

ARTICULO

Efectos de ciprofloxacina y norfloxacina sobre la apoptosis de neutrófilos humanos *in vitro*.

Marla Paredes, Mait Velásquez. Germán Fraile.

Laboratorio 5 Sección bioquímica farmacológica
Instituto de Investigaciones Biomédicas BIOMED
UC, Universidad de Carabobo, Maracay,
Venezuela

Correspondencia: Marla Paredes

E-mail: marlaalej@hotmail.com

Recibido: Febrero 2011 **Aceptado:** Julio 2011

RESUMEN

La apoptosis de los neutrófilos (PMNs) es un evento crítico para controlar la fase de resolución de las inflamaciones. En tal sentido, la inducción farmacológica de la apoptosis mediante el empleo de antibióticos podría ser una opción terapéutica para tratar diversas enfermedades. Sin embargo, existe poca información acerca de las capacidades de los antibióticos de amplio espectro tales como las fluoroquinolonas, para acelerar la apoptosis en esas células. Entonces, en este estudio se propuso evaluar los efectos de las fluoroquinolonas ciprofloxacina (CPX) y norfloxacina (NFX) sobre la apoptosis de PMNs humanos *in vitro*. **Métodos:** Los PMNs aislados fueron incubados con ambas drogas para determinar sus efectos sobre la inducción de la apoptosis, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) mediante técnicas de microscopía (óptica o de fluorescencia), luminometría y citometría de flujo, respectivamente. **Resultados:** A las concentraciones de 300 y 600 $\mu\text{mol/L}$, ambas drogas indujeron tanto el colapso del $\Delta\psi_m$ como la muerte por apoptosis de modos estadísticamente significativos. Además, esos efectos probablemente dependieron de la generación de una situación de estrés oxidativo debido a que ambas drogas incrementaron la generación de ERO intracelulares y sus efectos proapoptóticos fueron parcialmente bloqueados por la catalasa y por el lipopolisacárido (LPS). **Conclusión:** Estos hallazgos sugirieron que, debido a sus bajas toxicidades y a sus capacidades para inducir efectos apoptóticos en PMNs, tanto la CPX como la NFX pueden ser útiles para tratar enfermedades inflamatorias no necesariamente relacionadas con infecciones bacterianas.

Palabras Clave: Neutrófilos, apoptosis, ciprofloxacina, norfloxacina

ABSTRACT

Effects of ciprofloxacin and norfloxacin on apoptosis of human neutrophils *in vitro* experiments.

Neutrophil apoptosis (PMNs) is thought to be a critical event for the control of the resolution phase of inflammation. In consequence, the pharmacological induction of apoptosis by antibiotics could be a therapeutic option for the treatment of a number of diseases. However, there is scarce information about the abilities of broad-spectrum antibiotics, such as the fluoroquinolones to accelerate this metabolic event. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the *in vitro* effects of the fluoroquinolones ciprofloxacin (CPX) and norfloxacin (NFX) on the human PMNs apoptosis. **Methods:** Isolated PMNs were incubated in the presence of both drugs to determine their effects on apoptosis induction, reactive oxygen species (ROS) generation and

mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$). These events were assessed by the use of optical or fluorescence microscopy, luminometry and flow cytometry techniques, respectively. Results: Both drugs, at concentrations of 300 and 600 $\mu\text{mol/L}$, induced disruption of $\Delta\psi_m$, as well as apoptotic cell death in a statically significant degree. In addition, these effects were probably dependent on the induction of an oxidative stress response since both drugs increased the generation of intracellular ROS, and their proapoptotic effects could be partially blocked by both catalase and the lipopolysaccharide (LPS). Conclusion: These findings suggest that due to their low toxicity and their ability to induce apoptotic effects, CPX and NFX may be useful drugs for the treatment of inflammatory diseases not necessarily related to bacterial infections.

