin. Una de la más relevantes es la relacionada a la producción de citocinas mostrando que el fármaco es capaz de aumentar de manera dependiente de dosis la producción de IL-2 de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas con el mitógeno fitohemaglutinina (PHA) y, a dosis altas, es capaz de disminuir la producción de GM-CSF y receptor de IL-2 soluble en el mismo modelo experimental (Yoshimura *et al.*, 1996). Además, se encontró que en PBMC estimulados con lipopolisacárido (LPS) disminuía la producción de IL-1 $\beta$  de manera dependiente de dosis y la de TNF- $\alpha$  solo a dosis altas (Yoshimura *et al.*, 1996). Otros

autores corroboran lo anteriormente citado para TNF- $\alpha$  y reportan además que la levofloxacin ocasiona un decremento en la producción de IL-6 de PBMC estimulados con la bacteria *Streptococcus pneumoniae* inactivada por calor (Choi *et al.*, 2003).

Además de su efecto sobre la producción de citocinas, se ha observado que la levofloxacin interactúa con los neutrófilos promoviendo la aceleración de su muerte a la hora 15 de cultivo por mecanismos ajenos a la apoptosis, por la cual mueren normalmente a la hora 30 (Azuma and Ohura, 2003).

Algunos hallazgos ponen de manifiesto que la levofloxacin es capaz de modular la respuesta inmune independientemente de su interacción directa con células inmunes (i.e. neutrófilos, monocitos, linfocitos), como lo es el estudio realizado por Uriarte y colaboradores (2004) en el que se reporta que la levofloxacin es capaz de regular la producción de los factores quimioatrayentes IL-8 y MCP-1 por parte de células endoteliales estimuladas. Dicha disminución ocasiona además una disminución en la migración transendotelial de neutrófilos y monocitos, aunque se presume existe mas factores involucrados en este proceso (Uriarte *et al.*, 2004).

Los efectos benéficos de la levofloxacin *in vivo* son debidos al incremento en la eliminación de bacterias tanto por efecto directo del fármaco como por la modulación inmune que ejerce (Dalhoff, 2005): estudios en ratones infectados con *Francisella tularensis* han mostrado que la levofloxacin promueve una respuesta de tipo T<sub>H</sub>1 e induce la producción de anticuerpos protectores que, aunado a su efecto bactericida, favorece la recuperación y resolución de la infección (Klimpel *et al.*, 2008).

#### **4.5. MOXIFLOXACINA**

La moxifloxacin es una quinolona de tercera generación al igual que la levofloxacin. Posee varias presentaciones comerciales destacando Avelox de Bayer y Vigamox de Alcon (Figura 6), la primera en presentaciones oral e intravenosa y la

segunda en presentación oftálmica (TB alliance, 2008 b). Esta quinolona es utilizada en gran medida para tratar infecciones gastrointestinales, respiratorias y de la piel.

#### 4.5.1. Estructura y función

La moxifloxacina es una 8-metoxi quinolona cuya nomenclatura química es: ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-8-metoxi-7-[(4aS,7aS)-octahidro-6H-pirrolo[3,4-b]piridín-6-il]-4-oxo-3-quinolincarboxílico y tiene la fórmula química  $C_{21}H_{24}FN_3O_4$  (TB alliance, 2008 b). Su estructura química y presentación comercial se muestran en la Figura 6.

La moxifloxacina presenta actividad contra todas las bacterias mencionadas para levofloxacina (TB alliance, 2008 b). Sus principales usos clínicos son en enfermedades respiratorias como exacerbaciones bacterianas de EPOC (Patel and Wilson, 2006) y neumonía adquirida en la comunidad (Ferrara, 2007); en infecciones de la piel y su estructura (Guay, 2006) y en infecciones intraabdominales complicadas (Bolon, 2009). Recientes estudios clínicos sugieren que moxifloxacina podría ser utilizada para el tratamiento de la lepra (Pardillo *et al.*, 2008) y de infecciones por *Helicobacter pylori* (Whenzen *et al.*, 2009). Además, estudios *in vivo* sugieren que la moxifloxacina puede incrementar los efectos antitumorales de agentes quimioterapéuticos (Reuveni *et al.*, 2010; Fabian *et al.*, 2006) y protegen contra la neumonía causada por *Candida albicans* en ratones inmunosuprimidos (Shalit *et al.*, 2002).



**Figura 5. Moxifloxacina.** Se muestra la estructura química de la moxifloxacina (izquierda), así como ejemplos de sus presentaciones comerciales (derecha).

#### **4.5.2. Aspectos farmacológicos**

La moxifloxacinina es absorbida muy bien por tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad del 90% y una vida media de 12 h tras una dosis de 400 mg (TB alliance, 2008 b). Se acumula en tejido respiratorio y en macrófagos alveolares en mayor proporción que en suero (Saravolatz and Leggett, 2003). La moxifloxacinina tiene buena penetración en piel, fluido sinovial, fluido intersticial de tejido muscular y adiposo (Guay, 2006), en neutrófilos y macrófagos (Pascual *et al.*, 1999). La moxifloxacinina es metabolizada principalmente de manera hepática vía conjugación de glucoronidos y sulfatos (TB alliance, 2008 b).

Los efectos tóxicos de la moxifloxacinina son pocos y no tan severos como los causados por otras quinolonas. Los mayores efectos adversos son náusea (6%), diarrea (5%) y mareos (2%) (Guay, 2006). La moxifloxacinina también ha sido implicada en artropatías como tendinitis (TB alliance, 2008 b) y en menor medida en cardiopatías (1%) (Guay, 2006). Pocos eventos (0.1% a < 3%) han relacionado a moxifloxacinina con: dolor abdominal, reacción alérgica, constipación, anorexia, leucopenia, mialgia, insomnio y vaginitis (TB alliance, 2008 b).

#### **4.5.3. Interacciones con el sistema inmune**

Como la mayoría de las quinolonas, gran parte de los efectos inmunomoduladores reportados de la moxifloxacinina giran en torno de la modulación en la producción de citocinas. Así pues, se ha reportado que la moxifloxacinina ocasiona una inhibición de la producción de las citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  de monocitos humanos estimulados con LPS, además de que causa una disminución dependiente de dosis de IL-6, IL-10 e IL-12, aunque sin llegar a ser significativa (Araujo *et al.*, 2002). En el mismo estudio se observó que los efectos antes mencionados no se encontraban cuando se estimulaba con la bacteria *Staphylococcus aureus* inactivada por calor (Araujo *et al.*, 2002). En un estudio posterior se corroboró la disminución de la producción de TNF- $\alpha$ , pero se encontró una disminución significativa en la producción de IL-6 en PBMC estimulados ya sea con LPS, ácido lipoteicoico o bacterias inactivadas por calor (Choi *et al.*, 2003).

Otras citocinas afectadas por la moxifloxacina son las involucradas en la respuesta inmune adaptativa. Al respecto se ha observado que la quinolona es capaz de disminuir el número de linfocitos T<sub>H</sub> (T CD4<sup>+</sup>) que expresan las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 (Williams *et al.*, 2005), aunque se desconoce el efecto sobre la secreción de dichas citocinas.

La moxifloxacina es capaz de disminuir la secreción de factores quimioatrayentes, principalmente IL-8, en diferentes modelos celulares tales como: neutrófilos (Williams *et al.*, 2001), células endoteliales, en las que también se observó una disminución de MCP-1 (Uriarte *et al.*, 2004); y células de epitelio bronquial, en las que también se encontró una disminución en la producción de GM-CSF, citocina con funciones hematopoyéticas (Zimmerman *et al.*, 2009). Se presume estos eventos están relacionados con la inhibición de la actividad de migración transendotelial de neutrófilos y monocitos, observado en el trabajo de Uriarte y colaboradores (2004).

La interacción de la moxifloxacina con factores de transcripción ha sido abordada en diversos estudios con el fin de elucidar el mecanismo de modulación de la producción de citocinas. De esta manera, estudios *in vitro* han mostrado que la moxifloxacina es capaz de inhibir la activación del NF- $\kappa$ B en diversos modelos celulares tales como PBMC (Choi *et al.*, 2003), monocitos (Weiss *et al.*, 2004; Shalit *et al.*, 2006) o inclusive en líneas celulares de epitelio con fibrosis quística (Blau *et al.*, 2007). Otros factores de transcripción que se ven inhibidos por acción de la moxifloxacina son la MAP-kinasa (Weiss *et al.*, 2004; Shalit *et al.*, 2006), ERK1/2 y JNK (Blau *et al.*, 2007).

Como la levofloxacina, la moxifloxacina favorece la eliminación de bacterias *in vivo* al combinar su efecto bactericida con su efecto inmunomodulador (Dalhoff, 2005). La actividad inmunomoduladora de esta quinolona es incluso capaz de proteger en contra de infecciones no bacterianas, como lo demuestran Shalit y colaboradores (2002), en cuyo estudio la moxifloxacina mejoró la calidad de vida y disminuyó la mortalidad de ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida y con infección pulmonar por *Candida albicans*.

## **4.6. IMMUNEPOTENT CRP**

El IMMUNEPOTENT CRP, conteniendo factor de transferencia, es un dializado de sustancias de mezclas heterogéneas de bajo peso molecular, obtenido luego de pasar el material soluble del bazo a través de una membrana con un poro de 12 a 14 kDa (Franco-Molina *et al.*, 2004). El factor de transferencia es una mezcla de sustancias las cuales pueden ser definidas por sus propiedades químicas, perfil espectrofotométrico y principalmente por las propiedades biológicas de transferir inmunidad celular contra uno o una variedad de antígenos (Kirkpatrick, 2000). Dado esto, el IMMUNEPOTENT CRP tiene la capacidad de transferir inmunidad específica a un individuo que no la posee, constituyendo así un tipo de inmunoterapia pasiva. El uso del producto es manejado en unidades (U).

