



Departamento de Microbiología
UNIVERSIDAD DE GRANADA

TESIS DOCTORAL

MODIFICACION DE LA RESPUESTA BIOLOGICA POR TELITROMICINA

María Magdalena Leiva Arjona

TESIS DOCTORAL

MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA POR
TELITROMICINA

PRESENTADA POR

Maria Magdalena Leiva Arjona

Vº Bº de los Directores:

Alfonso Ruiz-Bravo Lopez

María Jiménez Valera

Granada, Enero de 2008.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis se han incluido en las siguientes publicaciones:

Leiva, M., Ruiz-Bravo, A., Moreno, E., Jiménez-Valera, M. 2007. The anti-inflammatory activity of telithromycin in a mouse model of septic shock. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29:364-365.

Leiva, M., Ruiz-Bravo, A., Jiménez-Valera, M. 2007. Inhibition by telithromycin of systemic and respiratory inflammation induced by endotoxin in mice. *Critical Care* 11(Supl 4):S13.

A mis padres.

A mi hermano.

No deberías quemar tu alma en esta vida. Sus miserias, sus placeres... son barro seco. Deberías ser obrero de la grieta.

E.H.E.

Hace más de cinco años que comencé a vivir algunas de las dichas y sinsabores de la investigación. Durante todo este tiempo he tenido la oportunidad de aprender de la ciencia y de la vida, aunque como sabias palabras dicen, aún me quedan muchas cosas por aprender. El periodo de mi doctorado me ha permitido realizar proyectos y algún que otro sueño, por todo ello, y por algunas otras cosas, quiero agradecer a todas las personas que han estado, en mayor o menor grado, formando parte de todo esto.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis Directores de tesis, la Dra. María Jiménez Valera y el Dr. Alfonso Ruiz-Bravo. Porque sin ellos este trabajo no se hubiera llevado a cabo, por su ayuda y su cariño, y sobre todo por su paciencia.

Al Dr. Sergio Román-Román, por haber posibilitado mi estancia en París, por sus consejos, por su inestimable ayuda, y por hacer que todo lo difícil no lo parezca tanto.

A la Dra. Encarnación Moreno Calvo, por enseñarme a enseñar, y por su interés en el trabajo y sobre todo en las personas que lo realizan.

Al Dr. Alberto Ramos Cormenzana, uno de los responsables de mi interés en la Microbiología y en la Investigación en general, por su ayuda en todo momento.

Al Dr. José Martínez López, por hacerme un hueco en el despacho en estos últimos meses, por la confianza y el aprecio mutuo.

A los Dr. Guillermo Martínez de Tejada, Ignacio Moriyón y Jesús García Foncillas, responsables de mi estancia en la Universidad de Navarra y en el CIMA.

Al Dr. José Leiva, el otro responsable de mis inclinaciones científicas, y además tío. Gracias por tu apoyo, tu cariño y por aquellos cuatro meses.

A Gloria, a la que se le echa muchísimo de menos.

Dar las gracias también a mis antiguos compañeros de laboratorio, que durante más o menos tiempo soportaron mis alegrías, mis agobios, y mi genio malagueño: Quico y M^a Ángeles, con los que comencé a trabajar, y Carmen, con la que compartí hasta no hace mucho el “puesto de trabajo” y algunos ratones. Porque el roce hace el cariño. No me olvido de los nuevos, María, Marta y Alex.

Al resto de mis compañeros del Departamento de Microbiología, que lo son aún o que lo fueron algún día: Ía, amiga; Juanan, compañero dentro y fuera; Yoli, ¿por qué te fuiste?; Rafa Páez, quien más me hizo reír; Inma, Fernando y Belén, ya, por fin, respetables profesores; Ana González, Ana Jiménez, María Luján y Jose, que me escucharon y me sacaron; Tere Quesada y Marga, que dejaron huella; Marina y Carmen, y las nuevas adquisiciones: Lamiae, Rocío, Alí y Nahid.

No quisiera olvidarme del Departamento de Farmacología, en especial mis chicos del luminómetro, Chari, Miguel y Rocío López, por su amabilidad, su ánimo, y por haberme hecho sentir una más; Isabel y Desí, por su cariño y amistad; de Mónica y Elvira, gracias por vuestra ayuda.

A Laura y Natalia, por su ayuda y por los momentos de desesperación compartidos.

A José Antonio, por sus consejos y por escucharme, además de por su amistad.

A Paco, coautor de la portada, a Rafita y Asier, todos amigos y hombres de ciencia. A Daniele, porque sin su ayuda no hubiese depositado la tesis aquel día... y tampoco quiero olvidarme de Mavys, Javi y Ana M^a.

Tras los agradecimientos del mundo científico, quisiera dar las gracias a mi familia: a mis padres por su paciencia, constante ánimo, y su fe ciega en mí; a mi hermano, la persona más noble que conozco, que excepto este último periodo de la tesis doctoral, ha sufrido el resto conmigo (ite echo de menos!); a mis abuelas, dos grandes mujeres de fuerza admirable.

No me quiero olvidar de muchos amigos, que a lo largo de todo este tiempo han estado ahí: Fernan, futuro doctor y compañero de mi aventura parisina, y Rafa, gracias por las cervecitas; Mamen, maravillosa actriz, Ángeles, Rosi y Yadira, gracias por los años compartidos y por los que nos quedan.

Susana, Raquel, Vicki, Ana y toda la gente del laboratorio de la Universidad de Pamplona, que además de ayudarme en el laboratorio, me adoptaron en su “cuadrilla”.

Inma, Rafa, Elvi, Manu, Silvia, Andrés, Rosa, Pedro.... con los que viví Paris.

Por último dar las gracias a todas las personas a las que he podido olvidar, lo siento, y a mis amigos de Fuengirola, en especial a Tania y Moi, por creer en mí. Y sobre todo a Raúl, poeta y cohabitante de la *grieta*, que lo sabe todo....

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA POR AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	3
1.1.1. El sistema inmune: inmunidad innata e inmunidad específica.....	3
1.1.2. Agentes modificadores de la respuesta biológica (BRMs).....	7
1.1.3. Agentes antimicrobianos con actividad BRM.....	8
1.2. CÉLULAS Y RECEPTORES EN LA MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA	12
1.2.1. Macrófagos.....	12
1.2.2. TLRs.....	12
1.2.3. Transducción de señales de activación desde los TLRs en la superficie celular hasta el núcleo: vías intracelulares de señalización.....	15
1.2.4. El factor de transcripción NF- κ B.....	18
1.2.5. Regulación de la actividad NF- κ B.....	21
1.2.6. El factor de transcripción AP-1.....	24
1.3. MACRÓLIDOS Y KETÓLIDOS.....	27
1.3.1. Macrólidos.....	28
1.3.2. Los macrólidos como BRMs.....	30
1.3.3. La actividad BRM en las aplicaciones terapéuticas de los macrólidos.....	34
1.3.4. Ketólidos.....	39
2. OBJETIVOS.....	43

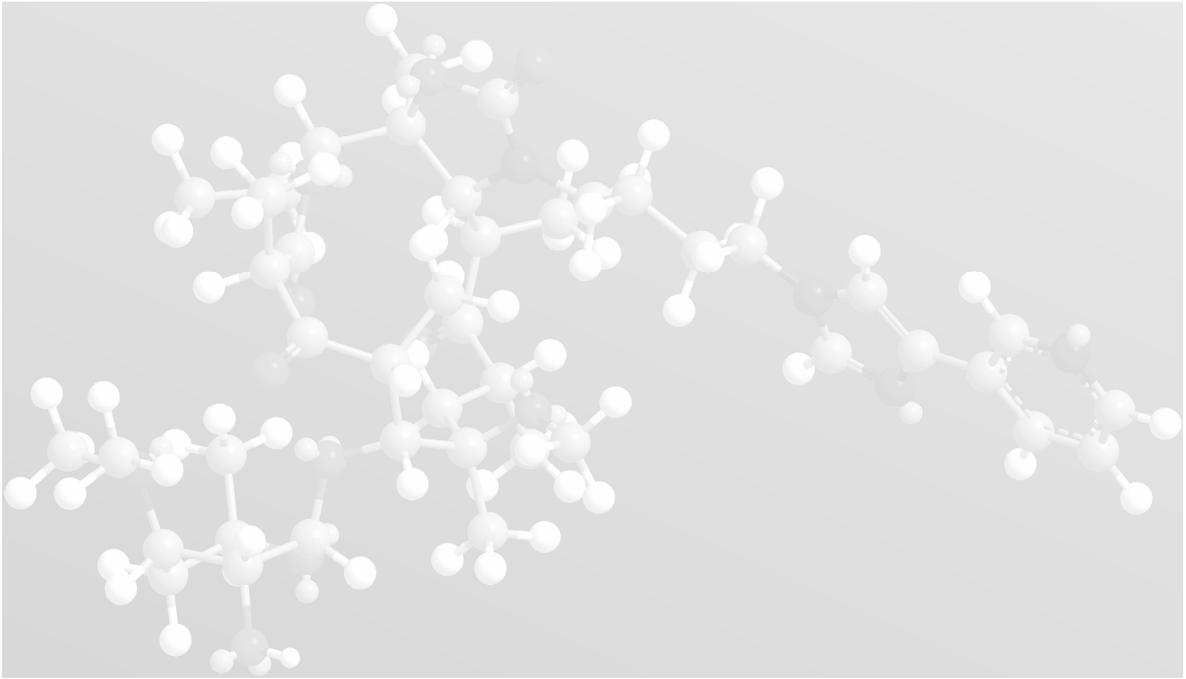
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
3.1. PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO CELULAR.....	49
3.1.1. Condiciones de cultivo de células de mamífero.....	49
3.1.2. Líneas celulares.....	49
3.1.3. Subcultivo y expansión de líneas celulares.....	51
3.1.4. Tripsinización.....	52
3.1.5. Recuento de células viables.....	52
3.1.6. Congelación y descongelación de células.....	53
3.1.7. Obtención de suspensiones de esplenocitos.....	54
3.2. MEDIOS DE CULTIVO CELULARES.....	54
3.3. PREPARACION DEL ANTIBIÓTICO.....	57
3.4. ENSAYOS DE VIABILIDAD EN PRESENCIA DE TELITROMICINA.....	57
3.4.1. Estudio de viabilidad celular por exclusión con azul tripán.....	57
3.4.2. Estudio de viabilidad celular por medida de la actividad mitocondrial.....	58
3.5. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE ESPLENOCITOS MURINOS EN RESPUESTA A MITÓGENOS.....	59
3.5.1. Ajuste de la suspensión.....	59
3.5.2. Cultivo de esplenocitos.....	59
3.5.3. Medida de la proliferación celular.....	60
3.6. PRODUCCIÓN DE CITOKINAS IN VITRO.....	63
3.6.1. Producción de citokinas por células RAW 264.7.....	63
3.6.2. Producción de citokinas por células MLE-12.....	64
3.6.3. Producción de citokinas por esplenocitos murinos.....	66
3.6.4. Determinación de citokinas en sobrenadantes de cultivo.....	67
3.7. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN SOBRENADANTES DE RAW 264.7.....	67

3.8. TRANSFECCIÓN.....	68
3.8.1. Plásmidos.....	69
3.8.2. Transformación, amplificación, extracción, y purificación del DNA plasmídico.....	70
3.8.3. Ensayos de transfección: lipofección.....	72
3.8.4. Transfección en placas de 24 pocillos.....	74
3.8.5. Transfección en placas de 96 pocillos.....	76
3.8.6. Medida de la actividad luciferasa.....	77
3.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B Y JNK1/2 EN EXTRACTOS CELULARES TOTALES POR WESTERN BLOT.....	78
3.9.1. Obtención de muestras.....	78
3.9.2. Western blot.....	79
3.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B EN EXTRACTOS NUCLEARES POR ELISA.....	81
3.10.1. Obtención de muestras.....	81
3.10.2. ELISA para NF- κ B p65.....	82
3.11. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS.....	82
3.11.1. Determinación de apoptosis en células RAW 264.7. inducida con LPS o camptotecina.....	83
3.11.2. Determinación de apoptosis en células MLE-12 inducida con sobrenadantes de RAW 264.7 estimuladas o camptotecina.....	84
3.11.3. Determinación de apoptosis inducida por camptotecina en esplenocitos murinos activados.....	84
3.12. INDUCCIÓN DE SHOCK SÉPTICO.....	85
3.12.1. Animales.....	85
3.12.2. Dosis empleadas.....	85
3.12.3. Diseño experimental.....	86
3.12.4. Obtención de muestras.....	87
3.12.5. Ensayo de supervivencia.....	88
3.12.6. Determinación de la producción de óxido nítrico en plasma.....	88
3.12.7. Determinación de citocinas.....	88