Keywords: Neutrophils, apoptosis, ciprofloxacin, norfloxacin

INTRODUCCION

La inducción de la apoptosis en las células pro-inflamatorias tales como los PMNs, es un evento que puede ser necesario para acelerar la exitosa resolución de una respuesta inflamatoria (1). Entre los fármacos que pueden ser buenos candidatos para alcanzar ese objetivo, destacan las fluoroquinolonas CPX y NFX debido a que son relativamente bien toleradas y en particular, se ha observado que ambas drogas penetran y se acumulan rápidamente en el interior de los PMNs alcanzando valores entre 4 y 6 para el cociente de concentraciones intra y extracelular (IC/EC) (2). Además, existe la posibilidad de que estos fármacos generen situaciones de estrés oxidativo debido a que se ha reportado que la NFX es capaz de estimular la quimioluminiscencia (QL) dependiente del luminol en macrófagos peritoneales de ratón, mientras que en PMNs humanos incrementó la fluorescencia de diclorofluoresceín diacetato (DCFH-DA), un detector de H_2O_2 intracelular (3). Por otro lado, en diversos tipos celulares se ha observado que el tratamiento *in vitro* con la CPX o la NFX a concentraciones mucho mayores que las necesarias para combatir infecciones, inhibe la proliferación e induce apoptosis en células humanas provenientes de: carcinomas pulmonares (4), carcinoma de vejiga (5), cáncer de próstata (6), carcinoma de colon (7) y células T leucémicas (8).

Además, se ha observado que tanto la CPX como la NFX inducen efectos apoptóticos mediante desestabilización de los lisosomas en las células HeLa (una línea de células de carcinoma cervical) antes de provocar la permeabilización de la membrana mitocondrial y la posterior muerte por apoptosis (9). A pesar de la importancia de todos esos factores (acumulación intracelular, desestabilización lisosomal, alteración mitocondrial y generación de H_2O_2 intracelular) como potenciales inductores de muerte celular, no se han publicado estudios relacionados con los efectos de las fluoroquinolonas sobre la apoptosis de PMNs humanos. Por esas razones, utilizando concentraciones similares a las empleadas en los ensayos contra células tumorales y en ausencia de infección y de agentes pro-inflamatorios, el propósito de este trabajo fue evaluar los efectos de la CPX y la NFX sobre la apoptosis de PMNs humanos en experimentos *in vitro*.

Materiales y métodos. Las drogas ciprofloxacina y norfloxacina fueron donadas por el Dr. Franklin Vargas del Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). El kit MitoScreen (JC-1) para detectar el potencial de membrana mitocondrial fue adquirido en BD Biosciences Pharmingen (San Diego, USA). El resto de los reactivos se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO, USA) sin purificación adicional.

Aislamiento de los PMNs humanos de sangre periférica, Los PMNs fueron aislados a partir de sangre periférica de individuos donantes aparentemente sanos (previo consentimiento informado de los mismos). Las muestras fueron colectadas en tubos con EDTA al 1%, los PMNs fueron aislados e inmediatamente utilizados en cada uno de los ensayos. Se realizó el aislamiento utilizando un método estandarizado de centrifugación diferencial a distintas velocidades, basado en la lisis de los eritrocitos con una solución isotónica de cloruro de amonio (155 mmol/L), seguida por dos centrifugaciones en HBSS (Solución balanceada de Hank's) para separar los neutrófilos siguiendo un método previamente descrito (10).

Determinación de Necrosis y apoptosis de PMNs. La determinación de necrosis se realizó por el método de exclusión del azul tripano, el cual se basa en el hecho de que una célula necrótica es incapaz de excluir de su citoplasma el colorante azul tripano, debido a que ha perdido la integridad de su membrana plasmática, lo que permitiría su identificación a través de la microscopía óptica. Para ello se observaron las células al microscopio óptico con objetivo de 40X contando aquellas que resultaron necróticas (color azul) con respecto a un total de 100 células contadas (11).

Para determinar la apoptosis se evaluaron las células citocentrifugadas (Hermle Z323K, Alemania) y teñidas con Wright-Giemsa siguiendo la técnica previamente descrita (12) mediante análisis al microscopio óptico (con objetivo 40X, Axiolab, Zeiss, Alemania) se contaron 300 células/lámina en las cuales se identificaron los cambios morfológicos característicos de las células apoptóticas tales como la condensación y fragmentación de la cromatina, vacuolización y formación de protuberancias. Alternativamente, la apoptosis se determinó identificando los cambios nucleares ya mencionados empleando una técnica de microscopía de fluorescencia (con un objetivo de 40X; Leica Microsystems, Suiza) basada en el empleo de una mezcla de los colorantes naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BE) lo cual permite diferenciar las células viables de las que no lo son gracias a la captación diferencial de ambos pigmentos y siguiendo, sin modificaciones, un protocolo previamente descrito (13). Adicionalmente se hicieron algunos experimentos incluyendo inhibidores de la apoptosis de los PMNs. Para ello, las células (10^7 cel/mL) fueron incubadas durante 30 min en presencia y ausencia de las drogas a 37 °C y 5% de CO₂, antes de agregar la catalasa (10.000 U/mL) o LPS de *E. coli* serotipo 055:B5 (1 µg/mL) y se incubaron por 24 horas. Posteriormente la determinación de apoptosis se realizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para microscopía de fluorescencia.