### **4.6.1. Funciones y utilidades del IMMUNEPOTENT CRP**

El IMMUNEPOTENT CRP presenta una gran cantidad de efectos sobre el sistema inmune que son capaces de ayudar en el tratamiento contra infecciones, desórdenes inmunológicos y malignidades (Miranda-Hernández, 2009).

Diversos experimentos ponen de manifiesto las propiedades inmunomoduladoras e inmunopotenciadoras del IMMUNEPOTENT CRP: se ha observado que protege en contra del choque endotóxico inducido por lipopolisacárido (LPS) *in vivo* (Franco-Molina *et al.*, 2004) e *in vitro* (Franco-Molina *et al.*, 2007) disminuyendo la producción de las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 y la producción de óxido nítrico y aumentando la producción de IL-10 (Franco-Molina *et al.*, 2005), además de reducir la producción de especies reactivas de oxígeno *in vitro* (Miranda-Hernández, 2009).

El IMMUNEPOTENT ha mostrado actividad antitumoral sobre líneas celulares de cáncer de mama (Franco-Molina *et al.*, 2006), en las cuales es capaz de bloquear la actividad de unión a ADN de AP-1, inhibiendo la expresión de diversos factores de transcripción (Mendoza-Gamboa *et al.*, 2008). Modelos tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado su eficacia en contra de melanoma murino, en el que favorece la supervivencia, regresión tumoral y prevención de metástasis (Franco-Molina *et al.*,

2010). Además, estudios clínicos sugieren que IMMUNEPOTENT CRP favorece el mantenimiento de la integridad del sistema inmune de pacientes bajo régimen de quimio y radioterapia, incrementando su calidad de vida (Franco-Molina *et al.*, 2008).

Además de las capacidades antes descritas, el IMMUNEPOTENT CRP posee la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro* (Franco-Molina *et al.*, 2007), efecto de interés para el presente estudio.



## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC)**

Se colectó sangre periférica en tubos con heparina sódica por medio de punción venosa a partir de donadores sanos, previo consentimiento informado. Los donadores fueron del sexo masculino, con edades comprendidas entre 20 y 25 años.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron por medio de un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA) a 1600 rpm durante 30 min a 20°C, según las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizaron un par de lavados con solución amortiguadora de Hank (HBSS). En el caso de la prueba con monocitos, los lavados fueron realizados utilizando solución amortiguadora de fosfatos (PBS) fría para evitar la adhesión de los monocitos a la superficie del tubo.

Las PBMC se suspendieron en medio RPMI 1640 completo: medio RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen Corp, Grand Island, NY, USA) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, Invitrogen Corp, Grand Island, NY, USA), previamente inactivado a 56°C por 30 min; y suplementado con antibiótico estreptomina-penicilina (GIBCO, Invitrogen Corp, Grand Island, NY, USA).

### **5.2. FÁRMACOS**

Se utilizaron los antibióticos quinolónicos, levofloxacin (Elequine I.V. 500 mg/100 mL) (Janssen-Cilag, Hospira Inc. Austin TX, USA) y moxifloxacin (Avelox I.V. 400 mg/250 mL) (Bayer, Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Alemania). Para su uso en cultivo celular los antibióticos fueron esterilizados empleando filtros de jeringa de 0.22 micrones (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

### 5.3. IMMUNEPOTENT CRP

Se utilizó el IMMUNEPOTENT CRP, que es un extracto dializable de leucocitos de origen bovino, conteniendo factor de transferencia; elaborado en la Planta de Producción de Biológicos del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Una unidad (U) es considerada como el dializado de  $1.5 \times 10^9$  leucocitos de bovino. Para su empleo en cultivo celular, 10 U de liofilizado fueron suspendidas en 2 mL de PBS (5 U/mL) y esterilizado empleando filtros de jeringa de 0.22 micrones.

### 5.4. TRATAMIENTO DE LAS PBMC

Las PBMC fueron sembradas en medio RPMI 1640 completo y tratadas utilizando levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP como sigue:

- Tratamiento A            Levofloxacin 25  $\mu\text{g/mL}$
- Tratamiento B            Levofloxacin 50  $\mu\text{g/mL}$
- Tratamiento C            Moxifloxacin 25  $\mu\text{g/mL}$
- Tratamiento D            Moxifloxacin 50  $\mu\text{g/mL}$
- Tratamiento E            IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL
- Tratamiento F            IMMUNEPOTENT CRP 0.1 U/mL
- Tratamiento G            Levofloxacin 25  $\mu\text{g/mL}$  + IMMUNEPOTENT  
CRP 0.05 U/mL
- Tratamiento H            Moxifloxacin 25  $\mu\text{g/mL}$  + IMMUNEPOTENT  
CRP 0.05 U/mL
- Tratamiento I            PBS (control)

## 5.5. VIABILIDAD CELULAR

Para evaluar la viabilidad de las células tratadas se realizó el ensayo con Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA) como se describe a continuación (Choi *et al.*, 2003). Las PBMC se sembraron en medio RPMI 1640 completo a una concentración de  $10^4$  células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, se les aplicaron los tratamientos y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h. Una vez finalizado el período de incubación, se agregaron 20 µL de MTT (5 mg/mL) en PBS a cada pozo y se incubó de nuevo la placa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 2 h. Luego, la placa se centrifugó a 1600 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) a cada pozo, se agitó suavemente y se determinó la absorbancia a 540 nm mediante un lector de placas Synergy HT (Bio Tek Instruments, Inc. USA). Los valores de absorbancia obtenidos para los tratamientos fueron comparados con los del control para obtener el porcentaje de viabilidad celular relativa.

## 5.6. PRODUCCIÓN DE SUPERÓXIDO

Las PBMC fueron sembradas en medio RPMI 1640 completo en placas de 24 pozos a una concentración de  $3.5 \times 10^6$  células/pozo. Posteriormente se agregaron los tratamientos mencionados anteriormente y las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 h. Después, las células no adherentes fueron descartadas decantando el medio de las placas y lavando dos veces con solución amortiguadora de Hank (HBSS). Una vez obtenidos los monocitos adheridos en la placa, se agregó a cada pozo 0.1% de cloruro de nitroazul tetrazolio (NBT) (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA) diluido en HBSS más 600 ng/mL de forbol-miristato acetato (PMA) (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA). Los monocitos fueron incubados por 1 h a 37°C atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y posteriormente se descartó la solución de NBT y se lavaron con PBS a 37°C, luego se agregó metanol para fijar las células y se dejó secar. Después se agregaron 120 µL de hidróxido de potasio más 140 µL de DMSO y se agitó suavemente (100-200 rpm) por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se transfirieron 200 µL de la solución de cada tratamiento a placas de 96 pozos y se realizó la lectura de la absorbancia en un lector

de placas Synergy HT a 620 nm. Los valores de absorbancia son directamente proporcionales a la cantidad de producción del anión superóxido (Choi *et al.*, 2006).

## **5.7. DETERMINACIÓN DE LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS**

Las PBMC fueron sembradas en medio RPMI 1640 completo en placas de 12 pozos a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/pozo. Se agregaron los tratamientos para luego estimular adicionando fitohemaglutinina (PHA) (GIBCO, Invitrogen Corp, Grand Island, NY, USA), un activador policlonal de células T, diluida en medio RPMI 1640 completo a una concentración final de 5  $\mu\text{g/mL}$  por pozo. Posteriormente se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h con el fin de estimular la proliferación de las células (Medina *et al.*, 1994). Al terminar la incubación se colectaron las células de cada pozo y se ajustaron a  $2 \times 10^5$  en 50  $\mu\text{L}$  de solución de PBS + 5% SFB + 0.01% azida de sodio y se colocaron en tubos Falcon de 5 mL (BD Biosciences, USA) (Waters *et al.*, 2002). Se adicionaron a cada tubo 5  $\mu\text{L}$  del coctel correspondiente de anticuerpos marcados con los fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE) (CD45 FITC/CD14 PE, CD3 FITC/CD19 PE, CD3 FITC/CD4 PE, CD3 FITC/CD8 PE y CD3 FITC/CD16 PE + CD56 PE) del kit Simultest™ IMK-Lymphocyte (BD Biosciences, USA), se homogenizó la mezcla y se incubaron a temperatura ambiente y en la oscuridad por 20 min. Posteriormente, se realizó un lavado con solución de PBS + 5% SFB + 0.01% azida de sodio para eliminar el exceso de anticuerpos marcados y finalmente se fijaron las muestras agregando 500  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído al 1% en PBS. El conteo se realizó en un citómetro de flujo marca Epics Altra (Beckman Coulter, USA).

## **5.8. PRODUCCIÓN DE CITOCINAS**

Las PBMC se sembraron en medio RPMI 1640 completo en placas de 12 pozos a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/pozo. Se adicionaron los tratamientos y además el estimulador PHA a una concentración final de 5  $\mu\text{g/mL}$  por pozo y posteriormente se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h (Attar *et al.*, 2007). Las células fueron centrifugadas a 1600 rpm por 10 min y se colectaron los

sobrenadantes de cada tratamiento, los cuales fueron almacenados a -20 °C hasta su empleo para evaluación de la producción de las citocinas IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$ . La determinación de la producción de citocinas se realizó empleando los siguientes kits comerciales de ELISA: *Immunoassay Kit Human IL-2* (Biosource, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA), *Immunoassay Kit Human IL-10* (Biosource, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA) e *Quantikine Human IFN- $\gamma$  Immunoassay* (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA), respectivamente, de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. La lectura de las placas se realizó a 450 nm en un lector de placas Synergy HT.