3.13. INDUCCIÓN DE INFLAMACIÓN RESPIRATORIA AGUDA.....	89
3.13.1. Dosis empleadas.....	89
3.13.2. Diseño experimental.....	89
3.13.3. Lavado broncoalveolar (BAL).....	90
3.13.4. Determinación de citokinas.....	91
3.13.5. Determinación de la producción de óxido nítrico en BAL.....	92
3.13.6. Determinación del contenido de proteínas. Método del ácido bicinconínico.....	92
3.13.7. Preparación de frotis celulares.....	92
3.13.8. Citometría de flujo.....	93
3.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	94
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN I. MODIFICACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA RESPUESTA DE ESPLENOCITOS Y DE LÍNEAS DE CÉLULAS INMUNITARIAS.....	95
4.1. Efecto de TEL en la proliferación de esplenocitos murinos en respuesta a mitógenos.....	97
4.2. Efecto de TEL en la apoptosis de esplenocitos inducida por CAM.....	98
4.3. Efecto de TEL en la producción de citokinas por esplenocitos murinos en respuesta a mitógenos.....	99
4.4. Estudio de viabilidad de células JURKAT cultivadas con TEL.....	100
4.5. Efecto de TEL en la activación de NF- κ B en células JURKAT.....	101
4.6. Estudio de viabilidad de células RAW 264.7 cultivadas con TEL.....	102
4.7. Efecto de TEL en la producción de TNF- α en RAW 264.7 estimuladas con LPS.....	102
4.8. Efecto de TEL en la producción de IL-10 por células RAW 264.7 estimulada con LPS.....	104

4.9. Efecto de TEL en la producción de NO por células RAW 264.7 estimuladas con LPS.....	105
4.10. Inhibición de la activación de NF- κ B por TEL en células RAW 264. estimuladas con LPS.....	106
4.11. Inhibición de la activación de NF- κ B por TEL en células RAW 264.7 estimuladas con PMA.....	110
4.12. Inhibición de la activación de AP-1 por TEL en células RAW 264.7 estimuladas con LPS y PMA.....	111
4.13. Inhibición de la activación de JNK1/2 por TEL en células RAW 264.7 estimuladas con LPS.....	114
4.14. Discusión.....	115
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN II. EFECTO ANTI-INFLAMATORIO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE SHOCK SÉPTICO	119
5.1. Efectos de TEL en la supervivencia a shock endotóxico inducido por LPS.....	121
5.2. Efectos de TEL en la producción <i>in vivo</i> de citocinas en el modelo de shock endotóxico.....	123
5.3. Efectos de TEL en la producción <i>in vivo</i> de NO en el modelo de shock endotóxico.....	125
5.4. Discusión.....	126
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 3. EFECTO ANTI-INFLAMATORIO EN UN MODELO <i>IN VITRO</i> DE INFLAMACIÓN RESPIRATORIA.....	129
6.1. Estudios de viabilidad de células MLE-12 cultivadas con TEL.....	131

6.2. Efecto de TEL en la producción de citocinas de células RAW 264.7 estimuladas con LPS y de células MLE-12 estimuladas con sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7.....	132
6.3. Efecto de TEL en la activación de NF-κB en macrófagos RAW 264.7 y células epiteliales MLE-12.....	135
6.4. Efecto de TEL en la apoptosis de macrófagos RAW 264.7 y células epiteliales MLE-12.....	139
6.5. Discusión.....	141
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 4. EFECTO ANTI-INFLAMATORIO EN UN MODELO <i>IN VIVO</i> DE INFLAMACIÓN RESPIRATORIA.....	143
7.1. Efecto de TEL en la composición celular del BAL en el modelo <i>in vivo</i> de inflamación pulmonar aguda inducida por LPS.....	145
7.2. Efectos de TEL en los niveles de proteínas, nitritos y citocinas en BAL de ratones nebulizados con LPS.....	148
7.3. Efectos de TEL en los niveles plasmáticos de citocinas de ratones con inflamación pulmonar aguda inducida por LPS.....	151
7.4. Discusión.....	152
8. CONSIDERACIONES FINALES.....	155
9. CONCLUSIONES.....	159
10. BIBLIOGRAFÍA.....	163
11. ANEXOS.....	197



1. INTRODUCCION

1.1. MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA POR AGENTES ANTIMICROBIANOS

1.1.1. El sistema inmune: inmunidad innata e inmunidad específica

El sistema inmune integra una diversidad de células y moléculas capaces de detectar la presencia en los tejidos de estructuras extrañas, que son consideradas como potencialmente peligrosas y frente a las que se ponen en marcha mecanismos tendentes a su destrucción y eliminación. Aunque finalmente el sistema inmune suele funcionar como un todo, es útil distinguir entre mecanismos de inmunidad innata o no específica y mecanismos de inmunidad específica. Los mecanismos de inmunidad innata involucran células como macrófagos, granulocitos (leucocitos polimorfonucleares o PMN) y células “natural killer” (NK), aunque otros linajes celulares (plaquetas, células epiteliales) pueden jugar también importantes papeles; y mecanismos moleculares como el sistema del complemento o los interferones de tipo I. Excepto los interferones, que se producen como respuesta a un estímulo (la infección viral), los demás mecanismos de la inmunidad innata, tanto celulares como moleculares, son constitutivos y, por tanto, están prestos para actuar de inmediato. Las células de la inmunidad innata reconocen estructuras microbianas ubicuas, conocidas como “Pathogen Associated Molecular Patterns” (PAMPs). El hecho de que los PAMPs estén distribuidos en amplios grupos microbianos es lo que hace que a los mecanismos de la inmunidad innata se les considere inespecíficos. Los PAMPs son reconocidos por unos receptores denominados “Pathogen Patterns Receptors” (PPR), entre los que ocupan un lugar preponderante los “Toll-like receptors”, a los que se designa

con las siglas TLR seguidas de un número. Cuando estos receptores reconocen a sus ligandos, se generan señales de activación celular, que determinan la activación de factores de transcripción y, finalmente, la producción de moléculas de comunicación intercelular (citokinas) y de moléculas efectoras, como los mediadores de inflamación. La reacción inflamatoria, con su focalización de células y mediadores tóxicos (radicales oxidantes, proteasas, fracciones de componentes del complemento, etc.), la depuración de partículas extrañas (incluyendo microorganismos) por fagocitosis y formas de citotoxicidad, como la citolisis por acción del complejo de ataque a membrana (resultante de la activación del complemento) y la citotoxicidad mediada por células NK, son algunos de los mecanismos efectores característicos de la inmunidad innata.

La inmunidad específica está protagonizada por las dos grandes poblaciones de linfocitos, B y T, y el hecho clave es el reconocimiento de antígenos, que se realiza a través de receptores específicos, el “B cell receptor” o BCR, cuyo componente específico es una inmunoglobulina de membrana, y el “T cell receptor” o TCR, en el que el reconocimiento específico lo lleva a cabo un heterodímero α/β o γ/δ . Los receptores de los linfocitos poseen zonas de secuencias hipervariables, que encajan específicamente en partes concretas del antígeno, denominadas epítopes o determinantes antigénicos. Cada juego de zonas hipervariables reconoce una especificidad distinta, y el espectro total de especificidades que puede reconocer el sistema inmune de un mamífero supera el millón. Las zonas hipervariables se configuran como resultado de una reorganización de genes, que se combinan aleatoriamente en las células que están en proceso de diferenciación para convertirse en linfocitos maduros. Tanto los linfocitos B como los T están organizados en clones y cada clon está compuesto por linfocitos cuyos receptores reconocen una determinada especificidad.

Mientras las células B son capaces de reconocer epítopes en los antígenos nativos, las T solo reconocen oligopéptidos presentados en el contexto de moléculas de histocompatibilidad, por células presentadoras. Los oligopéptidos proceden de la hidrólisis parcial de proteínas capturadas por endocitosis

(antígenos exógenos) o sintetizadas dentro de la célula presentadora (antígenos endógenos). Los oligopéptidos de antígenos exógenos se presentan asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II, que se expresan solo en determinados linajes celulares: células dendríticas, macrófagos, linfocitos B; y son reconocidos por células T “helper” (T_H). Los oligopéptidos de antígenos endógenos se presentan asociados a moléculas de histocompatibilidad de clase I, expresados por la práctica totalidad de las células del cuerpo; y son reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CTL). Hay dos subpoblaciones de células T_H : las T_{H1} , que producen interleukina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ) y participan en respuestas de tipo inflamatorio; y las T_{H2} , que producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, y que cooperan con los linfocitos B para que estos puedan realizar respuestas óptimas de anticuerpos. Por tanto, los principales mecanismos efectores de la inmunidad específica son la producción de anticuerpos, que constituye la inmunidad humoral, la activación de macrófagos por citocinas como IFN- γ y la citotoxicidad específica a cargo de los linfocitos T citotóxicos (CTL), formando estos dos últimos parte de la inmunidad celular.

En todos los casos, la inmunidad específica comprende respuestas inducidas por la presencia de antígenos, y por ello, aunque es más eficiente que la inmunidad innata, necesita de un lapso de tiempo para actuar. En un primer contacto con un microorganismo patógeno, la inmunidad innata opone las primeras líneas de defensa, que tratarán de contener la infección mientras dan tiempo a la inmunidad específica para entrar en escena. Sin embargo, durante la respuesta inmune se generan células memoria; por esta razón, contactos ulteriores con el mismo antígeno inducen respuestas más rápidas y potentes que la respuesta primaria.

En la **Tabla 1.1** se presentan algunas de las características diferenciales de ambos tipos de inmunidad. Es importante resaltar que los mecanismos moleculares que rigen la generación de la diversidad de especificidades reconocidas por los receptores de los linfocitos no tienen en cuenta si las estructuras reconocidas son ajenas o propias; por tanto, se requieren mecanismos adicionales que aseguren la ausencia de respuestas

autoagresivas. Cuando, por diversas razones, estos mecanismos de autotolerancia pierden su eficacia, sobrevienen las patologías autoinmunes.

Tabla 1.1. Diferencias entre inmunidad innata y específica*

Característica	Inmunidad innata	Inmunidad específica
Codificación de los receptores	Fijada en el genoma (línea germinal)	Generada por reorganización de segmentos génicos
Distribución de los receptores	No clonal (receptores idénticos en una misma población de células)	Clonal (especificidades distintas en una misma población de células)
Estructuras reconocidas	PAMPs (comunes a amplios grupos microbianos)	(detalles de macromoléculas)
Discriminación propio / extraño	Perfecta (estructuras propias no reconocidas)	Imperfecta (requiere mecanismos de autotolerancia)
Tiempo de respuesta	Activación inmediata	Activación retrasada (respuesta inducida)
Memoria	No	Si

* Información tomada de Janeway y Medzhitov (2002), con modificaciones.

Como se ha indicado anteriormente, el sistema inmune funciona de forma integrada, y existen numerosas conexiones entre inmunidad innata y específica (**Tabla 1.2**). Células de la inmunidad innata (células dendríticas, macrófagos) se sitúan al inicio de la respuesta inmune específica, por su capacidad para procesar antígenos y presentar sus epítomos a los linfocitos T; pero también, células y moléculas de la inmunidad innata (macrófagos, células NK, sistema del complemento) actúan como efectores en las respuestas de la inmunidad específica.

Tabla 1.2. Conexiones entre inmunidad innata y específica.

Inmunidad innata	Inmunidad específica
Sistema del complemento	Activación por inmunocomplejos (vía clásica)
Procesamiento y presentación de antígenos exógenos (células dendríticas, macrófagos)	Reconocimiento de oligopéptidos asociados a MHC por células T _H
Coestimulación (células dendríticas, macrófagos)	Activación de células T _H
Macrófagos, fagocitosis	Opsonización específica (IgG)
Macrófagos, mecanismos microbicidas	Activación por IFN- γ
Macrófagos y células NK, citotoxicidad	ADCC, dependencia de IgG
Macrófagos, producción de IL-12	Diferenciación de T _H 0 en T _H 1
Mastocitos, producción de IL-4	Diferenciación de T _H 0 en T _H 2

ADCC, citotoxicidad mediada por células, dependiente de anticuerpos.