Determinación del Potencial de Membrana Mitocondrial. Para detectar la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se siguieron estrictamente las instrucciones suministradas por el fabricante del kit BD™ MitoScreen (BD Biosciences, San Jose, CA). Para ello, los PMNs fueron incubados con 1,5 µM 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) durante 15 min a 37°C y 5% de CO₂. Para las lecturas de fluorescencia se utilizó un citómetro de flujo (FACS Canto II, BD Biosciences, San Jose, CA). El incremento de la fluorescencia verde en el canal FL-1 se correlacionó directamente con el colapso del $\Delta\Psi_m$ como consecuencia del tratamiento con las fluoroquinolonas.

Determinación de la generación de ROS por Quimioluminiscencia. La liberación de ROS se midió por quimioluminiscencia (QL) en un luminómetro Bio-Orbit 1251 (Labsystems) usando tubos de polipropileno con una mezcla de reacción de 700 μL conteniendo 10^7 PMNs. Se emplearon luminol y lucigenina como amplificadores de la QL total (14) y de la QL extracelular (15), respectivamente. A 50 μL de la suspensión celular en HBSS, se adicionaron 10 μL de luminol o lucigenina (1,4 $\mu\text{mol/L}$ en ambos casos) y posteriormente se les agregó la CPX o la NFX como activadores. La QL se registró de modo continuo durante 20 min. Los efectos relativos de las drogas se obtuvieron comparando las áreas bajo las curvas de QL vs. tiempo (mV.s) con los controles no tratados.

Análisis Estadístico. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm error estándar (SEM) de al menos 3 ensayos diferentes. Se empleó un análisis de varianza de una sola vía y una prueba de comparación de los promedios de las muestras tratadas contra el control (Dunnett). Alternativamente, para comparar promedios de dos muestras, se empleó la prueba t de Student. En todos los casos, se consideró significativo cuando $p \leq 0,05$ (GraphPad InStat versión 3.01; GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

RESULTADOS

En este trabajo se evaluaron los efectos *in vitro* de la CPX y la NFX sobre eventos morfológicos y funcionales relacionados con la apoptosis de los neutrófilos. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

Determinación de Necrosis y apoptosis de PMNs. La figura 1A destaca la baja toxicidad exhibida por ambos compuestos en todo el intervalo de concentraciones ensayado (3-600 $\mu\text{mol/L}$), ya que en ningún caso se afectó la capacidad que tienen los PMNs de excluir el colorante azul tripano, indicando que no hubo pérdida de la integridad de la membrana plasmática en estas células. Por otro lado, las figuras 1B y 1C muestran los efectos de las drogas sobre la apoptosis de los PMNs, lo cual fue evidenciado a través de sus cambios morfológicos característicos tales como la condensación y fragmentación de la cromatina observadas tanto por microscopía de fluorescencia como por microscopía óptica. Es evidente que ambas técnicas arrojan resultados similares ya que las figuras indican efectos proapoptóticos significativos solamente a las concentraciones más elevadas de 300 y 600 $\mu\text{mol/L}$.

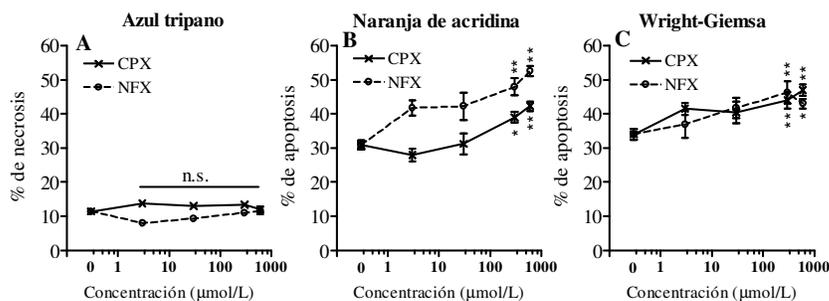


Figura 1. Necrosis (A) y apoptosis (B y C) de PMNs tratados durante 24 h con la CPX y la NFX. Los PMNs (10^7 cel/mL) fueron incubados a 37°C y 5% de CO_2 en ausencia o en presencia de las drogas a las concentraciones indicadas. Se empleó microscopía óptica (A y C) y microscopía de fluorescencia (B) para los análisis. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (Dunnett) (n = 5)