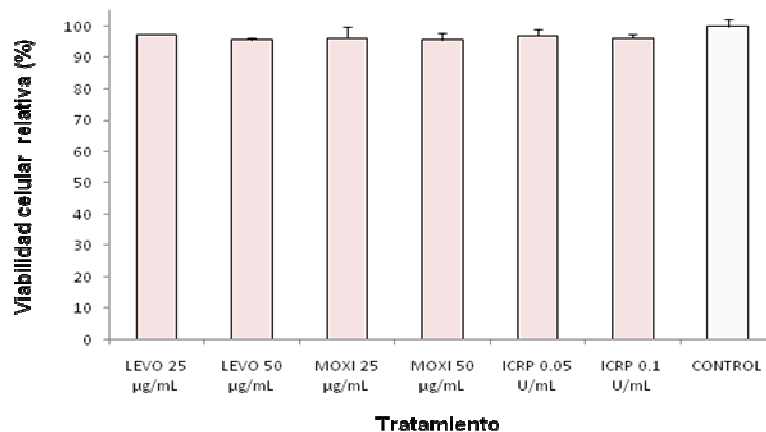
## **5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Cada experimento fue realizado dos veces por triplicado. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Dunnett para discernir si existía diferencia entre los tratamientos, tomándose valores de  $p < 0.05$  como significativos.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. VIABILIDAD CELULAR DE PBMC TRATADOS

Para determinar si los tratamientos utilizados en este estudio tienen efectos citotóxicos en contra de las PBMC que pudieran alterar los resultados de pruebas posteriores, se llevó a cabo el estudio de viabilidad celular mediante la técnica de MTT, encontrando que los tratamientos con levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP no afectaron la viabilidad celular relativa de las PBMC luego de 72 h de exposición (Figura 6).

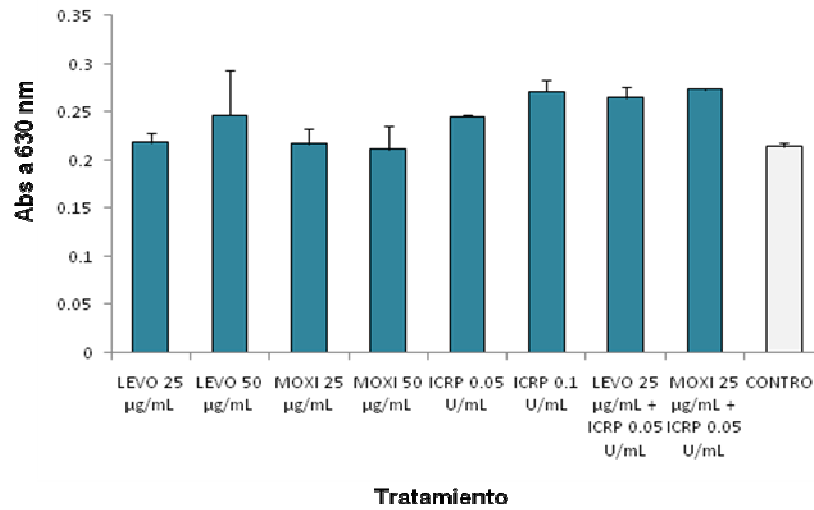


**Figura 6. Viabilidad celular relativa de las PBMC.** Se cultivaron  $10^4$  PBMC y se trataron con levofloxacin 25 y 50 µg/mL, moxifloxacin 25 y 50 µg/mL e IMMUNEPOTENT CRP 0.05 y 0.1 U/mL, e incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 72 h. Posteriormente, se agregaron 20 µL de MTT a cada pozo y se incubaron por 2 h, luego se centrifugó la placa, se descartó el sobrenadante y se agregó 100 µL de DMSO y las muestras se leyeron a una longitud de onda de 540 nm. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$  (\*). LEVO: levofloxacin; MOXI: moxifloxacin; ICRP: IMMUNEPOTENT CRP.

### 6.2. ACTIVIDAD OXIDATIVA DE MONOCITOS

La actividad oxidativa de monocitos obtenidos a partir de PBMC fue evaluada mediante la reducción intracelular de NBT. El valor de absorbancia obtenido es directamente proporcional a la cantidad de NBT oxidado que indirectamente nos indica la cantidad de anión superóxido producido intracelularmente.

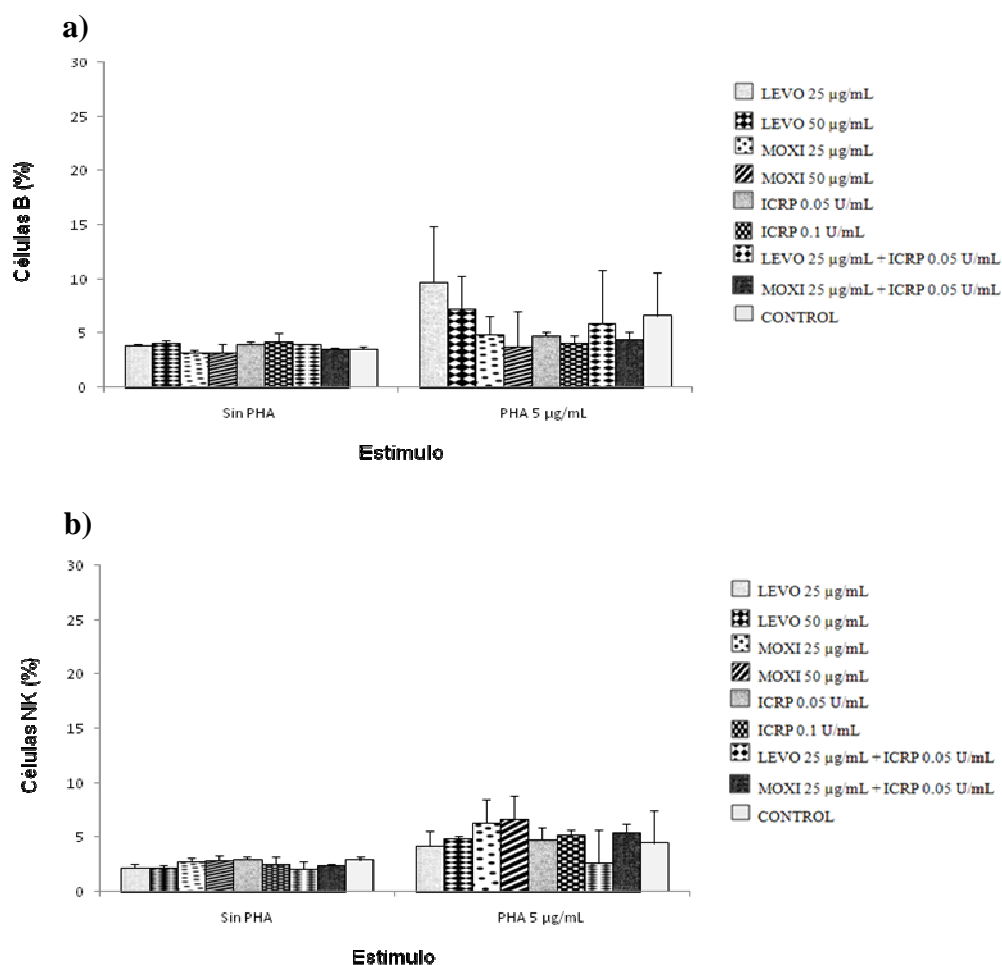
Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos no afectaron la producción del anión superóxido, comparados con el control (Figura 7).



**Figura 7. Producción del anión superóxido en monocitos.** Se cultivaron  $3.5 \times 10^6$  PBMC y se trataron con levofloxacina 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , moxifloxacina 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$  e IMMUNEPOTENT CRP 0.05 y 0.1 U/mL, y las combinaciones de levofloxacina 25  $\mu\text{g/mL}$  + IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL y moxifloxacina 25  $\mu\text{g/mL}$  + IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL e incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  por 3 h. Para la determinación de la producción del anión superóxido se siguió el protocolo descrito en materiales y métodos. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$  (\*). LEVO: levofloxacina; MOXI: moxifloxacina; ICRP: IMMUNEPOTENT CRP.