1.1.2. Agentes modificadores de la respuesta biológica (BRMs)

En pleno auge de la seroterapia, a principios del s. XX, se utilizaban sustancias que, administradas junto a antígenos, incrementaban la cantidad de anticuerpos específicos. Estas sustancias se denominaron coadyuvantes de la respuesta inmune. En los años sesenta y setenta, algunos de estos agentes se utilizaron en la inmunoterapia del cáncer, con el objeto de potenciar la inmunidad antitumoral. Más recientemente, se estableció el hecho de que la mayor parte de los agentes capaces de influir en la respuesta inmune operan a través de modificaciones en la producción de citocinas, las cuales se caracterizan por sus efectos pleiotrópicos y actúan sobre distintas células, incluso fuera del ámbito estricto de la inmunidad; en consecuencia, se acuñó el término de agentes modificadores de la respuesta biológica o BRMs (siglas de “Biological Response Modifiers”). Los BRMs se definen como agentes capaces de modificar los mecanismos defensivos de un organismo normal, mediante la

potenciación o depresión de señales moleculares intercelulares (citokinas) o intracelulares (activación celular, vías de señalización y capacidad de respuesta) que afectan a células del sistema inmune (Roth, 1988). (Figura 1.1).

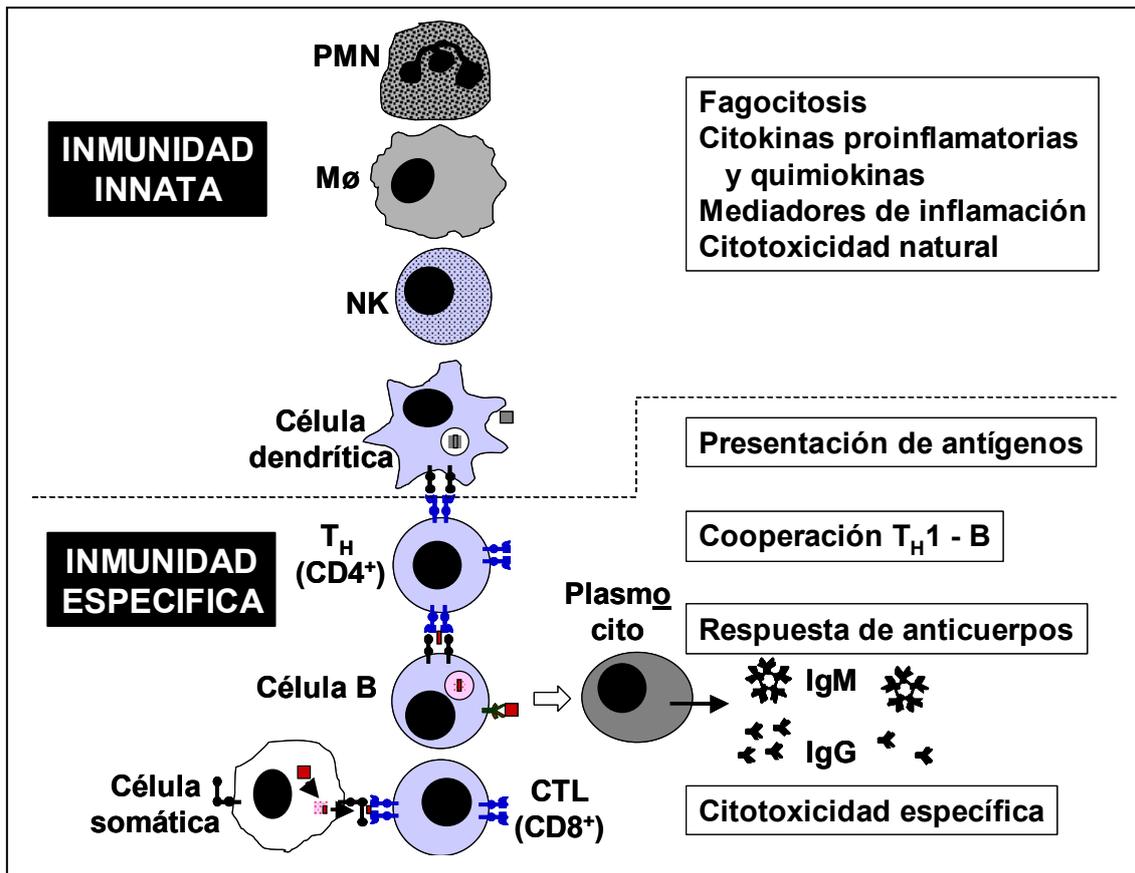


Figura 1.1. Los BRMs pueden modificar mecanismos de la inmunidad innata y de la específica.

1.1.3. Agentes antimicrobianos con actividad BRM

Cuando un microorganismo patógeno inicia por primera vez un proceso infeccioso (por tanto, en ausencia de memoria inmunológica), son los mecanismos constitutivos de la inmunidad innata los que asumen la defensa del organismo, iniciando el proceso inflamatorio y estableciendo al mismo

tiempo las conexiones necesarias para el desarrollo de la respuesta inmune específica. En algunos casos, las defensas innatas serán capaces de controlar el proceso infeccioso. En otros muchos, solo la inmunidad específica llegará a ser “esterilizante”, en el sentido de eliminar por completo de los tejidos los microorganismos agresores; entonces, el papel de la inmunidad innata es retrasar en lo posible la proliferación microbiana, dando tiempo a la inmunidad específica para entrar en juego. La patología infecciosa ocurre como consecuencia del acceso de un microorganismo patógeno (o de sus toxinas) al medio interno del hospedador, y a ella contribuyen tanto la acción directa del agente patógeno como la respuesta defensiva del hospedador, ya que tanto los mecanismos de la inmunidad innata como los de la específica tienen frecuentemente consecuencias deletéreas para los tejidos del hospedador. Una reacción inflamatoria masiva puede dar lugar a situaciones de extrema gravedad clínica, como el shock séptico. Las reacciones inflamatorias que se producen como consecuencia de respuestas inmunes específicas frente a antígenos microbianos son la causa de estados de hipersensibilidad que participan de la patogénesis de muchas infecciones por virus, bacterias, hongos o protozoos.

Entre los hechos más relevantes acaecidos en el s. XX, figura la aplicación de agentes antimicrobianos a la terapia de las enfermedades infecciosas. Aparece pues la opción de influir decisivamente en el curso de un proceso infeccioso ya establecido, mediante la administración al hospedador de fármacos capaces de matar a los microorganismos patógenos o de inhibir su proliferación en el organismo. Entre los tres protagonistas del proceso, el hospedador, el microorganismo patógeno y el agente antimicrobiano, se establecen mutuas interacciones, como refleja la **Figura 1.2**. El microorganismo patógeno inicia la infección, pero el hospedador se defiende mediante los mecanismos de inmunidad innata y específica. El agente antimicrobiano tiene como finalidad inhibir al patógeno, actuando sobre dianas presentes en este; pero el microorganismo puede contraatacar mediante la producción de enzimas que inactiven al antimicrobiano. El hospedador también puede poseer sistemas de inactivación del antimicrobiano, y, a su vez, este puede ejercer efectos colaterales sobre el hospedador, entendiéndose como tales aquellos debidos a la

acción sobre dianas del propio hospedador y no del microorganismo. Estos efectos colaterales, que no son necesariamente perjudiciales para el hospedador, incluyen efectos sobre mecanismos de la inmunidad. En la mayor parte de las familias de agentes antimicrobianos existen ejemplos de moléculas que, independientemente de su acción antimicrobiana, poseen actividades de BRM (Jiménez-Valera *et al.*, 1997; Labro, 2000; Stevens, 1996).

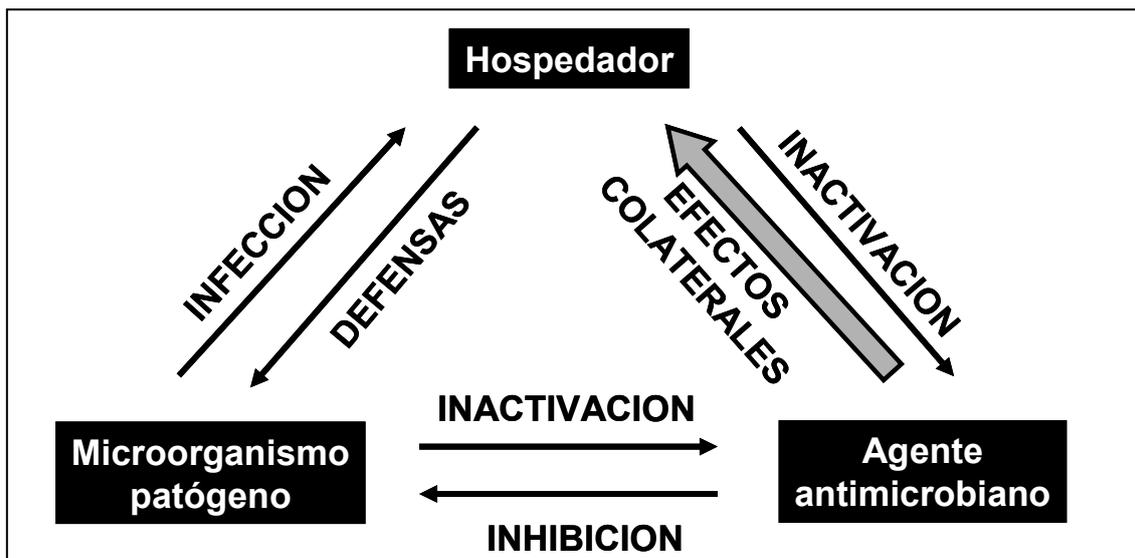


Figura 1.2. Interacciones entre hospedador, microorganismo patógeno y agente antimicrobiano.

Los agentes antimicrobianos pueden ejercer actividad BRM por dos mecanismos, directo e indirecto (**Figura 1.3**). El mecanismo directo se da en aquellos casos en los que la molécula antimicrobiana actúa sobre células del sistema inmune, modificando su capacidad de respuesta; el indirecto opera a través de los microorganismos, ya sean patógenos (en el curso de una infección) o indígenas (asentados en alguno de los nichos ecológicos que ofrece el organismo), que, por ser susceptibles al agente antimicrobiano, mueren y se lisan liberando fracciones con actividad BRM (inmunomodulinas). La existencia del mecanismo directo se apoya en una amplísima bibliografía que presenta resultados de ensayos *in vitro*. En cuanto al mecanismo indirecto,

nuestro Laboratorio ha aportado evidencias experimentales del papel de la microbiota intestinal en la inmunomodulación por antimicrobianos que no se absorben cuando son administrados por vía oral (Leiva *et al.*, 2005).

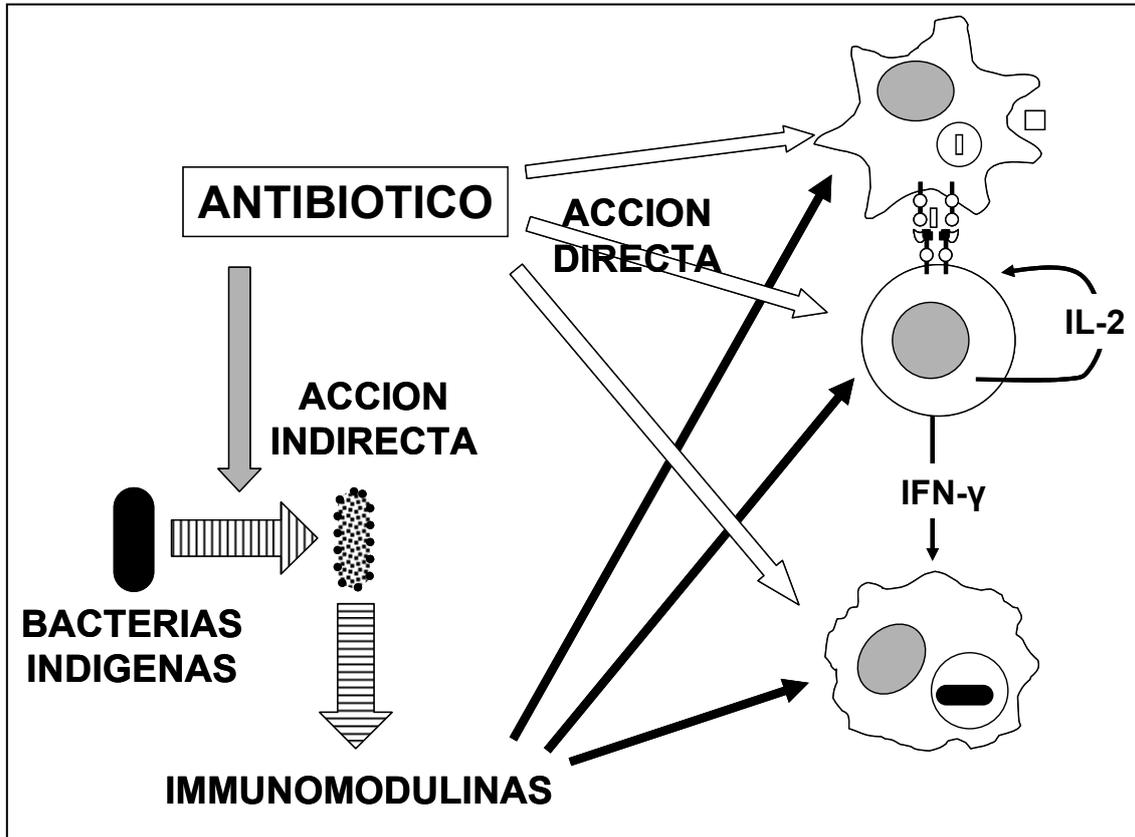


Figura 1.3. Mecanismos directo e indirecto de acción BRM por agentes antimicrobianos. Aunque se presentan solo tres tipos de células (dendrítica, linfocito T_H1 y macrófago) y dos citocinas, la acción BRM puede afectar otras células y mediadores de la inmunidad tanto innata como específica.