Determinación del Potencial de Membrana Mitocondrial. Las mitocondrias de los PMNs son capaces de mantener su $\Delta\psi_m$ (1), lo que puede ser detectado mediante citometría de flujo a través de la tinción de las células con JC-1, un pigmento fluorescente que tiñe a las mitocondrias de acuerdo con su $\Delta\psi_m$. Las mitocondrias activas (con elevado $\Delta\psi_m$) acumulan al JC-1 bajo la forma de agregados rojos mientras que en las inactivas (con bajo $\Delta\psi_m$), el JC-1 permanece bajo la forma de monómeros que exhiben fluorescencia verde. Por tanto, el incremento relativo en la fluorescencia verde (emisión a 530 nm) es indicativo del colapso del potencial de membrana mitocondrial. La figura 2 muestra los resultados obtenidos después de tratar los PMNs con la (figura 2A) y la CPX (figura 2B). Se observó que tras 4 horas de incubación, las concentraciones más altas de ambas drogas mostraron un incremento significativo en el porcentaje de células con fluorescencia verde aumentada, lo que indica un incremento en el porcentaje de células con alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial.

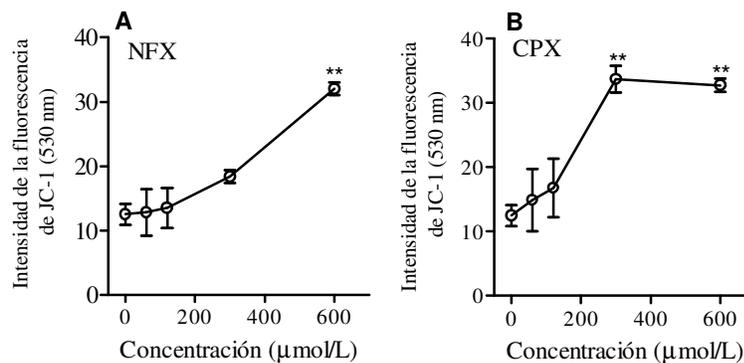


Figura 2. Potencial de membrana mitocondrial en PMNs tratados durante 4 h con la CPX y la NFX. Los PMNs (10^7 cel/mL) fueron incubados a 37°C y 5% de CO₂ en ausencia o en presencia de las drogas durante 4 horas. El análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo empleando el fluoróforo JC-1. **P<0.01 (Dunnett) (n = 5).

Estos resultados coinciden con los encontrados en las determinaciones de apoptosis, ya que el colapso del potencial de membrana mitocondrial sólo resultó significativo a las concentraciones en las cuales se observaron efectos proapoptóticos (figuras 1B y 1C).

Determinación de la generación de ERO por Quimioluminiscencia. Se realizaron ensayos de quimioluminiscencia dependiente de luminol y de lucigenina, de muy corta duración, con el fin de determinar la producción de ERO en neutrófilos tratados con la CPX y la NFX. Los resultados son mostrados en la figura 3. Las curvas representativas de QL versus tiempo obtenidas a través del luminómetro (Figura 3 A y C) muestran que tanto la CPX como la NFX estimularon la QL dependiente del luminol a las concentraciones en las cuales se observó su efecto proapoptótico.