### 6.3. EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS

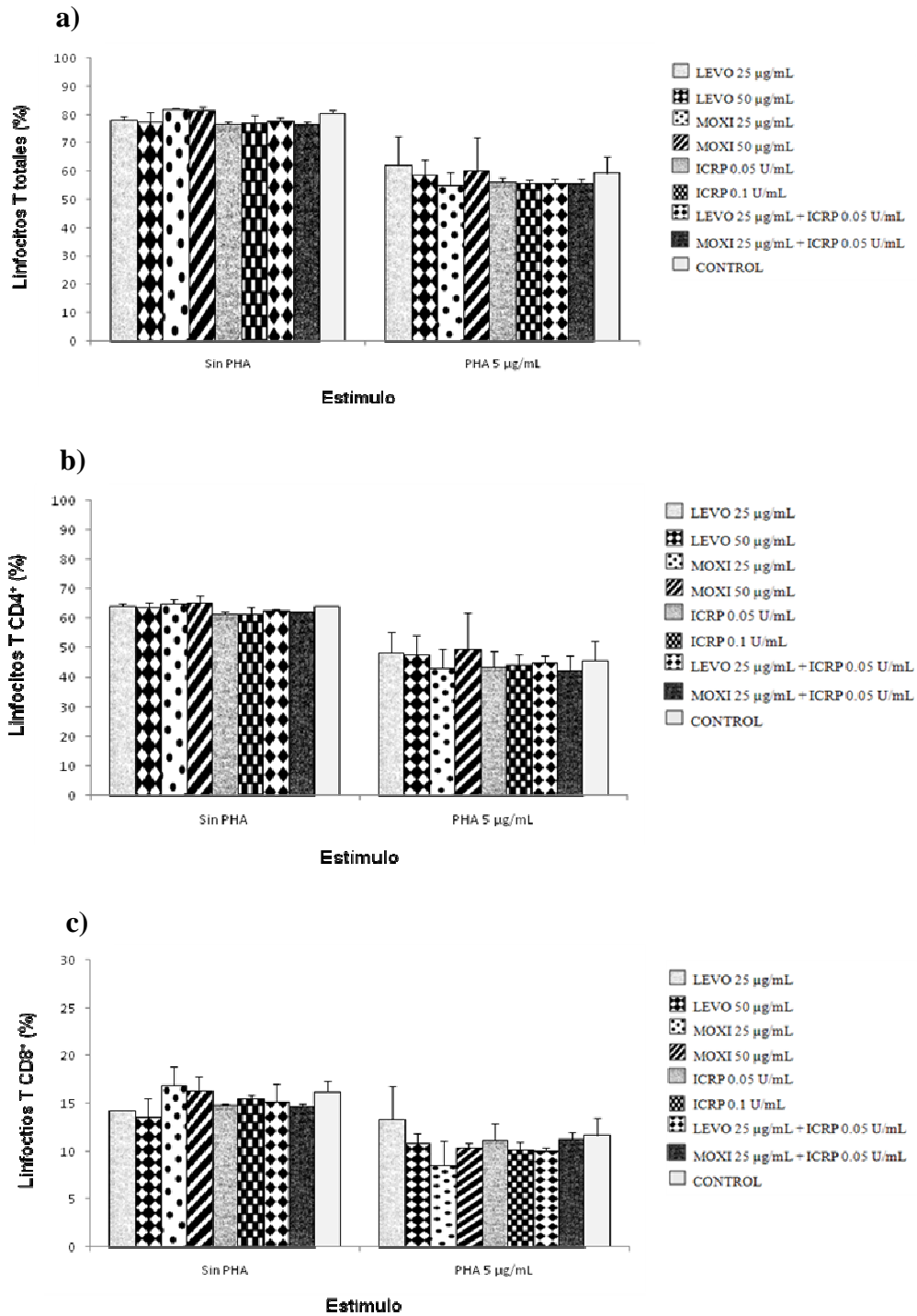
Para determinar si los tratamientos con levofloxacina, moxifloxacina, IMMUNEPOTENT CRP y sus combinaciones causaron un cambio en las proporciones de poblaciones de linfocitos, las PBMC cultivadas con los tratamientos fueron marcadas con anticuerpos marcados con fluorocromos y posteriormente leídas en un citómetro de flujo, encontrando algunos cambios en las proporciones de poblaciones de células B y NK entre tratamientos y el control, los cuales sin embargo no fueron estadísticamente significativos (Figura 8 a y b). Además, las poblaciones estimuladas con PHA presentan un incremento en los porcentajes de ambos tipos celulares (B y NK) con respecto a las no estimuladas, el cual no obstante no fue estadísticamente significativo (Figura 8 a y b).



**Figura 8. Evaluación del porcentaje de células B y NK en PBMC.** Se cultivaron  $2 \times 10^6$  PBMC y se trataron con levofloxacin 25 y 50 µg/mL, moxifloxacin 25 y 50 µg/mL e IMMUNEPOTENT CRP 0.05 y 0.1 U/mL, y las combinaciones de levofloxacin 25 µg/mL + IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL y moxifloxacin 25 µg/mL + IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL; se estimularon o no con 5 µg/mL de fitohemaglutinina y se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 72 h. Luego, las células fueron incubadas con anticuerpos marcados con fluorocromos, fijadas y posteriormente leídas en un citómetro de flujo para obtener el porcentaje de células B **(a)** y NK **(b)**. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$  (\*). LEVO: levofloxacin; MOXI: moxifloxacin; ICRP: IMMUNEPOTENT CRP; PHA: fitohemaglutinina.

Por otra parte, los resultados muestran que no hubo diferencia en la proporción de células T totales entre los tratamientos y el control. Sin embargo, se encontró diferencia ( $p < 0.05$ ) entre las poblaciones de células estimuladas y no estimuladas con PHA (Figura 9 a). Al evaluar la proporción de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, estas tampoco se vieron afectadas por los tratamientos, pero como en el caso de los linfocitos T totales, ocurrió una disminución en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> en la población celular que fue estimulada con 5 µg/mL de PHA (Figura 9 b y c).





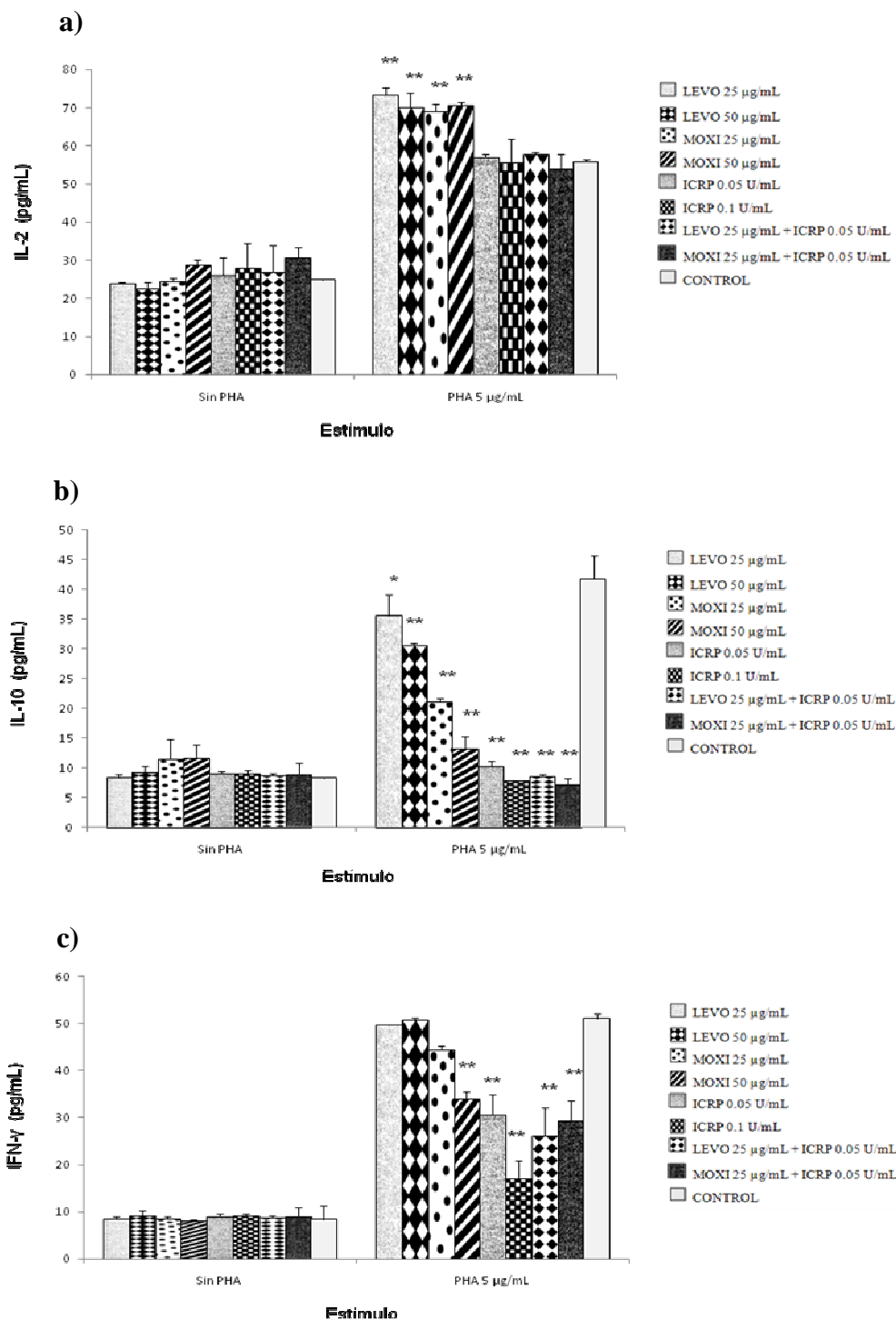
**Figura 9. Evaluación del porcentaje de linfocitos T totales, T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> en PBMC.** Se cultivaron  $2 \times 10^6$  PBMC y se trataron con levofloxacin 25 y 50 µg/mL, moxifloxacin 25 y 50 µg/mL e IMMUNEPOTENT CRP 0.05 y 0.1 U/mL, y las combinaciones de levofloxacin 25 µg/mL + IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL y moxifloxacin 25 µg/mL + IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL; se estimularon o no con 5 µg/mL de fitohemaglutinina y se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 72 h. Luego, las células fueron incubadas con anticuerpos marcados con fluorocromos, fijadas y posteriormente leídas en un citómetro de flujo para obtener el porcentaje de células T totales (a), T CD4<sup>+</sup> (b) y T CD8<sup>+</sup> (c). Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$  (\*). LEVO: levofloxacin; MOXI: moxifloxacin; ICRP: IMMUNEPOTENT CRP; PHA: fitohemaglutinina.

#### 6.4. PRODUCCIÓN DE CITOCINAS

Tras exponer por 24 h a las PBMC a los tratamientos en presencia o ausencia de estimulación con PHA, la producción de las citocinas IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$  fue evaluada por medio de ELISA. El análisis estadístico demostró que los tratamientos no afectaron la producción de IL-2 en las células no estimuladas con PHA, pero se observó diferencia significativa entre los tratamientos en las células estimuladas con PHA, encontrando que levofloxacina y moxifloxacina, a las dosis de 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , incrementaron la producción de IL-2 en alrededor de 30% ( $p < 0.01$ ) y que IMMUNEPOTENT CRP solo y combinado en sus diferentes dosis no afectó la producción de esta citocina (Figura 10 a).