Tetraciclinas, fluorquinolonas y macrólidos figuran entre las familias de antibióticos con actividad BRM bien documentada. Las moléculas agrupadas en estas familias tienen en común la capacidad para ser concentrados en el interior de células de mamífero, donde alcanzan niveles varias veces superiores a los del medio extracelular. Es razonable pensar que esta propiedad está relacionada con su capacidad para modificar las respuestas celulares inducidas por estímulos extraños.

1.2. CÉLULAS Y RECEPTORES EN LA MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA

1.2.1. Macrófagos

Los macrófagos son células que, por su versatilidad funcional, ocupan un papel crucial en la inmunidad innata y protagonizan importantes conexiones con la inmunidad específica, como se ha mostrado en la **Tabla 1.2**. Participan en el desencadenamiento y en la resolución de las reacciones inflamatorias, produciendo radicales oxidantes (derivados de oxígeno o de nitrógeno), quimiokinas (IL-8 en humanos; MIP-1 y MIP-2 en ratones), citokinas pro-inflamatorias (factor necrosante de tumores o TNF- α , IL-1, IL-6), factores leucopoyéticos (factores estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos como G-CSF y GM-CSF), citokinas antivirales (IFN- γ) y citokinas anti-inflamatorias (IL-10); participan también en la depuración de inmunocomplejos circulantes; en el procesamiento de antígenos, tanto exógenos como endógenos, y en la subsiguiente presentación de epítomos a las células T_H y CTL, respectivamente; en la diferenciación de células T_{H0} a T_{H1}; en la fagocitosis de microorganismos y partículas extrañas, y, una vez activados por citokinas como IFN- γ , en la destrucción de patógenos intracelulares; en reacciones de citotoxicidad (ADCC), etc. Por esta diversidad de funciones, los macrófagos son también células cruciales en los mecanismos de acción de numerosos BRMs.

1.2.2. TLRs

Como células de la inmunidad innata, los macrófagos son capaces de reconocer PAMPs mediante los correspondientes PPRs. Hay que decir que no siempre los PAMPs se encuentran en microorganismos patógenos: por ejemplo, la mureína es una estructura común de la pared celular de bacterias, tanto patógenas como no; o el lipopolisacárido (LPS) presente en la pared celular de bacterias Gram-negativas, independientemente de su patogenicidad. De hecho, estas y otras estructuras microbianas son BRMs.

Los PPRs más importantes son los TLRs. El gen *toll* fue identificado inicialmente en especies de *Drosophila*, como un gen esencial para el correcto desarrollo de la mosca (Anderson *et al.*, 1985), y para su defensa frente a las infecciones fúngicas (Lemaitre *et al.*, 1996). La existencia de proteínas homólogas a Toll codificadas por el genoma de mamíferos provocó gran interés (Rock *et al.*, 1998), principalmente por el hecho de que las vías de señalización activadas por los TLRs estimulados estaban asociadas con la inmunidad (Medzhitov *et al.*, 1997). Hasta la fecha han sido descritos 10 TLRs en humanos y 13 en ratones, cada uno de ellos responden a distintos PAMPs (Tabla 1.3, Figura 1.4).

Tabla 1.3. TLRs y sus ligandos.

Receptor	Ligando
TLR-1	Lipopéptidos bacterianos tri-acilados (formando heterodímero con TLR-2)
TLR-2	Peptidoglicano (mureína) Acidos lipoteicoicos (bacterias Gram-positivas) Lipopéptidos di- y tri-acilados (en combinación con TLR-6 y TLR-1) Lipoarabinomananos (micobacterias) LPS atípico (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)
TLR-3	RNA bicatenario (virus)
TLR-4	LPS (bacterias Gram-negativas) Proteínas de choque término
TLR-5	Flagelina (bacterias móviles)
TLR-6	Lipopéptidos bacterianos di-acilados (formando heterodímero con TLR-2)
TLR-7	RNA viral
TLR-8	RNA viral
TLR-9	Secuencias CpG no metiladas (DNA bacteriano)
TLR-10	¿?

Datos tomados de Janeway y Medzhitov, 2002, y Takeda *et al.*, 2003

El reconocimiento de PAMPs por sus correspondientes TLRs activa vías intracelulares de señalización que culminan con la activación de factores de transcripción y, como consecuencia final, con la producción de proteínas

(citocinas) y otros mediadores de la inmunidad innata y adquirida, dependiendo de la célula activada (Takeda y Akira, 2005; O'Neill, 2006).

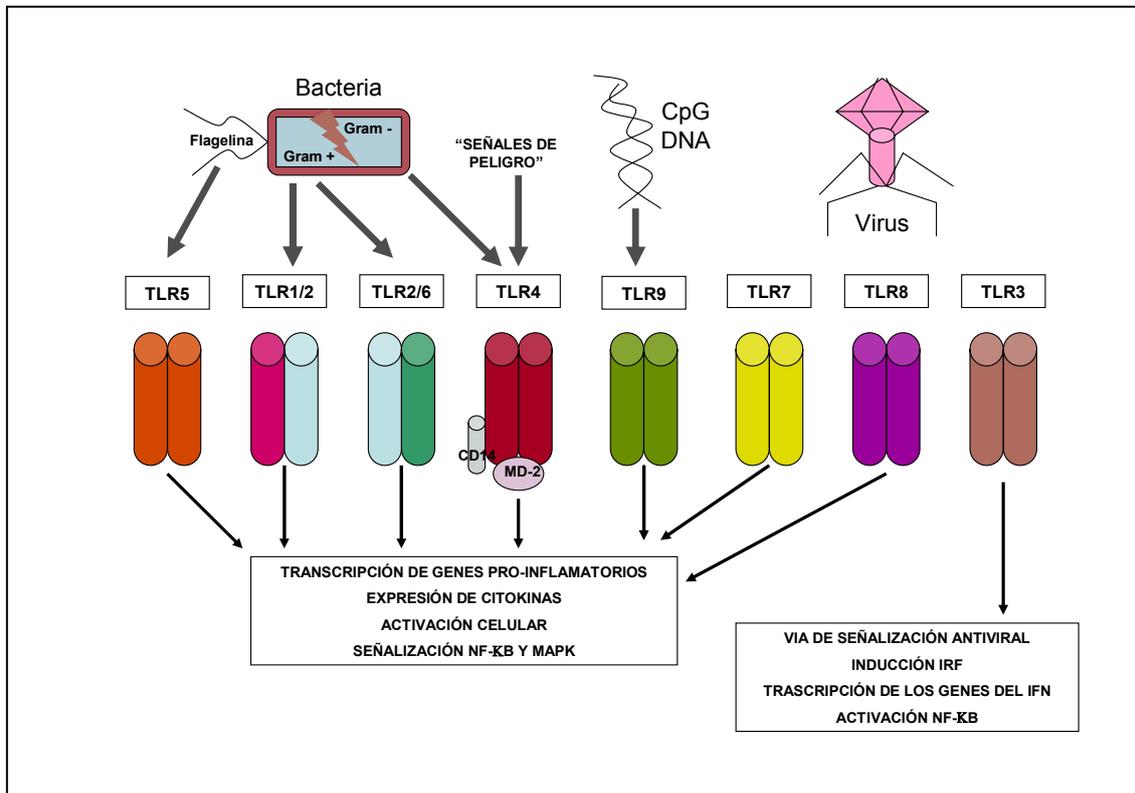


Figura 1.4. Representación de los TLRs humanos y sus activadores.

Los TLRs constan de un dominio extracelular que contiene motivos repetidos ricos en leucina (LRRs), implicados en el reconocimiento del ligando, un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático que comparte una homología secuencial y funcional con el dominio citoplasmático del receptor de la IL-1 (Gay y Keith, 1991), y con un conjunto de proteínas citoplasmáticas adaptadoras que participan en las vías de transducción de señales de ambos receptores. Estos dominios homólogos, denominados TLR/IL-1R o TIR, dan nombre a la superfamilia constituida por los TLRs, el IL-1R y las proteínas adaptadoras (O'Neill y Dinarello, 2000). Los dominios TIR son los responsables de las interacciones proteína-proteína que desembocan en la activación de

proteínas efectoras y factores de transcripción como las MAPK kinasas (de “Mitogen-Activated Protein Kinase”), el factor de transcripción “nuclear factor kappa B” (NF- κ B), y factores reguladores de IFN de tipo I (IFN- α e IFN- β).

1.2.3. Transducción de señales de activación desde los TLRs en la superficie celular hasta el núcleo: vías intracelulares de señalización

Pequeñas diferencias en las regiones extra e intracelulares de los TLRs originan las respuestas específicas de cada uno. Pero, en términos de señalización, una cosa que todos los TLRs tienen en común es que una vez activados desencadenan la activación del factor de transcripción NF- κ B, el cual se une a una discreta secuencia de nucleótidos en la región promotora de genes que codifican para citocinas y otras moléculas pro-inflamatorias (Baeuerle y Henkel, 1994).

La vía de señalización más estudiada hasta el momento es la desencadenada por la activación del TLR-4 a través del LPS, que da lugar a la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 e IFN- β , dependiente de IRF-3 (de “Interferon Regulatoy Factor-3”). En la transducción de señales que desencadena la expresión de estos mediadores pro-inflamatorios están implicadas, además del TLR-4, diversas proteínas y adaptadores que se describen a continuación.

La primera proteína implicada en el reconocimiento del LPS es la LBP (de “LPS-Binding Protein”), proteína de fase aguda producida en el hígado, que una vez en el torrente circulatorio reconoce y forma complejos de alta afinidad con el lípido A del LPS, pudiendo encontrarse este último como molécula libre, fragmentos, o unido a la membrana externa de la bacteria Gram negativa. La LBP, una vez unida al LPS, interacciona con la molécula de superficie CD-14, dando lugar a que el LPS sea transferido a su complejo receptor constituido por TLR-4 y MD-2 (Hailman *et al.*, 1994; Tobias *et al.*, 1995). CD-14 puede encontrarse en forma soluble en plasma, posibilitando el reconocimiento del LPS por células que no poseen CD-14, como células endoteliales o epiteliales, o acoplado a la superficie de células mieloides a través de una cola glicosil-

fosfatidil-inositol. El papel del CD-14 en la señalización TLR-4 consiste en presentar el LPS al complejo receptor TLR-4/MD-2. A pesar de la importancia del CD-14 en la señalización por LPS, existen numerosos estudios en ratones “knock out” que demuestran una respuesta significativa de éstos a la endotoxina bacteriana, lo que sugiere que existe un reconocimiento del LPS por el complejo TLR-4/MD-2 independiente de CD-14 (Haziot *et al.*, 1998).

MD-2 es una glicoproteína de secreción que actúa como proteína extracelular adaptadora en la activación de TLR-4, esencial para que se activen las vías de señalización inducidas por LPS (Schroamm *et al.*, 2001). Visintin *et al.*, (2003) demostraron que el LPS, una vez unido a MD-2 asociado a TLR-4, a través de los motivos extracelulares LRRs, da lugar a la inducción de la agregación de TLR-4 y a la consecuente activación de la señal de transducción.

Actualmente, se conocen 5 proteínas citosólicas con dominios TIR (MyD88, Mal, TRIF, TRAM, y SARM) que actúan como moléculas adaptadoras en las vías de señalización de los TLRs. El uso diferencial de estos adaptadores origina una respuesta diferente para cada receptor. En la respuesta a LPS a través del TLR-4 pueden reconocerse dos componentes: uno dependiente de MyD88 (respuesta temprana) y otro independiente de MyD88 (respuesta tardía) (**Figura 1.5**).