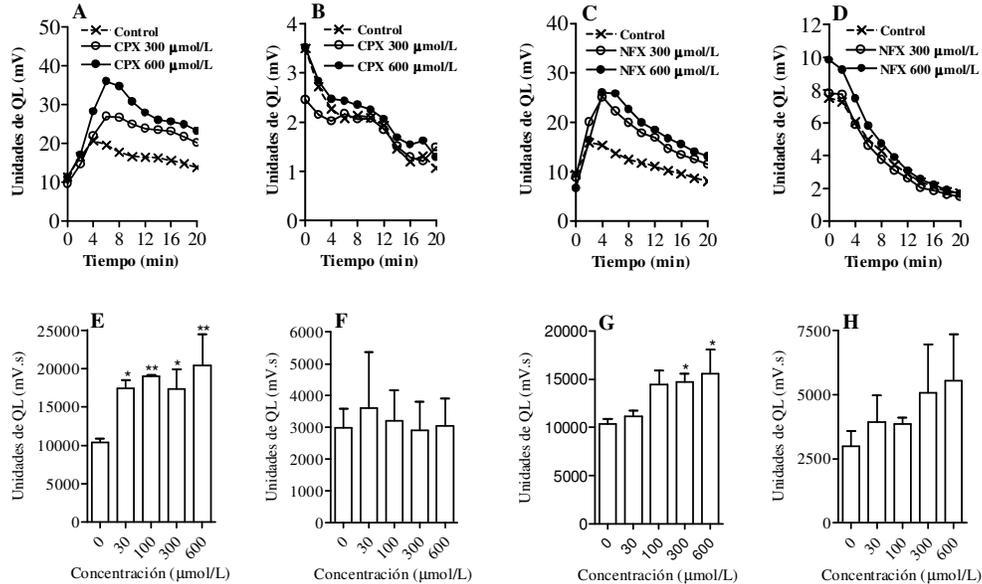


Figura 3. Quimioluminiscencia (QL) de neutrófilos tratados con la CPX y la NFX. Los PMNs (10^7 cel/mL) fueron incubados durante 10 min a 37°C en presencia y ausencia de las drogas. Las gráficas A, B, C y D se refieren a ensayos cinéticos representativos de QL vs tiempo, mientras que las gráficas E, F, G, y H provienen del cálculo de las áreas bajo las curvas de QL vs tiempo para cada concentración ensayada. Se emplearon luminol (A, C, E y G) y lucigenina (B, D, F y H) para detectar la QL intracelular y la QL extracelular, respectivamente. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, (Dunnett) ($n = 5$)

Por el contrario, al determinar la QL dependiente de lucigenina se encontró (Figura 3 B y D) que las curvas de QL versus tiempo en las células tratadas fueron similares a las del control. El análisis estadístico de esas observaciones mostrado en las figuras 3E y 3G, revela que efectivamente, tanto la CPX como la NFX incrementan significativamente de un modo dosis-dependiente, la producción de ERO determinada por la QL dependiente del luminol, mientras que las figuras 3F y 3H muestran la ausencia de tales efectos cuando se empleó lucigenina como agente amplificador de la QL.

Este hallazgo es interesante ya que el luminol puede permear los PMNs y requiere de H_2O_2 para emitir su luminiscencia, mientras que la lucigenina no puede penetrar al interior celular, por lo que su luminiscencia depende de los oxidantes secretados, particularmente del anión superóxido (16). Estos resultados sugieren que el rápido incremento de la producción intracelular de H_2O_2 inducido por el tratamiento de los PMNs con la CPX y la NFX, puede traer como consecuencia la acumulación del H_2O_2 y un incremento concomitante en la apoptosis dependiente del estrés oxidativo. Esta posibilidad fue examinada mediante la evaluación de la apoptosis en experimentos de 24 horas en PMNs tratados con la CPX y la NFX a una concentración de $300 \mu\text{mol/L}$ y co-incubados con catalasa, una enzima que cataliza la ruptura del H_2O_2 . Los resultados obtenidos son mostrados en la figura 4, donde se observa que tanto la apoptosis espontánea como la acelerada por las drogas fueron revertidas significativamente, lo cual sugiere que ambas drogas son capaces de acelerar la apoptosis espontánea de los PMNs de un modo que depende parcialmente de la producción de ERO.

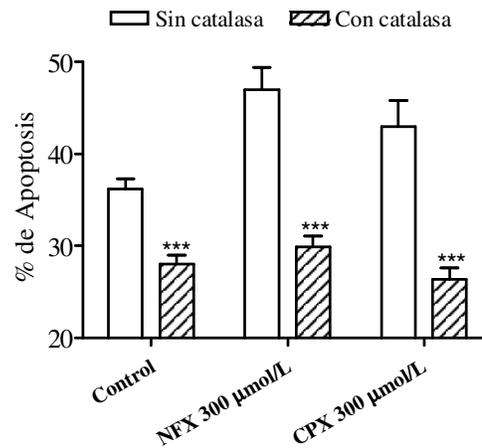


Figura 4. Apoptosis de PMNs tratados con la NFX (300 µmol/L) o con la CPX (300 µmol/L) en la ausencia o presencia de catalasa. Los PMNs (10^7 cel/mL) fueron pre-incubados a 37°C y 5% de CO₂ en ausencia o en presencia de las drogas por 30 min y luego se agregó la catalasa (10.000 U/mL) en los pozos correspondientes. La apoptosis se analizó mediante el método de tinción del ADN con naranja de acridina seguida de examen en el microscopio de fluorescencia a las 24 horas de incubación. ***P<0.01 (t de student) (n = 5).