Al evaluar la producción de IL-10, se observó que los tratamientos no afectaron la producción de esta citocina en las células no estimuladas con PHA, pero su producción se vio afectada cuando las células se estimularon con PHA, en las cuales se observó una disminución de la producción de IL-10 con respecto al control de manera dependiente de dosis: 14% ( $p < 0.05$ ) y 26% ( $p < 0.01$ ) para levofloxacina 25  $\mu\text{g/mL}$  y 50  $\mu\text{g/mL}$ ; 49% ( $p < 0.01$ ) y 68% ( $p < 0.01$ ) para moxifloxacina 25  $\mu\text{g/mL}$  y 50  $\mu\text{g/mL}$ ; 75% ( $p < 0.01$ ) y 81% ( $p < 0.01$ ) para IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL y 0.1 U/mL; y 79% ( $p < 0.01$ ) y 82% ( $p < 0.01$ ) para las combinaciones de levofloxacina 25  $\mu\text{g/mL}$  + IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL y moxifloxacina 25  $\mu\text{g/mL}$  + IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL, respectivamente (Figura 10 b).

La producción de IFN- $\gamma$  no se alteró bajo ningún tratamiento en células no estimuladas con PHA. Respecto a las células que fueron estimuladas con PHA, la producción de IFN- $\gamma$  no se afectó con los tratamientos de levofloxacina, ni con la dosis de 25  $\mu\text{g/mL}$  de moxifloxacina. En el resto de los tratamientos se observó disminución en la producción de IFN- $\gamma$ : 33% ( $p < 0.01$ ) para moxifloxacina 50  $\mu\text{g/mL}$ , 39% ( $p < 0.01$ ) y 66% ( $p < 0.01$ ) para IMMUNEPOTENT CRP 0.05 y 0.1 U/mL, respectivamente; 48% ( $p < 0.01$ ) para la combinación de levofloxacina 25  $\mu\text{g/mL}$  + IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL y 42% ( $p < 0.01$ ) para la combinación de moxifloxacina 25  $\mu\text{g/mL}$  + IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL (Figura 10 c).



**Figura 10. Evaluación de la producción de IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$  en PBMC.** Se cultivaron  $10^6$  PBMC y se trataron con levofloxacin 25 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , moxifloxacin 25 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e IMMUNEPOTENT CRP 0.05 y 0.1 U/mL, y las combinaciones de levofloxacin 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL y moxifloxacin 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + IMMUNEPOTENT CRP 0.05 U/mL; se estimularon o no con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fitohemaglutinina y se incubaron a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  por 24 h. Posteriormente se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos y se realizó ELISA para IL-2 (a), IL-10 (b) e IFN- $\gamma$  (c). Se consideraron significativos los valores de  $p < 0.05$  (\*) y  $p < 0.01$  (\*\*). LEVO: levofloxacin; MOXI: moxifloxacin; ICRP: IMMUNEPOTENT CRP; PHA: fitohemaglutinina; pg: picogramos.

## VII. DISCUSIÓN

Las quinolonas son antibióticos sintéticos de amplio espectro con la capacidad de modular el sistema inmune (Dalhoff, 2005). Dos quinolonas utilizadas a gran escala en la actualidad son la levofloxacin y la moxifloxacin (Bolon, 2009). El IMMUNEPOTENT CRP también posee efectos inmunomoduladores (Franco-Molina *et al.*, 2007). Dado el uso terapéutico de los compuestos anteriormente citados, el definir su papel en la modulación del sistema inmune resulta crucial ya que puede ser de gran importancia clínica, sobre todo en pacientes inmunodeficientes o en unidades de cuidado intensivo.

Como parte de este estudio se evaluó el efecto de la levofloxacin, la moxifloxacin y el IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad de las PBMC. Los resultados obtenidos muestran que no hubo variaciones significativas sobre la viabilidad relativa de PBMC a ninguna de las dosis empleadas, corroborando anteriores investigaciones de Yoshimura y colaboradores (1996), Williams y colaboradores (2001), y Franco-Molina y colaboradores (2007), para levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP, respectivamente. Esto indica que estos compuestos son seguros para su administración por cualquier vía y también nos da la pauta para atribuir cualquier efecto inmunomodulador encontrado a la acción del compuesto independiente de toxicidad celular.

Otro parámetro considerado fue la actividad oxidativa de monocitos, evaluada mediante la producción intracelular del anión superóxido. Dicha actividad no resultó afectada luego de la administración de los diferentes tratamientos de levofloxacin, moxifloxacin, IMMUNEPOTENT CRP y las combinaciones (ver materiales y métodos para aclaraciones). Estos resultados difieren de los anteriormente reportados, en los que se encontró que los tratamientos con quinolonas incrementaban la producción de superóxido en macrófagos de rata estimulados con PMA (Azuma *et al.*, 1999). Probablemente la diferencia de los resultados se deba a la diferencia del modelo ya que, estudios realizados en células de humano muestran que la moxifloxacin no afecta la actividad oxidativa de neutrófilos luego de su activación con *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* (Fischer and Adam,

2001). Respecto a IMMUNEPOTENT CRP, estudios anteriores reportan que tiene la capacidad de inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno en macrófagos (Miranda-Hernández). Aunque, hay que señalar que el estimulante fue LPS, el cual se tiene reportado que induce una fuerte producción de óxido nítrico, pero no de superóxido (Choi *et al.*, 2006). En nuestro estudio se utiliza el PMA, un estimulador que, contrario al LPS, induce la producción de superóxido pero no de óxido nítrico (Choi *et al.*, 2006); por lo que nuestros resultados no se traslapan, ni contradicen a los de Miranda-Hernández (2009), sino que los complementan. Dado los reportes anteriores, resulta complicado definir el papel de la levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP sobre las actividades de los fagocitos.

Diversos efectos moduladores han sido reportados para los compuestos de interés de este estudio sobre importantes factores de transcripción involucrados con el sistema inmune tales como NF- $\kappa$ B (Mendoza-Gamboa *et al.*, 2008; Shalit *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2003), AP-1 (Mendoza-Gamboa *et al.*, 2008) y MAP-kinasa (Shalit *et al.*, 2006). Dadas las funciones de estos factores de transcripción como integradores de señal en la activación de linfocitos (Abbas *et al.*, 2010), nos fue de interés averiguar si la levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP promovían o inhibían la proliferación de alguna subpoblación de linfocitos, que pudiera reflejarse en un aumento o disminución de su proporción. El análisis se realizó mediante citometría de flujo, dando como resultado que las diferentes dosis de los compuestos, así como sus combinaciones, no variaron los porcentajes de linfocitos B, NK, T totales, T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> comparados con el control. La ausencia de diferencia significativa entre los tratamientos y el control ocurrió tanto para células sin estímulo como para células estimuladas con PHA. Estos experimentos parecen ser los primeros realizados al respecto ya que no se encontró bibliografía en la que se reportara el efecto *in vitro* del tratamiento con quinolonas o IMMUNEPOTENT CRP sobre los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos. Además, nuestros resultados mostraron que cuando se estimulaban las células con PHA, se disminuía el porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos T (Figura 9 a,b,c), lo cual ocurría independientemente de los tratamientos. Este hallazgo no es novedoso ya que Lim y colaboradores (1998) ya habían reportado este fenómeno, el cual posteriormente fue confirmado por Díaz y colaboradores (2004), quienes lo atribuyeron a la pérdida de

expresión del marcador de superficie CD3 por una activación de los mecanismos apoptóticos de los linfocitos causado por la estimulación con PHA.

El estimulante PHA también fue utilizado para evaluar la producción de citocinas por parte de las PBMC tratadas con levofloxacin, moxifloxacin, IMMUNEPOTENT CRP y las combinaciones. Las citocinas evaluadas fueron IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$  que, como se sabe, son secretadas por linfocitos T activados, con excepción de la IL-10 que también es secretada por monocitos (Abbas et al., 2010). Los resultados muestran que la producción de las citocinas antes mencionadas no varió entre los tratamientos y el control en PBMC que no fueron estimuladas. Sin embargo, cuando las PBMC se estimularon con PHA, se pudo observar como los tratamientos tenían efectos significativos sobre la producción de citocinas (Figura 10 a,b,c). Al respecto, es prudente mencionar que los efectos estimulantes o inhibitorios de las quinolonas en lo que refiere a síntesis de citocinas solo pueden observarse cuando las células son expuestas a estimulantes como lectinas (p.ej. PHA, Concanavalina A), citocinas (p.ej. TNF- $\alpha$ , IL-1), LPS o PMA; o a estresantes como radiación o fármacos citotóxicos (Dalhoff, 2005). El IMMUNEPOTENT CRP parece comportarse de forma similar a las quinolonas ya que, al menos en lo que refiere a la producción de las citocinas aquí evaluadas, no ejerció ningún efecto notable en ausencia de PHA (Figura 10 a,b,c).