MyD88 es la proteína adaptadora que participa en la señalización de todos los TLRs y receptores de la superfamilia IL-1R. MyD88 es reclutada por el TLR-4 activado y ambos interaccionan a través de sus respectivos dominios TIR, iniciando la vía de señalización que dará lugar a la activación del factor de transcripción Rel NF- κ B. Una vez asociada a TLR-4 MyD88 interacciona con IRAK (proteína quinasa asociada a IL-1R, miembro de la familia de las kinasas serina-treonina), a través de sus respectivos dominios de muerte (Burns *et al.*, 1998). Las proteínas IRAK son mediadores importantes en la señal de transducción de la familia TIR, su dominio protein quinasa provoca su autofosforilación, lo que origina que IRAK active TRAF6 (factor 6 asociado al receptor de TNF- α). TRAF-6 activa a continuación la cascada de kinasas que fosforila TAK-1. TAK-1 es la quinasa activadora del factor de crecimiento

transformante β (TGF- β), y es la responsable de activar NF- κ B y las MAPK kinasas p38 y JNK (de “c-Jun, N-terminal Kinase”). Además de desencadenar la respuesta temprana, TAK-1 activa el factor IRF3, que induce la expresión de IFN- β .

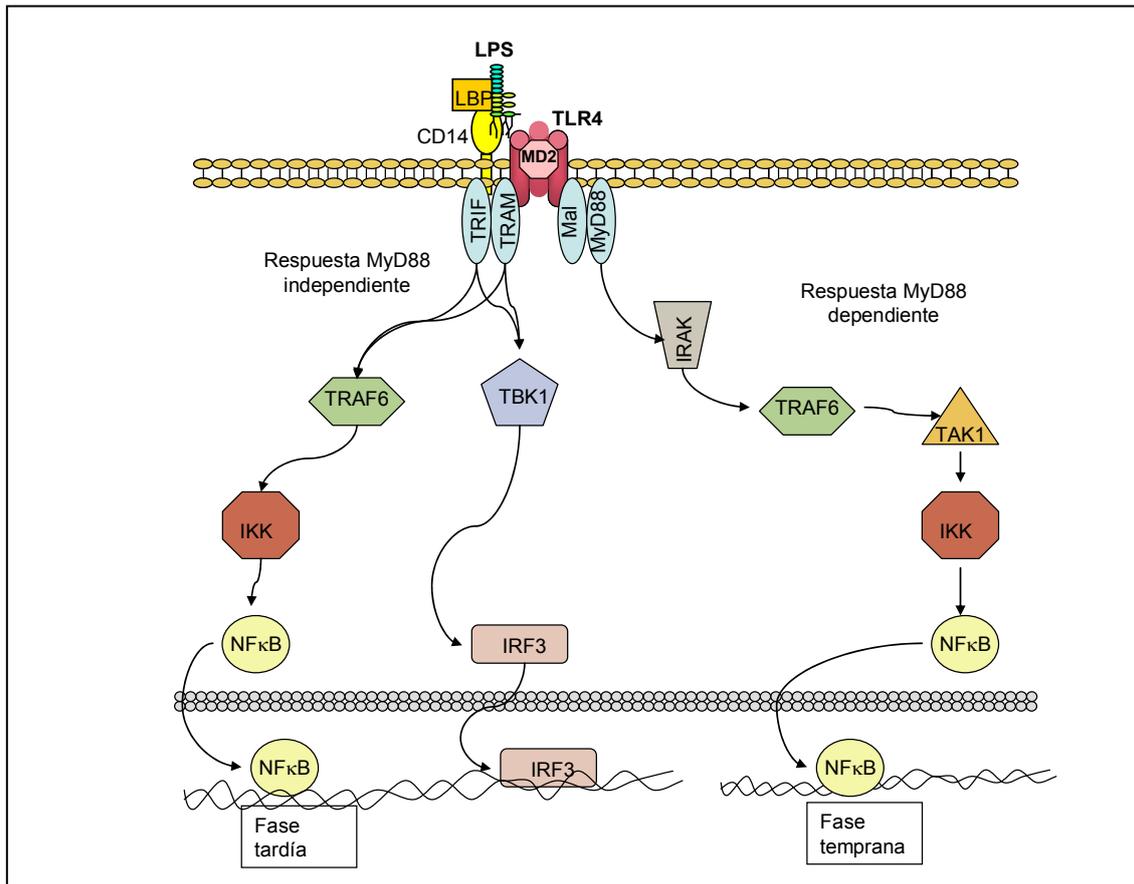


Figura 1.5. Participación de las proteínas adaptadoras TIR en la respuesta a LPS.

La proteína adaptadora Mal o TIRAP (proteína adaptadora con dominio TIR) actúa junto con MyD88, ya que una vez activado el TLR-4 por LPS ambos adaptadores son incorporados al complejo receptor. Parece ser que ambas proteínas adaptadoras participan también en la señalización TLR-2. TIRAP contiene un motivo de unión a TRAF6 en un dominio TIR.

La respuesta independiente de MyD88 es responsable de la activación tardía de NF- κ B e IRF-3. En esta vía juega un papel clave la proteína adaptadora

TRIF (adaptador inductor de IFN- β que contiene un dominio TIR) (Yamamoto *et al.*, 2003). TRIF es activado a través de TRAF (adaptador que actúa como puente entre TRIF y TLR-4), y posteriormente actúa sobre TRAF6 que actúa sobre las I κ B dando lugar a la activación de NF- κ B.

Por otra parte, TRIF forma un complejo con TBK-1/IKK ϵ (quinasas de IRF-3) dando lugar a la fosforilación de IRF-3, que una vez activado se transloca al núcleo e induce la expresión de IFN- β (Fitzgerald *et al.*, 2003). Parece ser que p65, subunidad de NF- κ B, es requerida para la activación específica por LPS de ISRE (elemento de respuesta sensible a interferón) formando un complejo con IRF-3 (Wietek *et al.*, 2003).

Otros componentes de estas vías de señalización merecen atención. SARM es el quinto adaptador, pero su función es aún desconocida en la señalización TLR. Además de un dominio TIR posee dominios estéril α y motivos HEAT/Armadillo. Esta proteína se encuentra altamente expresada en hígado y riñones (Mink *et al.*, 2001). Tollip reside en un complejo con IRAK y es reclutada al complejo IL-1R junto con IRAK en respuesta a IL-1. La autofosforilación de IRAK da lugar a la disociación de Tollip. (Burns *et al.*, 2000) Parece tener un papel regulador, ya que en respuesta a la activación de TLR-4 bloquea la activación de NF- κ B. PKR (proteín kinasa dependiente de dsRNA) se encuentra asociada a Mal (Horng *et al.*, 2001) y su ausencia origina una respuesta defectiva en la activación de NF- κ B por LPS.

1.2.4. El factor de transcripción NF- κ B

NF- κ B designa realmente a un grupo de proteínas transcripcionales, descritas por primera vez por Sen y Baltimore (1986), y que están relacionadas estructuralmente entre sí. Forman dímeros compuestos por varias combinaciones de miembros de la familia NF- κ B/Rel. Hasta el momento han sido descritas 5 proteínas, NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB, y C-Rel (Ghosh y Karin, 2002; Siebenlist *et al.*, 1996). Se caracterizan por poseer un dominio RHD (dominio homólogo a Rel), compuesto por dos estructuras tipo inmunoglobulina, y responsable de la dimerización, unión al

DNA y asociación a proteínas inhibidoras I κ Bs (Karin y Ben-Neriah, 2000; Siebenlist *et al.*, 2005).

Las proteínas NF- κ B regulan la expresión de numerosos genes, muchos de ellos implicados en la respuesta inmune. Se expresan de forma constitutiva en todos los tejidos, con excepción de RelB, que se expresa únicamente en el tejido linfoide (Carrasco *et al.*, 1993).

La interacción entre los miembros de la familia NF- κ B origina dímeros de distinta composición, dependiendo de los estímulos, células o vías de transducción de señales, aunque la forma predominante es el p50/p65. Las distintas formas de NF- κ B poseen diferentes propiedades en cuanto a su preferencia de unión al DNA, interacción con isoformas de I κ B y capacidad transcripcional (Baldwin, 1996; Siebenlist *et al.*, 1996).

Aunque la mayoría de los dímeros son proteínas activadoras, los homodímeros p50/p50, p65/p65, y p52/p52 actúan como represores transcripcionales (Gao *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2002).

En las vías de señalización que activan NF- κ B se encuentran implicadas numerosas proteínas, de las cuales tienen especial importancia las I κ B kinasas (IKK) y las I κ B, que se describen a continuación.

IKK es un gran complejo proteico compuesto de tres subunidades: IKK α e IKK β , que son subunidades catalíticas, e IKK γ o NEMO (“NF- κ B essential modulator”), que tiene actividad reguladora (Karin y Ben-Neriah, 2000). IKK γ se asocia con el dímero IKK α / β través de motivos “dedos de leucina”, también denominados bZIP (“basic leucine zipper”), originando el holocomplejo IKK, esencial para la activación de NF- κ B a través de las vías canónicas. Este complejo, además de las tres subunidades, posee otros componentes adicionales como I κ B, proteínas NF- κ B, y kinasas que lo activan. Un proceso fundamental para la activación de IKK es la fosforilación de la subunidad α y β , a través de procesos de autofosforilación o por kinasas como NIK, TAK1, o MEKK3, entre otras (Hayden y Ghosh, 2004).

La subunidad IKK β media la fosforilación y degradación de I κ B, la translocación nuclear de NF- κ B, y la transcripción de genes dependientes de NF- κ B en respuesta a citocinas y mediadores inflamatorios, siendo IKK α prescindible para esta respuesta. Podría decirse por tanto, que existe una vía dependiente de IKK β , que media la activación de la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria (Bonizzi y Karin, 2004), y una vía dependiente de IKK α , implicada en el término y resolución de la respuesta inflamatoria, ya que acelera el retorno de RelA y C-Rel al citoplasma retirándolos de sus sitios de unión en los promotores de genes pro-inflamatorios (Lawrence *et al.*, 2005).

Existen otras subunidades IKKs como la IKK ϵ e IKKi, homólogas estructurales de IKK α e IKK β , y forman el dímero IKK ϵ /IKKi, que se induce por estímulos como LPS, TNF- α , IL-1 o IL-6, y su sobre-expresión activa NF- κ B. Este dímero tiene un papel importante como amplificador de la respuesta inflamatoria (Hayden y Ghosh, 2004).

Por su parte, las I κ B constituyen una familia de proteínas que regulan la actividad NF- κ B. En esta familia se engloba I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , y I κ B ζ , Bcl-3, p105 (NF- κ B1), p100 (NF- κ B2) y MAIL (molécula procesadora de motivos repetidos “ankyrin” inducida por LPS). Presentan una estructura común que consiste en dominios repetidos “ankyrin” (motivos comunes de interacción proteína-proteína) que median la unión de I κ B al dímero NF- κ B. Por lo demás, difieren en el resto de sus características estructurales, preferencias por los dímeros NF- κ B, funciones biológicas y modelos de activación (Siebenlist *et al.*, 1996).

Las I κ B responden de forma diferencial a activadores NF κ B. Así, el LPS o la IL-1 son los responsables de la degradación de I κ B β , mientras que la degradación de I κ B α puede activarse tras la estimulación con LPS, IL-1, PMA (Miristil-acetato de forbol) o TNF- α (Thanos y Maniatis, 1995). Cada miembro de la familia I κ B emplean distintos mecanismos para retener los dímero NF- κ B en el citoplasma (Ghosh y Karin, 2002). En general, pueden inhibir la activación de NF- κ B a través de 3 mecanismos: secuestrando los dímeros en el citoplasma; facilitando la disociación del dímero-DNA; y exportando dímeros desde el

núcleo. Por otra parte, la activación de NF- κ B aumenta de la expresión de I κ B α y ζ , que se unen a los dímeros unidos al DNA facilitando la disociación, y exportándolos al citoplasma.

1.2.5. Regulación de la actividad NF- κ B

NF- κ B tiene aproximadamente unos 460 activadores, entre los que se encuentran el estrés físico y oxidante, mitógenos, proteínas modificadas, ligandos, mediadores fisiológicos, patológicos o apoptóticos, bacterias, productos bacterianos, hongos, productos fúngicos, virus y sus productos, parásitos y sus productos, citokinas pro-inflamatorias, condiciones patológicas, etc...