Con la finalidad de confirmar que una situación de estrés oxidativo inducido por la CPX y la NFX sea la causa de la apoptosis observada en los PMNs, se hicieron experimentos de 24 horas con PMNs tratados con las drogas a la concentración de 300 µmol/L y co-incubados con LPS a una concentración de 1 µg/mL. Esta idea tiene como fundamento algunos hallazgos publicados que demuestran que la incubación de neutrófilos murinos con LPS aumenta de modo significativo las actividades de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa endógenas (17). Los resultados se muestran en la figura 5.

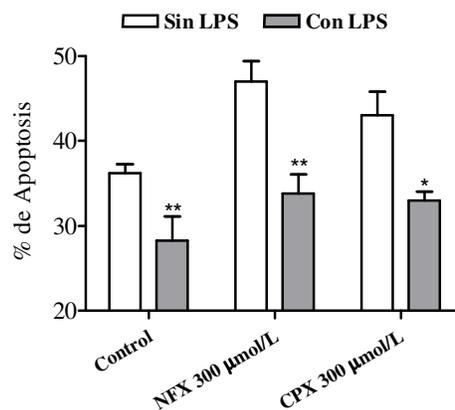


Figura 5. Apoptosis de PMNs tratados con la NFX (300 µmol/L) o con la CPX (300 µmol/L) en la ausencia o presencia de LPS. Los PMNs (10^7 cel/mL) fueron pre-incubados a 37°C y 5% de CO₂ en ausencia o en presencia de las drogas por 30 min y luego se agregó LPS (1 µg/mL) en los pozos correspondientes. La apoptosis se analizó mediante el método de tinción del ADN con naranja de acridina seguida de examen en el microscopio de fluorescencia a las 24 horas de incubación. * P<0.05; **P<0.01 (t de student) (n = 5)

Estos resultados refuerzan la posibilidad de que la apoptosis inducida por las fluoroquinolonas en PMNs sea al menos parcialmente debida a la generación de una situación de estrés oxidativo.

DISCUSIÓN.

Esencialmente, ambas fluoroquinolonas mostraron efectos similares sobre los eventos relacionados con la apoptosis de los neutrófilos, los cuales se discuten en el siguiente orden: **(a)** Aceleración de la apoptosis espontánea, **(b)** Rápida inducción en la generación de ROS y **(c)** Despolarización de la membrana mitocondrial.

a.- Aceleración de la apoptosis espontánea: Los resultados obtenidos revelan que la aceleración de la apoptosis espontánea de los PMNs por estas drogas es, aunque estadísticamente significativa con respecto al control, relativamente modesta ya que los niveles de apoptosis de los controles oscilan entre 30 y 34% mientras que en presencia de estas fluoroquinolonas se alcanzaron niveles de apoptosis de aproximadamente 45%, tras 24 horas de incubación (figuras 1B y 1C). Sin embargo, debe notarse que al menos para la CPX, estos débiles efectos se han reportado en otros tipos celulares. Por ejemplo, en células de una línea linfoblastoide tratadas con la CPX 300 $\mu\text{mol/L}$ por 24 horas, se indujo hasta un 27% de apoptosis por encima del control (18), mientras que el tratamiento con CPX (300-1500 $\mu\text{mol/L}$) de algunas células tumorales de cáncer colorectal durante el mismo tiempo de incubación, solamente indujo bajos efectos apoptóticos (7). En contraste, bajo idénticas condiciones, la proliferación y apoptosis en las células de una línea de cáncer hepático (HepG2) no fueron afectadas por la CPX, sugiriendo que existen mecanismos alternativos independientes de la actividad anti-topoisomerasa de CPX (7). Aunque el modo de acción de la CPX en células de mamíferos no ha sido aclarado, se ha sugerido que esos efectos se deben a la inhibición no selectiva de la síntesis del ADN mitocondrial con daños subsiguientes a las mitocondrias y conduciendo finalmente a la depleción del ATP intracelular (7). En cuanto a la NFX, solamente se han reportado efectos pro-apoptóticos significativos en células irradiadas con luz ultravioleta (9,17).