Respecto a los efectos específicos de cada tratamiento tenemos que la levofloxacin incrementó la producción de IL-2 en las dosis de 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , efecto que concuerda con lo reportado por Yoshimura y colaboradores (1996) para esta quinolona. La moxifloxacin también incrementó la producción de IL-2 en las dosis de 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , hallazgo que difiere de lo reportado por Potjo (2007) que no encontró diferencia significativa en la producción de IL-2 de células tratadas con moxifloxacin 10  $\mu\text{g/mL}$  y estimuladas con PHA, lo que podría indicar que se requiere de una dosis mayor de la quinolona para que ejerza efecto sobre la producción de IL-2. El efecto en la sobreproducción de IL-2 no parece correlacionarse a los resultados de la citometría en la que la proporción de linfocitos T no presentan un aumento significativo con respecto al control para ninguna dosis de levofloxacin ni moxifloxacin. Una posible respuesta podría ser una inhibición en la expresión de superficie del receptor de IL-2 como reportan Yoshimura y

colaboradores (1996) para levofloxacin, que causarí una acumulaci3n de IL-2 en el sobrenadante del cultivo sin afectar considerablemente el n3mero de linfocitos T. El efecto clí nico es difí cil de definir, pero dadas las funciones de la IL-2 como principal promotor del desarrollo de células T reguladoras (Malek, 2003), la sobreproducci3n de IL-2 podrí a indirectamente promover un ambiente anti-inflamatorio benéfico para controlar la inflamaci3n aguda causada por infecciones por bacterias, aunque a su vez podrí a ser perjudicial en el caso de pacientes con c3ncer.

El IMMUNEPOTENT CRP no mostr3 ning3n efecto sobre la producci3n de la IL-2 a ninguna dosis concordando con reportes anteriores para el factor de transferencia (Alvarez-Thull and Kirkpatrick, 1996), al igual que las combinaciones de este con las quinolonas, lo que indica que de alguna manera el IMMUNEPOTENT CRP modula los efectos de estos antibió ticos, al menos en lo que respecta a este par3metro. Es probable que lo anterior est3 relacionado con las propiedades protectoras del IMMUNEPOTENT CRP contra los efectos secundarios de fá rmacos para quimioterapia del c3ncer reportados por Franco-Molina y colaboradores (2008), aunque aun hacen falta estudios para elucidar el mecanismo de este proceso.

Otra de las citocinas cuya producci3n fue evaluada en este estudio es la IL-10. Los resultados indican que todos los tratamientos evaluados causan, en mayor o menor medida, la inhibici3n de la producci3n de IL-10 (Figura 10 b). Nuestros resultados difieren de los encontrados por Araujo y colaboradores (2002) para la moxifloxacin, en donde, a la dosis de 10 µ g/mL y bajo estí mulo de LPS, no existi3 una inhibici3n estadísticamente significativa. Sin embargo, ellos mencionan que se notaba un patr3n dependiente de dosis en su inhibici3n, por lo que probablemente si se utilizaran las dosis de 25 y 50 µ g/mL, si se lograrí a encontrar inhibici3n. La diferencia entre nuestros resultados y los de Araujo y colaboradores (2002) podrí a deberse tambi3n al estí mulo utilizado (LPS suyo contra PHA nuestro), ya que diferentes estí mulos pueden originar efectos diferenciales de las quinolonas en la producci3n de citocinas debido probablemente a las diferentes vÍ as de señ alizaci3n que los estimulantes activan (Araujo *et al.*, 2002). Por otra parte, nuestros resultados concuerdan con los de Khan y colaboradores (1998) para la trovafloxacin, pues se muestra una inhibici3n de la producci3n de IL-10 dependiente de dosis; aunque es importante mencionar que la trovafloxacin fue descartada del mercado debido a sus efectos

hepatotóxicos. También concuerdan con los reportes de Franco-Molina y colaboradores (2007) para el IMMUNEPOTENT CRP, en los que se inhibe la producción de IL-10 y otras citocinas de células sanguíneas tras estímulo con LPS. Dado el papel de la IL-10 como supresora de la respuesta inflamatoria (Couper *et al.*, 2008), su inhibición podría realzar las reacciones inflamatorias durante infecciones. No obstante, es complicado discernir las implicaciones clínicas de nuestros resultados, ya que estudios *in vivo* de choque séptico inducido por LPS, han demostrado que se aumenta la producción de IL-10 tras la administración de la quinolona ciprofloxacina (Khan *et al.*, 2000), pero se disminuye tras la administración de IMMUNEPOTENT CRP (Franco-Molina *et al.*, 2004); en ambos casos atenuando la severidad de los síntomas y favoreciendo la supervivencia. Lo que nos indica que la modulación de la producción de solo IL-10 no es suficiente para la atribución de propiedades pro o anti-inflamatorias a los compuestos.

En cuanto al efecto de los tratamientos sobre la producción de IFN- $\gamma$ , se encontró que la dosis de moxifloxacina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y todos los tratamientos que contenían IMMUNEPOTENT CRP, disminuían de manera significativa la producción de esta citocina, mientras que el resto de los tratamientos no la afectaban, aunque cabe señalar que la dosis de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de moxifloxacina también mostró inhibición, pero sin llegar a ser significativa. No se encontraron reportes sobre la influencia de la levofloxacina sobre este parámetro. En cuanto a la moxifloxacina existen algunos reportes que concuerdan con nuestros resultados como el trabajo de Potjo (2007), en el que no se encontró efecto sobre la producción de IFN- $\gamma$  a la dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , efecto que, de acuerdo a nuestros resultados, solo aparece bajo dosis más altas (arriba de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). No obstante, Williams y colaboradores (2005) reportan que la moxifloxacina disminuye el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> que expresan IFN- $\gamma$  intracelular de manera dependiente de dosis, a partir de la dosis de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la quinolona. Hay que señalar que en el estudio anteriormente citado utilizan un estimulador distinto (PMA + Ionomicina) a la PHA que nosotros utilizamos, lo que se sabe puede originar distintos resultados (Araujo *et al.*, 2002). Además, el efecto sobre una población específica puede diferir del efecto global, ya que existen otras poblaciones de células secretoras de IFN- $\gamma$ , tales como células T CD8<sup>+</sup> y células NK (Stark *et al.*, 1998), que podrían actuar de manera compensatoria.



No se tienen reportes anteriores del efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la producción de IFN- $\gamma$ , por lo que este resultado servirá como precedente para futuras investigaciones al respecto. Al igual que con los resultados de IL-2, el efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la producción de IFN- $\gamma$  se sobrepone al efecto de las quinolonas. La inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  observada para la moxifloxacin y el IMMUNEPOTENT CRP podría estar relacionada con los efectos anti-inflamatorios anteriormente observados de estos compuestos, indicando que dichos efectos no solo actúan de manera inmediata sobre mecanismo innatos, sino también sobre la respuesta de tipo adquirida.

El motivo de combinar los tratamientos de las quinolonas con IMMUNEPOTENT CRP fue el de ver si existía interacción entre estos fármacos y su posible relación con su empleo concomitante o el no empleo de estos. Como se mencionó con anterioridad para IL-2 e IFN- $\gamma$ , los efectos del IMMUNEPOTENT CRP sobresalen ante los de las quinolonas (Figura 10 a y c). El mecanismo de este evento se desconoce, pero como se mencionó anteriormente podría estar relacionado con el mecanismo de protección contra efectos secundarios de fármacos para quimioterapia del cáncer (Franco-Molina *et al.*, 2008). Además, es posible que dichas interacciones existan también con los agentes estimuladores (p.ej. LPS, PHA), en cuyo caso sus efectos benéficos se deberían al bloqueo de la toxina, más que a la modulación de las funciones de las células afectadas. Es necesario, pues, realizar estudios para elucidar tales mecanismos.

Los efectos encontrados en este estudio para levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP contribuyen al banco de conocimiento de las propiedades inmunomoduladoras de estos compuestos. No obstante, es necesario continuar realizando estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos animales y humanos concernientes al efecto de estos fármacos sobre el sistema inmune para elucidar su función sobre los componentes de este sistema.

## VIII. CONCLUSIONES

- La levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP no afectan la viabilidad celular de PBMC luego de 72 h de cultivo.
- La levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP no afectan los niveles de producci3n intracelular del an3n super3xido en monocitos estimulados.
- La levofloxacin, moxifloxacin e IMMUNEPOTENT CRP no afectan las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos en PBMC luego de su cultivo por 72 h con o sin el estimulador fitohemaglutinina.
- La levofloxacin incrementa la producci3n de IL-2, disminuye la de IL-10 y no afecta la de IFN- $\gamma$  en PBMC estimulados con fitohemaglutinina.
- La moxifloxacin incrementa la producci3n de IL-2, disminuye la de IL-10 y la de IFN- $\gamma$  en PBMC estimulados con fitohemaglutinina.
- El IMMUNEPOTENT CRP no afecta la producci3n de IL-2 y disminuye la de IL-10 y la de IFN- $\gamma$  en PBMC estimulados con fitohemaglutinina.
- Las combinaciones de IMMUNEPOTENT CRP + levofloxacin e IMMUNEPOTENT CRP + moxifloxacin no afectan la producci3n de IL-2, disminuyen la producci3n de IL-10 en mayor medida que cada compuesto por separado y disminuyen la producci3n de IFN-  $\gamma$ .