Las vías de transducción que activan NF- κ B son numerosas y variadas. Así, algunas vías son específicas de algún estímulo y otras compartidas por muchos. Un único estímulo puede activar NF- κ B a través de varias vías, como por ejemplo el LPS, y muchas de las vías que activan NF- κ B pueden utilizar un mismo componente de señalización determinado, como por ejemplo las MAPK o PKC.

Las vías de activación de NF- κ B pueden clasificarse como vías canónicas y vías no canónicas (Pomerantz y Baltimore, 2002). Existen estimuladores que actúan a través de una de estas vías, y otros a través de ambas.

Las vías canónicas convergen en las kinasas IKKs. Dentro de las vías canónicas pueden distinguirse la vía clásica y la vía no clásica. En la vía clásica, las IKKs fosforilan I κ B, y tras el proceso de fosforilación, las I κ Bs son reconocidas por E3RS^{I κ B}/ β -TrCP, subunidad receptora del complejo ubiquitín ligasa SCF, lo que origina su poliubiquitinación, y posterior degradación por el proteosoma 26S. La degradación de I κ B da lugar a la activación de NF- κ B, a su translocación nuclear, y finalmente a su unión a su secuencia consenso activando la transcripción. En la vía no clásica, que sucede principalmente en células B, se transcriben genes involucrados en el desarrollo y mantenimiento de los órganos linfoides secundarios. Este mecanismo depende únicamente de

la subunidad IKK α , pudiendo ocurrir en ausencia de IKK β o NEMO. Requiere la kinasa NIK y conduce al procesamiento de p100, tras el cual se produce la liberación de p52 y posterior translocación nuclear de dímeros que contienen la subunidad p52 (Bonizzi y Karin, 2004).

Las vías no canónicas no implican al complejo IKK, la fosforilación de serinas de I κ B α , ni la degradación proteosómica de I κ B α . La translocación nuclear de NF- κ B está controlada por mecanismos como modificaciones postranslacionales de proteínas NF- κ B, e interacciones sinérgicas o antagónicas entre NF- κ B y otras proteínas transcripcionales. Son activadas por estímulos como hipoxia o radiación UV.

La vía clásica de activación de NF κ B es la que posee el papel principal en la respuesta inflamatoria, ya que es activada por productos bacterianos y citocinas pro-inflamatorias. De este modo tras el estímulo del correspondiente receptor se desencadenan una serie de vías que dan lugar a la activación de IKK. IKK fosforila y da lugar al procesamiento y degradación de I κ B, liberando el dímero p65/p50, que se transloca al núcleo iniciando la transcripción de sus genes diana (**Figura 1.6**).

La activación de NF- κ B inducida por LPS es bifásica (Han *et al.*, 2002), es decir, que se da una fase temprana (entre 30 minutos y 2 horas), de la que es responsable el LPS y los mediadores pro-inflamatorios tempranos, y una fase tardía (de 8 a 12 horas) inducida por el TNF- α y la IL-1 β .

NF- κ B juega un papel crucial en la respuesta a LPS o a citocinas, ya que es el responsable de la expresión de aproximadamente 200 genes importantes en el desarrollo de procesos inflamatorios, incluyendo situaciones clínicas graves como el shock séptico o el daño pulmonar agudo. Algunas de las proteínas cuya expresión está gobernada por NF- κ B se presentan en la **Tabla 1.4**.

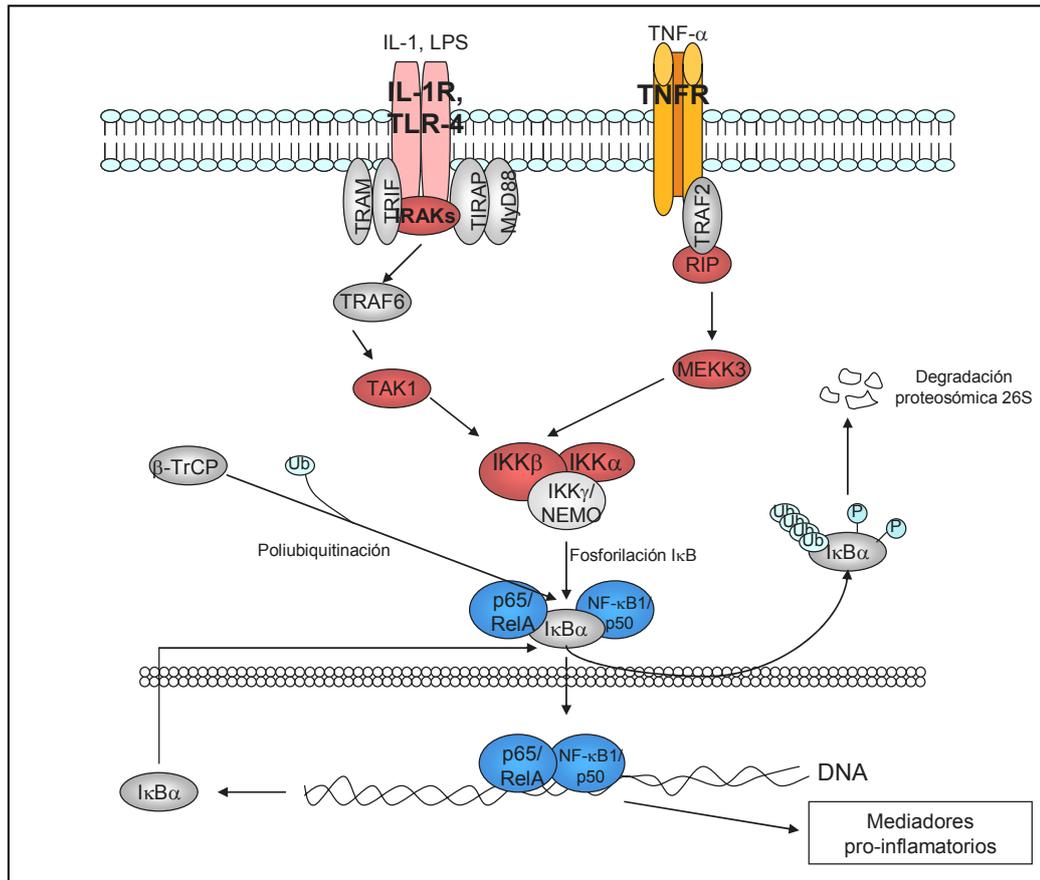


Figura 1.6. Vías canónicas de activación de NF-κB.

NF-κB es también un regulador crítico de la diferenciación, proliferación, y apoptosis celular, y juega papeles primordiales en el desarrollo de los órganos, y en la tumorigénesis. La regulación anormal de la actividad de NF-κB se ha relacionado en la patogénesis de múltiples enfermedades, incluyendo enfermedades autoinmunes, deficiencias y desórdenes inmunológicos, enfermedades inflamatorias, cánceres, y desórdenes neurodegenerativos.

El aumento de la actividad NF-κB en células mononucleares periféricas en pacientes sépticos se correlaciona con la severidad de la patología (Arnalich *et al.*, 2000). De hecho, la actividad NF-κB es mucho mayor en pacientes que no sobreviven al shock séptico que en aquellos que si lo hacen. También la actividad NF-κB está muy incrementada en macrófagos alveolares de pacientes con daño pulmonar séptico (Schwartz *et al.*, 1996).

Tabla 1.4. Algunos productos de genes cuya transcripción se ve activada por NF- κ B

Citokinas	GM-CSF, M-CSF, TNF- α , TNF- β , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-12, IL-18
Quimiokinas	IL-8, MIP-1 α , MIP-2, MCP-1, GRO- α , GRO- β , GRO- γ , RANTES
Moléculas de adhesión	ICAM-1, VCAM-1, E-Selectina, P-Selectina, MadCam-1
Inmunorreceptores	
Enzimas	iNOS, COX-2, Fosfolipasa A ₂ , 5-LO (lipo-oxigenasa)
Proteínas de fase aguda	

1.2.6. El factor de transcripción AP-1

“Activator protein-1” o AP-1 engloba a un grupo de factores de transcripción con motivos bZIP. Está constituido por dímeros formados por proteínas de la familia Fos (c-Fos, FosB, Fra1 y Fra2) y Jun (c-Jun, JunB y JunD) (Ransone y Verma, 1990). Las formas predominantes de AP-1 en la mayoría de las células son los heterodímeros Fos/Jun, los cuales poseen gran afinidad a sus sitios de unión al DNA, mientras que los homodímeros Jun/Jun se unen a sus sitios de unión con poca afinidad (Shaulian y Karin, 2002).

Los complejos AP-1 se unen a secuencias específicas en la región reguladora de los promotores de numerosos genes, muchos de los cuales están implicados en la respuesta inmune (Karin *et al.*, 1997), al igual que en el caso de NF- κ B.

La actividad AP-1 está regulada a distintos niveles, incluyendo la transcripción de genes que codifican para proteínas que constituyen AP-1, estabilidad del mRNA y translación de éste. La actividad AP-1 es también regulada por la composición de los complejos AP-1, la fosforilación de proteínas y la regulación redox de residuos específicos de cisteína en las proteínas AP-1 (Xanthoudakis *et al.*, 1992). El estado redox del complejo AP-1 es un determinante importante de la unión de AP-1 al DNA, y está regulado por la proteína nuclear Ref-1 (Xanthoudakis y Curran, 1992). La función redox se encuentra controlada por la tiorredoxina, la cual activa Ref-1, y ésta reduce los residuos conservados de cisteína de Fos y Jun, permitiendo la unión de AP-1 al DNA (Hirota *et al.*, 1997). La cantidad de proteína Ref-1 se encuentra reducida en los macrófagos alveolares en comparación con el resto de los monocitos, lo cual disminuye la actividad de unión de AP-1 al DNA en este tipo de células, aunque esta situación puede verse modulada durante estados patológicos. De hecho, la unión de AP-1 al DNA en macrófagos alveolares induce la expresión de genes implicados en la iniciación y desarrollo de la fibrosis pulmonar (Doyle *et al.*, 1997; Sime *et al.*, 1997)

AP-1 puede ser inducido por una gran variedad de estímulos, incluyendo factores de crecimiento, citokinas e infecciones bacterianas. La inducción de AP-1 es mediada por la cascada de las MAPKs. El suero y los factores de crecimiento inducen AP-1 por la activación de la MAP kinasa regulada por señales extracelulares ERK (Hill *et al.*, 1994), mientras que la inducción de AP-1 por citokinas pro-inflamatorias y otros estímulos de estrés celular es mediada por SAPK/JNK y p38 (Chang y Karin, 2001). Entre los sustratos de JNK se encuentra la proteína c-jun, y p38 participa en la activación de AP-1, induciendo la activación de los genes Jun y Fos (Karin *et al.*, 1997). La estimulación de macrófagos por LPS activa las 3 vías MAPKs, y la activación de éstas activa una variedad de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1 (Guha y Mackman, 2001).

Aunque NF- κ B y AP-1 son regulados a través de diferentes mecanismos, parecen ser activados simultáneamente por multitud de estímulos similares

(Karin *et al.*, 2001; von Knethen *et al.*, 1999). Numerosos trabajos han demostrado que estos factores de transcripción parecen estar regulados por las mismas cascadas de transducción de señales intracelulares. En muchos casos, JNK y NF- κ B son activados por las mismas vías de señalización (Yanagisawa *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2001). De hecho, la activación de JNK por citocinas proinflamatorias o por estrés se encuentra frecuentemente acompañada por la translocación nuclear de NF- κ B, sugiriendo que estos factores de transcripción trabajan cooperando.

Un hecho clave en la activación conjunta de AP-1 y NF- κ B fue el hallazgo de que la activación de las MAPKs da lugar a la activación de JNK y I κ B kinasas (Lee *et al.*, 2002). Además, la respuesta a AP-1 se potencia cuando las subunidades NF- κ B están presentes y viceversa (Stein *et al.*, 1993).

La coactivación de NF- κ B y AP-1 pueden de forma sinérgica potenciar la transcripción de genes en respuesta a una variedad de estímulos. Muchos genes requieren la activación simultánea de ambos factores de transcripción. De hecho Stein *et al.* (1993) demostraron que las regiones bZIP de c-Fos y c-Jun son capaces de interaccionar con NF- κ B/p65 a través de dominios homólogos a Rel, lo que potencia la unión al DNA a través de elementos de respuesta κ B y AP-1. Esto parece explicar uno de los mecanismos cruzados entre estos factores de transcripción.