b.- Rápida inducción en la generación de ROS: Se ha demostrado que la NFX puede activar por sí sola a la enzima NADPH oxidasa incrementando la producción de ERO en macrófagos de ratones (3), lo que sugiere que la aceleración de la apoptosis en PMNs tratados con la CPX y la NFX (figura 1) podría estar vinculada con dicho efecto. Las figuras 3E y 3G confirman que efectivamente, en ausencia de activadores metabólicos tanto la CPX como la NFX pueden incrementar por sí solas la producción de ERO. Cabe destacar que dicha QL ha sido descrita como un fenómeno parcialmente intracelular que depende a su vez parcialmente de la producción de H_2O_2 (16). Suponiendo que las ERO procedan de la activación de la NADPH oxidasa de los PMNs, estos resultados son interesantes dado que no se detectó la actividad de la NADPH oxidasa de la membrana plasmática al emplear la lucigenina como sonda quimioluminiscente. Sin embargo, de acuerdo con los datos disponibles no se puede descartar la posibilidad de que otra fuente alternativa de producción de H_2O_2 diferente a la NADPH oxidasa y detectable por el luminol haya sido activada por estas drogas. La figura 4 apoya la idea de que la aceleración de la apoptosis de los PMNs por las fluoroquinolonas en estudio depende parcialmente de la generación de H_2O_2 debido a que tras la co-incubación de las células con catalasa

(una enzima que cataliza la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2), tanto la apoptosis espontánea como la acelerada por las drogas fue revertida significativamente.

En ese mismo orden de ideas se observó que al igual que con la catalasa, la coincubación de las células con LPS fue capaz de revertir la apoptosis acelerada por las drogas en estudio. Estos resultados también pueden ser interpretados como una respuesta ante una situación de estrés oxidativo ya que, se ha demostrado que la incubación de neutrófilos murinos con LPS aumenta de modo significativo la actividad de las enzimas SOD y catalasa (17). Por otro lado, se ha reportado que tras emplear un análisis de microarreglos de expresión genética en PMNs humanos tratados con LPS, se indujo la expresión del gen de la SOD-2, que es la versión mitocondrial de la SOD (20), por lo que al parecer los efectos antiapoptóticos del LPS podrían estar relacionados con mecanismos de protección de la integridad mitocondrial.

c.- Despolarización de la membrana mitocondrial: El colapso del potencial de membrana mitocondrial y su consiguiente despolarización, se ha descrito como un evento bioquímico indicativo de apoptosis. Aunque hasta ahora no se han publicado trabajos que describan la despolarización de las mitocondrias en PMNs tratados con estas drogas, en otros tipos celulares se ha descrito tal efecto cuando se incuban con la CPX por varios días (21). Además, en células HeLa (una línea de células de carcinoma cervical), la incubación durante 8 horas con la CPX ($\sim 1000 \mu\text{mol/L}$) provocó el colapso del potencial de membrana mitocondrial, posterior a la permeabilización de la membrana lisosomal y la subsiguiente translocación de las catepsinas B y D hacia las mitocondrias (9) por lo que se ha sugerido que los lisosomas podrían ejercer un papel importante dentro del proceso apoptótico. Resulta notable que en los experimentos reportados acerca de microarreglos en PMNs tratados con LPS, la catepsina D fue una de las proteínas cuya expresión fue inhibida (20). Este hallazgo es muy revelador ya que se ha descrito en neutrófilos humanos, una nueva ruta proapoptótica en la cual la catepsina D es liberada desde los gránulos azurofílicos de un modo dependiente de las especies reactivas de oxígeno para activar directamente a la caspasa-8 (22). Tales hallazgos sugieren entonces que probablemente las catepsinas sean el punto de unión entre la producción de ERO y la despolarización de la membrana mitocondrial.