## LITERATURA CITADA

- Abbas AK, Lichtman AH. 2005. *Inmunología celular y molecular*. 5ta edición. Ed. Saunders. Elsevier Science. Madrid, España.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2010. *Cellular and molecular immunology*. Updated 6<sup>th</sup> edition. Ed. Saunders. Elsevier Inc. Philadelphia, US
- Alós JI. 2003. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 21: 261-268
- Alvarez-Thull L, Kirkpatrick CH. 1996. Profiles of cytokine production in recipients of transfer factors. *Biotherapy*; 9: 55-59
- Appelbaum PC, Gillespie SH, Burley CJ, Tillotson GS. 2004. Antimicrobial selection for community-acquired lower respiratory tract infections in the 21<sup>st</sup> century: a review of gemifloxacin. *Int J Antimicrob Agents*; 23: 533-546
- Araujo FG, Slifer TL, Remington JS. 2002. Effect of moxifloxacin on secretion of cytokines by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Clin Microbiol Infect*; 8: 26-30
- Attar M, Kondolousy YM, Khansari N. 2007. Effect of high dose natural ionizing radiation on the immune system of the exposed residents of Ramsar town, Iran. *Iran J Allergy Asthma Immunol*; 6: 73-78
- Azuma Y, Ohura K. 2003. Alteration of constitutive apoptosis in neutrophils by quinolones. *Inflammation*; 27: 115-122
- Azuma Y, Shinohara M, Murakawa N, Ohura K. 1999. Possible interaction between new quinolones and immune functions in macrophages. *Gen Pharmacol*; 32: 609-614
- Blau H, Klein K, Shalit I, Halperin D, Fabian I. 2007. Moxifloxacin but not ciprofloxacin or azithromycin selectively inhibits IL-8, IL-6, ERK1/2, JNK, and NF- $\kappa$ B activation in a cystic fibrosis epithelial cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 292: L343-L352
- Bolon MK. 2009. The newer fluoroquinolones. *Infect Dis Clin N Am*; 23: 1027-1051
- Brooks BM, Hart CA, Coleman JW. 2005. Differential effects of  $\beta$ -lactams on human IFN- $\gamma$  activity. *J Antimicrob Chemother*; 56: 1122-1125
- Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. 2008. *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 11va edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Distrito Federal, México: pp 1203-1222
- Campos MA, Morey P, Bengoechea JA. 2006. Quinolones sensitize gram-negative bacteria to antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*; 50: 2361-2367
- Cheung O, Chopra K, Yu T, Nalesnik MA, Amin S, Shakil AO. 2004. Gatifloxacin-induced hepatotoxicity and acute pancreatitis. *Ann Int Med*; 140: 73-74
- Chida D, Osaka T, Hashimoto O, Iwakura Y. 2006. Combined interleukin-6 and interleukin-1 deficiency causes obesity in young mice. *Diabetes*; 55: 971-977

- Chien SC, Chow AT, Rogge MC, Williams RR, Hendrix CW. 1997. Pharmacokinetics and safety of oral levofloxacin in Human Immunodeficiency Virus-infected individuals receiving concomitant zidovudine. *Antimicrob Agents Chemother*; 41: 1765-1769
- Choi HS, Kim JW, Cha Y-N, Kim C. 2006. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem*; 27: 31-34
- Choi J-H, Song M-J, Kim S-H, Choi S-M, Lee D-G, Yoo J-H, Shin W-S. 2003. Effect of moxifloxacin on production of proinflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrob Agents Chemother*; 47: 3704-3707
- Couper KN, Blount DG, Riley EM. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*; 180: 5771-5777
- Dalhoff A. 2005. Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection*; 33 (Suppl 2): 55-70
- Dalhoff A, Shalit I. 2003. Immunomodulatory effects of quinolones. *Lancet Infect Dis*; 3: 359-371
- Delves PJ, Roitt IM. 2000 A. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*; 343: 37-49
- Delves PJ, Roitt IM. 2000 B. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*; 343: 108-117
- Diaz D, Prieto A, Barcenilla H, Monserrat J, Prieto P, Sánchez MA, *et al.* 2004. Loss of lineage antigens is a common feature of apoptotic lymphocytes. *J Leukoc Biol*; 76: 609-615
- Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. 2008. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother*; 52: 385-392
- Fabian I, Reuveni D, Levitov A, Halperin D, Priel E, Shalit I. 2006. Moxifloxacin enhances antiproliferative and apoptotic effects of etoposide but inhibits its proinflammatory effects in THP-I and Jurkat cells. *Brit J Cancer*; 95: 1038-1046
- Falagas ME, Bliziotis IA. 2006. Quinolones for treatment of human brucellosis: critical review of the evidence of microbiological and clinical studies. *Antimicrob Agents Chemother*; 50: 22-33
- Falagas ME, Matthaiou DK, Bliziotis IA. 2007. Systematic review: fluoroquinolones for the treatment of intra-abdominal surgical infections. *Aliment Pharmacol Ther*; 25: 123-131
- Ferrara AM. 2007. A brief review of moxifloxacin in the treatment of elderly patients with community-acquired pneumonia (CAP). *Clin Intervent Aging*; 2: 179-187
- Fischer S, Adam D. 2001. Effects of moxifloxacin on neutrophil phagocytosis, burst production, and killing as determined by whole-blood cytofluorometric method. *Antimicrob Agents Chemother*; 45: 2668-2669
- Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2004. Bovine dialyzable leucocyte extract protects against LPS-induced murine endotoxic shock. *Int Immunopharmacol*; 4: 1577-1586
- Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2005. Bovine dialyzable leucocyte extract modulates the nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated murine peritoneal macrophages in vitro. *J Med Food*; 8: 20-26

- Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-Tello P, Isaza-Brando CE, García ME, Castillo-León L, *et al.* 2007. Bovine dialyzable leucocyte extract modulates cytokines and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated human blood cells. *Cytotherapy*; 9: 30
- Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández D, Zapata-Benavides P, Castillo-León L, Isaza-Brando C, *et al.* 2006. In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells. *Cytotherapy*; 8: 408-414
- Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, Isaza-Brando CE, Zamora-Ávila D, *et al.* 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of IMMUNEPOTENT CRP in murine melanoma. *Immunopharmacol Immunotoxicol*; 32: 637-646
- Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Vera-García ME, Castillo-Tello P, García de la Fuente A, *et al.* 2008. IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-small cell lung cancer patients. *Cytotherapy*; 10: 490-496
- Giordano P, Weber K, Gesin G, Kubert J. 2007. Skin and skin structure infections: treatment with newer generation fluoroquinolones. *Ther Clin Risk Manag*; 3: 309-317
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. 2003. *Immunology*. 5ta edición. Ed. W.H. Freeman, New York.
- Gollapudi S, Chuoh SK, Harvey T, Thadepalli HD, Tadepalli H. 1993. In vivo effects of rufloxacin and ciprofloxacin on T-cell subsets and tumor necrosis factor production in mice infected with *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother*; 37:1711-1712
- Guay DRP. 2006. Moxifloxacin in the treatment of skin and skin structure infections. *Ther Clin Risk Manag*; 2: 417-434
- Gutiérrez-Zufiaurre N. 2004. Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas. *Rev Esp Quimioterap*; 17: 232-243
- Hodge S, Hodge G, Jersmann H, Matthews G, Ahern J, Holmes M, Reynolds PN. 2008. Azithromycin Improves macrophage phagocytic function and expression of mannose receptor in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*; 178: 139-148
- Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, Hasegawa S, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. 2001. Clarithromycin inhibits NFκB activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*; 45: 44-47
- Khaira A, Gupta A, Tandon N, Agarwal SK. 2009. Gatifloxacin-induced severe hyperglycaemia and ketoacidosis in a non-diabetic renal transplant recipient. *Clin Exp Nephrol*; 13: 89-91
- Khan AA, Slifer TR, Remington JS. 1998. Effect of trovafloxacin on production of cytokines by human monocytes. *Antimicrob Agents Chemother*; 42: 1713-1717
- Kiangkitiwan B, Doppalapudi A, Fonder M, Solberg K, Bohner B. 2008. Levofloxacin-induced delirium with psychotic features. *Gen Hosp Psych*; 30: 381-382
- Kirkpatrick CH. 2000. Transfer factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules. *Mol Med*; 6: 332-341
- Klimpel GR, Eaves-Pyles T, Moen ST, Taormina J, Peterson JW, Chopra AK, *et al.* 2008. Levofloxacin rescues mice from lethal intra-nasal infections with virulent *Francisella*

- tularensis* and induces immunity and production of protective antibody. *Vaccine*; 26: 6874-6882
- Kristian SA, Timmer AM, Liu GY, Lauth X, Sal-Man N, Rosenfeld Y, *et al.* 2007. Impairment of innate immune killing mechanisms by bacteriostatic antibiotics. *The FASEB Journal*; 21: 1107-1116
- Lim LCL, Fiordalisi MN, Mantell JL, Schmitz JL, Folds JD. 1998. A whole-blood assay for qualitative and semiquantitative measurements of CD69 surface expression on CD4 and CD8 T lymphocytes using flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol*; 5: 392-398
- Malek TR. 2003. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory T cells. *J Leukoc Biol*; 74: 961-965
- Mandell L, Tillotson G. 2002. Safety of fluoroquinolones: an update. *Can J Infect Dis*; 13: 54-61
- McGregor JC, Allen GP, Bearden DT. 2008. Levofloxacin in the treatment of complicated urinary tract infections and acute pyelonephritis. *Ther Clin Risk Manag*; 4: 843-853
- Medina E, Borthwick N, Johnson MA, Miller S, Bofill M. 1994. Flow cytometric analysis of the stimulatory response of T cell subsets from normal and HIV-1<sup>+</sup> individuals to various mitogenic stimuli *in vitro*. *Clin exp immunol*; 97: 266-272
- Mendoza-Gamboa E, Franco-Molina MA, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, Vera-García ME, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2008. Bovine dialyzable leukocyte extract modulates AP-1 DNA-binding activity and nuclear transcription factor expression in MCF-7 breast cancer cells. *Cytotherapy*; 10: 212-219
- Miranda-Hernández DF. 2009. Efecto antioxidante y antiinflamatorio del Immunepotent CRP. Tesis de maestría. Laboratorio de Inmunología y Virología, FCB, UANL. Nuevo León, México
- Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. 2008. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Dif*; 15: 226-233
- Oliphant CM, Green GM. 2002. Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician*; 65: 455-464
- Padovan E, von Greyerz S, Pichler WJ, Weltzien HU. 1999. Antigen-dependent and -independent IFN- $\gamma$  modulation by penicillins. *J Immunol*; 162: 1171-1177
- Pardillo FEF, Burgos J, Fajardo TT, De la Cruz E, Abalos RM, Paredes RMD, *et al.* 2008. Powerful bactericidal activity of moxifloxacin in human leprosy. *Antimicrob Agents Chemother*; 52: 3113-3117
- Pascual A, García I, Ballesta S, Perea EJ. 1999. Uptake and intracellular activity of moxifloxacin in human neutrophils and tissue-culture epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 12-15
- Patel A, Wilson R. 2006. Newer fluoroquinolones in the treatment of acute exacerbations of COPD. *Int J COPD*; 1: 243-250
- Peloquin CA, Hadad DJ, Dutra-Molino LP, Palaci M, Boom WH, Dietze R, Johnson JL. 2008. Population pharmacokinetics of levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in adults with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*; 52: 852-857