1.3. MACRÓLIDOS Y KETÓLIDOS

Macrólidos y ketólidos son familias de antibióticos que, estructuralmente, se clasifican como poliketidos. Los poliketidos constituyen un amplísimo grupo de metabolitos secundarios, tanto de procariontas como de eucariotas, formados a partir de unidades con una estructura cetónica, como se muestra en la **Figura 1.7**.

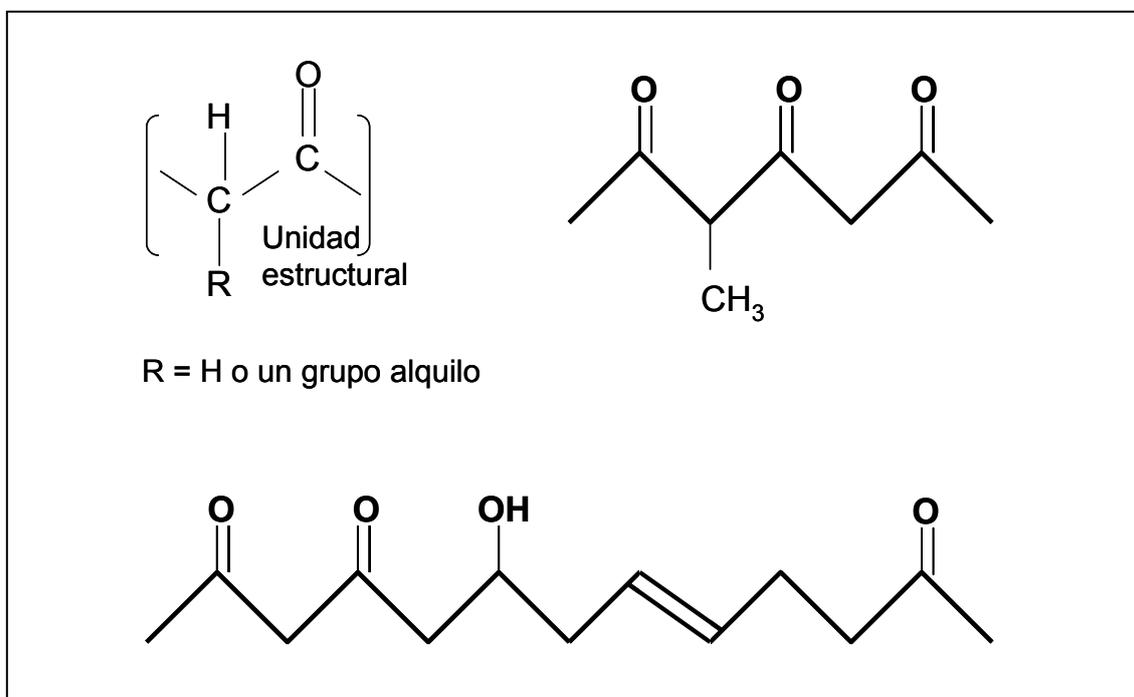


Figura 1.7. Poliketidos: unidad fundamental y estructuras derivadas.

Como señalan Bentley y Bennett (1999), las aplicaciones farmacéuticas de los poliketidos son numerosas: en efecto, dentro de este amplio grupo encontramos antibióticos como tetraciclinas y macrólidos; antifúngicos como anfotericina y griseofulvina; inmunosupresores como micofenolato, rapamicina o tacrolimus; antitumorales como daunomicina; fármacos hipocolesterolémicos como la lovastatina, etc.

1.3.1. Macrólidos

Los macrólidos constituyen una amplia familia de antibióticos, naturales y semisintéticos, obtenidos a partir de especies de *Streptomyces*, el primero de los cuales, la eritromicina, se introdujo en clínica humana en 1952. Estructuralmente, los macrólidos se caracterizan por un anillo macrocíclico lactónico, de 14, 15 o 16 átomos, unido, mediante enlace glicosídico, a uno o más azúcares neutros o básicos (Shiomi y Omura, 2002; Mensa *et al.*, 2003). Eritromicina (**Figura 1.8**), roxitromicina, claritromicina, dieritromicina y troleandomicina son macrólidos con anillo de 14 átomos; el de azitromicina es de 15 átomos; espiramicina, josamicina y midecamicina lo tienen de 16.

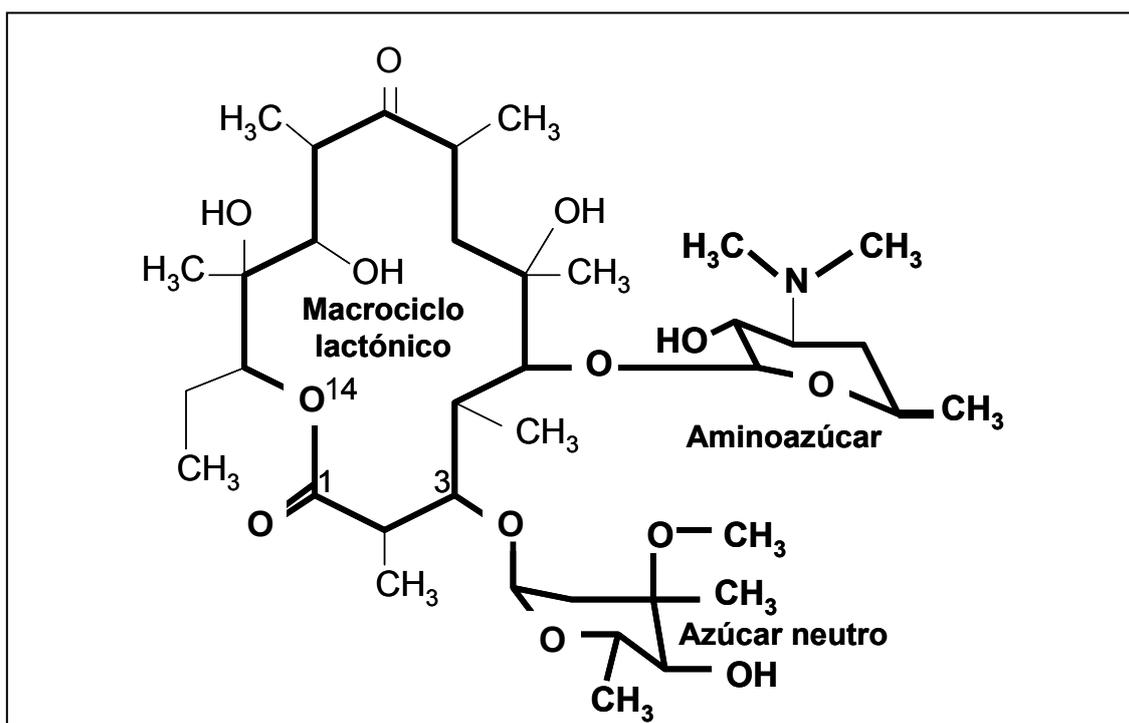


Figura 1.8. Eritromicina como ejemplo de macrólido, con macrociclo de 14 átomos.

Los macrólidos son antibióticos bacteriostáticos, que se unen al RNA ribosomial 23S inhibiendo la síntesis de proteínas; además, interfieren con el

ensamblaje de las proteínas que, junto con los rRNAs 5S y 23S, constituyen la subunidad 50S, bloqueando de esta manera la formación de nuevos ribosomas (Douthwaite y Champney, 2001; Mensa *et al.*, 2003). Son activos frente a cocos Gram-positivos (excepto estafilococos resistentes a meticilina y enterococos), bacilos Gram-positivos, algunas bacterias Gram-negativas (*Neisseria* spp., *Moraxella* spp., *Bordetella pertussis*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus ducreyi*) y patógenos intracelulares como *Legionella* spp., *Chlamydia* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii* y algunas micobacterias (Mensa *et al.*, 2003).

Los macrólidos ejercen otros efectos antimicrobianos, independientes de su principal mecanismo de acción. Es destacable su capacidad para reducir la adherencia bacteriana y la formación de biofilms por bacterias que, como *Pseudomonas aeruginosa*, son naturalmente resistentes a su acción bacteriostática. Esta capacidad tiene implicaciones terapéuticas. Las cepas mucosas de *P. aeruginosa* producen grandes cantidades de alginato, formando un biofilm sobre la superficie de las vías respiratorias. Dentro de estos biofilms, las bacterias pueden escapar a los efectos del sistema inmune, como el complemento o anticuerpos opsonizantes, y a los de antibióticos (Costerton *et al.*, 1999; Vlastarakos *et al.*, 2007). El biofilm constituye un reservorio de bacterias que pueden liberarse y causar brotes infecciosos cuando las condiciones sean favorables para ello (Kobayashi, 2001). Por otra parte, el alginato procedente del biofilm bacteriano es un antígeno que induce un estado de hipersensibilidad con su correspondiente respuesta inflamatoria; su presencia prolongada en las vías respiratorias da lugar a una infiltración masiva de linfocitos acompañado de un desarrollo granulomatoso; la formación de inmunocomplejos que se depositan localmente es un componente de este proceso inflamatorio. En consecuencia, la formación de biofilms es un factor de virulencia que contribuye de varias formas a la patogenicidad de patógenos respiratorios como *P. aeruginosa*. Los macrólidos pueden reducir la formación de biofilms inhibiendo el ciclo de la guanosina difosfo-D-manosa dehidrogenasa (Mitsuya *et al.*, 2000), disminuyendo la movilidad dependiente de flagelos (Kawamura *et al.*, 2000) y la adherencia entre bacterias debida a fimbrias (Wozniak y Keyser, 2004). La movilidad facilita la unión de la bacteria a

superficies lisas y la adherencia permite la unión de unas bacterias a otras, contribuyendo a la generación de biofilms. También se ha descrito la inhibición por macrólidos de la transcripción de genes implicados en la producción de metabolitos coordinada por procesos “quórum sensing”, lo que afecta a la formación de biofilms (Gillis e Iglewski, 2004; Nalca *et al.*, 2006). Sean cuales sean los mecanismos responsables, se ha demostrado que la formación de biofilms por *P.aeruginosa* se ve reducida por dosis inferiores a la CMI de claritromicina (Donabedian, 2003; Wozniak y Keyser, 2004) y de azitromicina (Hentzer y Givskov, 2003). El efecto inhibitorio en la formación de biofilms también se ha descrito en un modelo de ratón con infección respiratoria crónica por *Pseudomonas* tratados con eritromicina (Nagata *et al.*, 2004). La inhibición de la formación de biofilms por los macrólidos a concentraciones por debajo de la CMI posibilita que otros antibióticos antipseudomonas erradiquen el microorganismo, a la vez que permite la acción de los fagocitos (Vranes, 2000; Bui *et al.*, 2000; Yanagihara *et al.*, 2000).

Como ya se ha indicado en el apartado 1.1.3, los macrólidos son incorporados por las células del hospedador, alcanzando concentraciones intracelulares varias veces superiores a las extracelulares (Labro, 1996), lo que, además de contribuir a la eliminación de patógenos intracelulares, también puede modificar algunas funciones de la propia célula eucariota, como se ha demostrado en fagocitos (Labro, 2000). Además, los fagocitos cargados de antibiótico serán atraídos quimiotácticamente hacia tejidos inflamados, lo que equivale a vehiculizar al agente antimicrobiano al foco infeccioso (Sanazuka *et al.*, 2002).

1.3.2. Los macrólidos como BRMs

Los macrólidos ejercen notables efectos BRM, entre los que domina su acción anti-inflamatoria. Estudios *in vitro* han demostrado que la eritromicina inhibe la actividad elastasa y la producción de anión superóxido en neutrófilos estimulados con N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (Mitsuyama *et al.*, 1995), y la claritromicina inhibe la liberación de superóxido por mastocitos (Borszcz *et al.*, 2005).

Sin embargo, los macrólidos estimulan de forma directa la desgranulación de neutrófilos humanos *in vitro* (Labro, 2000) y, con excepción de la roxitromicina, también estimulan la quimiotaxis de macrófagos, fagocitosis y actividad citotóxica frente a *Candida albicans* (Xu *et al.*, 1996). Por tanto, los macrólidos son capaces de estimular la defensa del hospedador frente a los microorganismos.

Para explicar la aparente contradicción entre la acción anti-inflamatoria y la potenciación de mecanismos de inmunidad innata como la fagocitosis, se ha propuesto que los macrólidos estimulan los leucocitos no activados, pero que esta acción es revertida tras el contacto de los leucocitos con citocinas (Culić *et al.*, 2001; Parnham *et al.*, 2005). Esta hipótesis recibe apoyo del hecho de que los macrólidos incrementan los niveles de AMP cíclico en monocitos humanos de sangre periférica estimulados con LPS, pero no en leucocitos no estimulados (Abeyama *et al.*, 2003). El incremento de cAMP se asocia con la inhibición de la producción de IL-8 e IL-6, y con la producción de la citokina anti-inflamatoria IL-10, cuya expresión se incrementa de forma dependiente de la unión de factores de transcripción activados en respuesta a cAMP. De hecho, para la azitromicina ha sido propuesto un mecanismo de acción bifásico que por una parte potencia la actividad inicial antibacteriana, mientras que por otra facilita la resolución de la inflamación y del daño tisular a través de una acción inhibitoria posterior (Culić *et al.*, 2002).