En conclusión, los resultados del presente trabajo indican que las fluoroquinolonas CPX y NFX, a concentraciones que no afectan la integridad de la membrana plasmática, son capaces de acelerar la apoptosis espontánea de los PMNs a través de mecanismos que probablemente involucran la generación de ERO intracelulares y la despolarización de la membrana mitocondrial. Estas propiedades sugieren que estas drogas podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades no relacionadas con infecciones bacterianas.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Maianski NA, Maianski AN, Kuijpers TW, Roos D. Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol* 2004; 111:56-66.
2. Walters J, Nakkula R. Ciprofloxacin transport by chemoattractant-activated polymorphonuclear leukocytes: regulation by priming and protein kinase C. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3345-3348.
3. El Bekay R, Álvarez M, Carballo M, Martín-Nieto J, Montesirín J, Pintado E, Bedoya F, Sobrino F. Activation of phagocytic cell NADPH oxidase by norfloxacin: a potential mechanism to explain its bactericidal action. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 255-261.

4. Mondal E, Das S, Mukherjee P. Comparative evaluation of antiproliferative activity and induction of apoptosis by some fluoroquinolones with a human non-small cell lung cancer cell line in culture. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004; 5: 196-204.
5. Aranha O, Zhu L, Alhasan S, Wood D, Kuo T, Sarkar F. Role of mitochondria in ciprofloxacin induced apoptosis in bladder cancer cells. *J Urol* 2002; 167: 1288-1294.
6. Aranha O, Grignon R, Fernandes N, McDonnell TJ, Word DP, Sarkar FH. Suppression of human prostate cancer cell growth by ciprofloxacin is associated with cell cycle arrest and apoptosis. *Int J Oncol* 2003; 22: 787-794.
7. Herold C, Ocker M, Ganslmayer M, Gerauer H, Hahn E, Schuppan D. Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer* 2002; 86: 443-448.
8. Koziel R, Szczepanowska J, Magalska A, Piwocka K, Duszynski J, Zablocki K. Ciprofloxacin inhibits proliferation and promotes generation of aneuploidy in Jurkat cells. *J Physiol Pharmacol* 2010; 61:233-9.
9. Boya P, Andreau K, Poncet D, Zamzami N, Perfettini J, Metivier D, Ojcius D, Jäättelä M, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med* 2003; 197: 1323-1334.
10. Eggleton P, Gargan R, Fisher D. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. *J Immunol Methods* 1989; 121: 105-113.
11. Patterson MK. Measurement of growth and viability of cells in culture. *Methods Enzymol* 1979; 58: 141-152.
12. Fialkow L, Fochesatto Filho L, Bozzetti MC, Milani AR, Rodrigues Filho EM, Ladniuk RM, Pierozan P, de Moura RM, Prolla JC, Vachon E, Downey GP. Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 2006; 10: R155.
13. Sweeney JF, Nguyen PK, Omann GM, Hinshaw DB. Ultraviolet irradiation accelerates apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes: protection by LPS and GM-CSF. *J Leukoc Biol* 1997; 62:517-23.
14. Dahlgren C, Aniansson H, Magnusson KE. Pattern of formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-induced luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence in human neutrophils. *Infect Immun* 1985; 47: 326-328.
15. Briheim G, Stendahl O, Dahlgren C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1984; 45:1-5
16. Albrecht D, Jungi TW. Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes. *J Leukoc Biol* 1993; 54:300-6
17. Sethi S, Sharma P, Dikshit M. Nitric oxide- and oxygen-derived free radical generation from control and lipopolysaccharide-treated rat polymorphonuclear leukocyte. *Nitric Oxide* 2001; 5: 482-493.
18. Smart DJ, Halicka HD, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Williams GM. Ciprofloxacin-induced G2 arrest and apoptosis in TK6 lymphoblastoid cells is not dependent on DNA double-strand break formation. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 113-119.
19. Zhao B, Chignell CF, Rammal M, Smith F, Hamilton MG, Andley UP, Roberts JE. Detection and prevention of ocular phototoxicity of ciprofloxacin and other fluoroquinolone antibiotics. *Photochem Photobiol* 2010; 86:798-805.
20. Malcolm K, Arndt P, Manos E, Jones D, Worthen S. Microarray analysis of lipopolysaccharide-treated human neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: 663-670.
21. Koziel R, Zablocki K, Duszyński J. Calcium signals are affected by ciprofloxacin as a consequence of reduction of mitochondrial DNA content in Jurkat cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1664-1671.
22. Conus S, Perozzo R, Reinheckel T, Peters C, Scapozza L, Yousefi S, Simon H. Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during resolution of inflammation. *J Exp Med* 2008; 205: 685-698.