- Potjo M. 2007. Investigation of the effects of moxifloxacin on human neutrophils and mononuclear leucocytes *in vitro*. Master degree thesis. The Department of Immunology, Faculty of Health Sciences, University of Pretoria. Pretoria, South Africa.
- Raulet DH. 2004. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nature Immunol*; 5: 996-1002
- Ren YR, Pan F, Parvez S, Fleig A, Chong CR, Xu J, *et al.* 2008. Clofazimine inhibits human Kv1.3 Potassium channel by perturbing Calcium oscillation in T lymphocytes. *PLoS ONE*; 3: e4009
- Reuveni D, Halperin D, Fabian I, Tsarfaty G, Askenasy N, Shalit I. 2010. Moxifloxacin increases anti-tumor and anti-angiogenic activity of irinotecan in human xenograft tumors. *Biochem Pharmacol*; 79: 1100-1107
- Ribeiro CMP, Hurd H, Wu Y, Martino MEB, Jones L, Brighton B, *et al.* 2009. Azithromycin treatment alters gene expression in inflammatory, lipid metabolism, and cell cycle pathways in well-differentiated human airway epithelia. *PLoS ONE*; 4: e5806
- Riesbeck K, Forsgren A, Henriksson A, Bredberg A. 1998. Ciprofloxacin induces an immunomodulatory stress response in human T lymphocytes. *Antimicrob Agents Chemother*; 42: 1923-1930
- Rosenzweig SD, Holland SM. 2004. Phagocyte immunodeficiencies and their infections. *J Allergy Clin Immunol*; 113: 620-626
- Saravolatz LD, Leggett J. 2003. Gatifloxacin, Gemifloxacin and Moxifloxacin: the role of 3 newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*; 37: 1210-1215
- Sevilla-Sánchez D, Soy-Munner D, Soler-Porcar N. 2010. Utilidad de los macrólidos como antiinflamatorios en las enfermedades respiratorias. *Arch Bronconeumol*; 46: 244-254
- Shalit I, Halperin D, Haite D, Levitov A, Romano J, Osherov N, Fabian I. 2006. Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on IL-8, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  secretion and NF $\kappa$ B and MAP kinase activation in human monocytes stimulated with *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother*; 57: 230-235
- Shalit I, Horev-Azaria L, Fabian I, Blau H, Kariv N, Shechtman I, *et al.* 2002. Immunomodulatory and protective effects of moxifloxacin against *Candida albicans*-induced bronchopneumonia in mice injected with cyclophosphamide. *Antimicrob Agents Chemother*; 46: 2442-2449
- Shopsin B, Zhao X, Kreiswirth BN, Tillotson GS, Drlica K. 2004. Are the new quinolones appropriate treatment for community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *Int J Antimicrob Agents*; 24: 32-34
- Shortt P, Wilson R, Erskine I. 2006. Tendinitis: the achilles heel of quinolones! *Emerg Med J*; 23: e63
- Sipahi OR, Turhan T, Pullukcu H, Calik S, Tasbakan M, Sipahi H, *et al.* 2008. Moxifloxacin versus ampicillin + gentamicin in the therapy of experimental *Listeria monocytogenes* meningitis. *J Antimicrob Chemother*; 61: 670-673
- Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silverman RH, Schreiber RD. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*; 67: 227-264

- Takahashi HK, Iwagaki H, Xue D, Katsuno G, Sugita S, Mizuno K, *et al.* 2005. Effect of ciprofloxacin-induced prostaglandin E<sub>2</sub> on interleukin-18-treated monocytes. *Antimicrob Agents Chemother*; 49: 3228-3233
- Takeyama K, Mitsuzawa H, Nishitani C, Shimizu T, Sano H, Kunishima Y, *et al.* 2007. The 6-fluoro-8-methoxy quinolone gatifloxacin down-regulates interleukin-8 production in prostate cell line PC-3. *Antimicrob Agents Chemother*; 51: 162-168
- Tamaoki J. 2004. Los efectos de los macrólidos en las células inflamatorias. *Chest*; 125: 41S-51S
- TB alliance. 2008 A. Levofloxacin. *Tuberculosis*; 88: 119-121
- TB alliance. 2008 B. Moxifloxacin. *Tuberculosis*; 88: 127-131
- Thong YH, Ferrante A. 1979. Inhibition of mitogen-induced human lymphocyte proliferative responses by tetracycline analogues. *Clin Exp Immunol*; 35: 443-446
- Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*; 3: 133-146
- Uriarte SM, Molestina RE, Miller RD, Bernabo J, Faritani A, Euguchi K, *et al.* 2004. Effects of fluoroquinolones on the migration of human phagocytes through Chlamydia pneumoniae-infected and tumor necrosis factor alpha-stimulated endothelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*; 48: 2538-2543
- Van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, van der Meer JWM, Joosten LAB, Netea MG. 2009. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB reports*; 42: 776-787
- Vazifeh D, Bryskier A, Labro M-T. 1999. Mechanism underlying levofloxacin uptake by human polymorphonuclear neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 246-252
- Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, *et al.* 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*; 53: 1892-1897
- Waters WR, Sacco RE, Fach SJ, Palmer MV, Olsen SC, Kreeger TJ. 2002. Analysis of mitogen-stimulated lymphocyte subset proliferation and nitric oxide production by peripheral blood mononuclear cells of captive elk (*Cervus elaphus*). *J Wildlife Dis*; 38: 344-351
- Weiss T, Shalit I, Blau H, Werber S, Halperin D, Levitov A, Fabian I. 2004. Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on activated human monocytic cells: inhibition of NF-κB and Mitogen Activated Protein kinase activation and of synthesis of proinflammatory cytokines. *Antimicrob Agents Chemother*; 48: 1974-1982
- Wenzhen Y, Kehu Y, Bin M, Yumin L, Quanlin G, Donghai W, Lijuan Y. 2009. Moxifloxacin-based triple therapy versus clarithromycin-based triple therapy for first line treatment of *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Inter Med*; 48: 2069-2076
- Williams AC, Galley HF, Watt AM, Webster NR. 2005. Differential effects of three antibiotics on T helper cell cytokine expression. *J Antimicrob Chemother*; 56: 502-506
- Williams AC, Galley HF, Webster NR. 2001. The effect of moxifloxacin on release of interleukin-8 from human neutrophils. *Br J Anaesth*; 87: 671-672



- Woo PCY, Tsoi H-W, Wong L-P, Leung HCH, Yuen K-Y. 1999. Antibiotics modulate vaccine-induced humoral immune response. *Clin Diagn Lab Immunol*; 6: 832-837
- Xie Y, Deng SX, Thomas CJ, Liu Y, Zhang Y-Q, Rinderspacher A, *et al.* 2008. Identification of N-(quinolin-8-yl)benzenesulfonamides as agents capable of down-regulating NF $\kappa$ B activity within two separate high-throughput screens of NF $\kappa$ B activation. *Bioorg Med Chem Lett*; 18: 329-335
- Yamauchi K, Shibata Y, Kimura T, Abe S, Inoue S, Osaka D, *et al.* 2009. Azithromycin suppresses interleukin-12p40 expression in lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  stimulated macrophages. *Int J Biol Sci*; 5: 667-678
- Yoshimura T, Kurita C, Usami E, Nakao T, Watanabe S, Kobayashi J, *et al.* 1996. Immunomodulatory action of levofloxacin on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Chemotherapy*; 42: 459-464
- Yuhas Y, Berent E, Ovadiah H, Azoulay I, Ashkenazi S. 2006. Rifampin augments cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*; 50: 396:398
- Zimmermann GS, Neurohr C, Villena-Hermoza H, Hatz R, Behr J. 2009. Anti-inflammatory effects of antibacterials on human bronchial epithelial cells. *Respir Res*; 10: 89

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Luis Antonio Ochoa Ramírez

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con especialidad en Inmunobiología

Tesis: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ANTIBIÓTICOS QUINOLÓNICOS DE NUEVA GENERACIÓN E IMMUNEPOTENT CRP SOBRE EL SISTEMA INMUNE

Campo de estudio: Inmunología/Farmacología básica

Datos personales: Nacido en Culiacán, Sinaloa, México el 27 de Marzo de 1984, hijo de Natividad Ramírez Estrada y Luis Antonio Ochoa Tirado.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Sinaloa, obteniendo el grado de Licenciado en Biología con especialidad en Biología Experimental en 2007.

Experiencia profesional: Becario de CONACYT de Enero de 2006 a Marzo de 2007 en el Centro de Medicina Genómica del Hospital General de Culiacán, Servicios de Salud Sinaloa, a cargo del Dr. Jesús Salvador Velarde Félix en el proyecto “Estudio de los polimorfismos de los genes del receptor de vitamina D, factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 10, interleucina 12 y del interferón gama en pacientes con lepra lepromatosa del Estado de Sinaloa”, del que derivó la tesis de licenciatura de su servidor titulada: “Análisis del polimorfismo A16974C del gen IL-12p40 en pacientes con lepra lepromatosa del Estado de Sinaloa”. Dentro de esta misma institución se realizó también prácticas profesionales en el periodo de Febrero a Julio de 2008.