Los macrólidos suprimen la producción de IL-1 β y TNF- α en monocitos (Suzaki *et al.*, 1999), IL-1 β , IL-6, TNF- α , de GM-CSF en mastocitos (Shimane *et al.*, 2001) y de IL-8, ENA-78 y MIP-1 en macrófagos y leucocitos (Schultz *et al.*, 2000). La claritromicina inhibe la producción *in vitro* de IL-6, IL-8 y de la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-2) por monocitos humanos, por la línea humana monocítica THP-1 y por la línea de macrófagos murinos RAW 264.7, tras la estimulación por LPS o por un lisado de *Escherichia coli* o *P. aeruginosa* (Kikuchi *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2007). Eritromicina, roxitromicina y josamicina disminuyen la expresión de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) en macrófagos alveolares estimulados con inmunocomplejos IgG (Tamaoki *et al.*, 1999). La preincubación con azitromicina y roxitromicina, pero no con

claritromicina, inhibe la producción de IL-8 y la migración transendotelial de neutrófilos y monocitos (Uriarte *et al.*, 2002). Azitromicina y claritromicina inhiben de forma directa la respuesta quimiotáctica de neutrófilos murinos a fMLP e IL-8 *in vitro*, inhibiendo la kinasa ERK, implicada en la activación de factor quimiotáctico (Tsai *et al.*, 2004). Por tanto, los macrólidos actúan directamente sobre leucocitos inhibiendo su desplazamiento en respuesta a la estimulación por quimiotaxinas, pero también inhiben la producción de factores quimiotácticos, ya sea por leucocitos o por otros tipos celulares. En efecto, la eritromicina y la claritromicina suprimen *in vitro* la expresión de mRNA de IL-8 en células normales y transformadas del epitelio bronquial humano (Takizawa *et al.*, 1997), y suprimen la secreción de endotelina-1 por dichas células (Takizawa *et al.*, 1998). La eritromicina inhibe de forma significativa la eotaxina en fibroblastos de pulmón humano (Sato *et al.*, 2001). La eritromicina puede inhibir la expresión de COX-2 (ciclooxigenasa) inducida por IL-1 β e inhibe la fosforilación de la MAPK p38 inducida por IL-1 β asociada con la expresión de COX-2 en células sinoviales (Fumimori *et al.*, 2004). La acción de los macrólidos en células epiteliales puede modificar de forma indirecta las funciones de los neutrófilos (Yamasawa *et al.*, 2004). Eritromicina, claritromicina y azitromicina inhiben la producción GM-CSF por la línea epitelial respiratoria humana A549 estimulada por TNF- α , inhibiendo por tanto la capacidad de las células epiteliales para mantener la supervivencia de neutrófilos *in vitro* (Shimizu *et al.* 2003).

Además, los macrólidos inhiben la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 o integrinas, necesaria para la retención de leucocitos por el endotelio vascular activado, paso previo a su salida del compartimento vascular para dirigirse a los focos inflamatorios. *In vitro*, la eritromicina reduce la secreción de la molécula de adhesión intercelular soluble-1 (sICAM-1) en cultivos de células bronquiales y disminuye la expresión de las β 2-integrinas (CD 11b/CD 18) por PMNs (Lin *et al.*, 2000), y la roxitromicina inhibe la expresión de la E-selectina e ICAM-1 en células endoteliales (Akamatsu *et al.*, 2001). Estudios *in vivo*, han demostrado que el pre-tratamiento con eritromicina inhibe de forma significativa la acumulación de neutrófilos y elastasas en el lavado broncoalveolar de ratas con inflamación respiratoria inducida por LPS (Sanz *et al.*, 2005) debido a la

inhibición de la expresión de moléculas de adhesión, pero no de las constitutivas, lo que sugiere que no inhibe la infiltración temprana de leucocitos, sino de las células activadas por citokinas o LPS en el lugar de la infección, limitando por tanto el daño tisular inflamatorio (Parnham, 2004).

Todos estos estudios sugieren que los macrólidos inhiben tanto la unión de AP-1 como de NF- κ B a sus secuencias de unión durante la transcripción (Aoki *et al.*, 1999; Abe *et al.*, 2000).

Los macrólidos también actúan a nivel de la apoptosis celular, lo que puede ser otro componente de su acción anti-inflamatoria. El incremento del cAMP producido por la eritromicina acelera la apoptosis de los neutrófilos (Aoshiba *et al.*, 1995) y la roxitromicina induce apoptosis en linfocitos activados por *Dermatophagoides faringe* de sujetos con asma sensible a *D. faringe* a través de la inducción del sistema ligando Fas/Fas y reduciendo la expresión de Bcl-2 (Ogawa *et al.*, 2003).

Los estudios de acciones sobre la inmunidad específica ofrecen aspectos contradictorios. Así, se sabe que la roxitromicina inhibe la secreción de IL-4 e IL-5 por células T de forma dosis-dependiente, aunque no afecta a la secreción de IFN- γ e IL-2 (Asano *et al.*, 2001), lo que podría interpretarse como un efecto modificador del balance T_H1/T_H2 a favor de T_H1 . Esta interpretación es coherente con la inhibición la expresión de receptores de quimiokinas en células T_H2 *in vitro* por el mismo antibiótico (Kobayashi *et al.*, 2004). En el mismo sentido, la claritromicina, a concentraciones similares a aquellas que afectan a las funciones de los monocitos, inhibe la producción de IL-4 por linfocitos T_H2 , dando lugar a un incremento del ratio Th1/Th2 (Williams *et al.*, 2005) Ahora bien, los linfocitos T_H1 se consideran pro-inflamatorios, mientras lo T_H2 cooperan con las células B en la respuesta de anticuerpos, por lo que estos efectos de macrólidos en el balance T_H1/T_H2 parecen contrapuestos a sus propiedades anti-inflamatorias, ampliamente documentadas. Sin embargo, hay evidencias en la otra dirección. Se ha señalado que eritromicina, azitromicina y josamicina parecen inhibir la producción de la citokina IL-12 (Ortega *et al.*, 2004), que es una citokina pro- T_H1 . Además, cuando células

dendríticas (responsables de la presentación antigénica) aisladas de médula ósea de ratones BALB/c se cultivan con linfocitos T de los mismos ratones y se estimulan con LPS, se observa que la claritromicina suprime la producción *in vitro* de IL-6 (citokina pro-inflamatoria) y que la azitromicina induce la síntesis de IL-10, que una citokina anti-inflamatoria (Sugiyama *et al.*, 2007).

1.3.3. La actividad BRM en las aplicaciones terapéuticas de los macrólidos

Se ha sugerido que la acción inmunomoduladora de los macrólidos puede explicar parte de sus beneficios terapéuticos en numerosas infecciones del tracto respiratorio (Labro, 2004).

Los datos disponibles sobre los efectos de los macrólidos en sepsis están limitados a modelos experimentales (Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2004; Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2005). La modulación de la respuesta inflamatoria sistémica por claritromicina en modelos de sepsis en conejos por distintos patógenos, parece ser la explicación de los beneficios observados por ésta, ya que *in vitro*, la claritromicina no tuvo ningún efecto sobre los patógenos testados. Tanto los animales tratados como los no tratados presentaron el mismo grado de endotoxemia y bacteriemia, excluyendo cualquier efecto directo antibacteriano. Pero la concentración de TNF- α y radicales oxidantes en suero se encontraban disminuidos significativamente en los animales tratados con claritromicina. Además, la infiltración inflamatoria en el hígado, pulmón y bazo se encontraba disminuida en los conejos tratados con claritromicina comparado con los controles. Sin embargo, la carga bacteriana no difería entre los conejos tratados y sin tratar (Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2006^{a,b}). En otro estudio reciente de inducción de shock séptico en ratones, el pre-tratamiento con azitromicina disminuyó la letalidad de éstos, pero sin alterar el grado de infiltración neutrofílica en los tejidos (Ivetić Tkalcević *et al.*, 2006).

Es un hecho demostrado que en los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) o extrahospitalaria, tratados con macrólidos, las tasas de

mortalidad son mucho más bajas, y el periodo de hospitalización más corto que en los pacientes tratados con otro tipo de terapias, incluso cuando la neumonía progresa a bacteremia, probablemente por los efectos inmunomoduladores de los macrólidos (Amsden, 2005). En vista a su destacada capacidad de concentrarse en las células leucocitarias no es de extrañar que los macrólidos sean efectivos contra patógenos intracelulares, como *Mycobacteria pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*, ambas implicadas con frecuencia en casos de NAC. Sin embargo, estos microorganismos pueden persistir en las vías respiratorias tras la terapia antibacteriana, como se ha visto en modelos animales (Bin *et al.*, 2000; Hardy *et al.*, 2003), en los que por otra parte se observó un efecto inhibitor en la producción de citokinas pro-inflamatorias cuando fueron tratados con claritromicina y azitromicina. En clínica, al igual que en modelos animales, aunque el tratamiento con macrólidos disminuye la morbilidad y acorta la duración de la sintomatología (Gendrel *et al.*, 1997) no se erradica totalmente el microorganismo. Pero los beneficios terapéuticos de los macrólidos en NAC, incluso sin la erradicación completa del microorganismo, suponen un efecto que podría tenerse en cuenta a la hora de realizar una terapia combinada. De hecho, la terapia combinada de una fluorquinolona o un β -lactámico con un macrólido suponen una disminución en la tasa de mortalidad por NAC de un 40-70% (Equi *et al.*, 2006), beneficio que debe achacarse a las propiedades inmunomoduladoras de estos agentes más que a sus propiedades anti-infecciosas. Existen estudios retrospectivos en los que se muestra que el uso de una terapia combinada de un β -lactámico con un macrólido disminuye el riesgo relativo de muerte 2.5 veces (Martínez *et al.*, 2003) en el tratamiento de bacteriemia por *S. pneumoniae*, y que disminuye la mortalidad en pacientes con neumonía en comparación con los tratados únicamente con el β -lactámico (García-Vázquez *et al.*, 2005), probablemente por las interacciones de los macrólidos con el sistema inmune. A pesar del aumento de neumococos resistentes, los macrólidos siguen siendo recomendados como primera elección para el establecimiento de una terapia empírica (por ejemplo, cuando es posible que se den patógenos atípicos), o incluso en pacientes hospitalizados con NAC severa en combinación con cefalosporinas de avanzada generación (Heffelfinger *et al.*, 2000; Macfarlane, 2001). El tratamiento de NAC con azitromicina es un claro ejemplo del beneficio

que supone la terapia con macrólidos. La azitromicina potencia de manera inmediata los efectos antibacterianos de los neutrófilos a través de la desgranulación de éstos y de la activación de la cascada oxidativa, lo que sin duda contribuye a la rápida resolución de la sintomatología de NAC, pero los efectos anti-inflamatorios de este agente también están implicados en estos efectos beneficiosos. Además, la azitromicina posee un efecto pro-apoptótico que podría ser responsable de la eliminación de los neutrófilos sin que se viertan sus productos pro-inflamatorios durante el proceso. Estos efectos pro-apoptóticos se han visto también con la eritromicina, roxitromicina y claritromicina (Inamura *et al.*, 2000; Ives *et al.*, 2001). Los estudios clínicos con azitromicina indican que los pacientes no reciben únicamente el beneficio de un periodo de potenciación antibacteriana, sino que también una modulación de la respuesta inflamatoria, que en la mayoría de los casos ayuda a prevenir la amplificación de la cascada inflamatoria y el consecuente daño tisular que puede dar lugar a una resolución mucho más lenta de la patología respiratoria.

La fibrosis quística es una enfermedad genética causada por una mutación en la proteína de los canales de Cl (también denominado regulador transmembrana de fibrosis quística). Esta mutación cambia la composición electrolítica en el fluido extracelular que cubre al epitelio respiratorio favoreciendo la colonización crónica de *P. aeruginosa* y de las exacerbaciones bacterianas recurrentes. El reciente interés del uso de macrólidos en el tratamiento de fibrosis quística es debido principalmente a la acción de estos agentes sobre *P. aeruginosa*, agente etiológico común de infecciones respiratorias en estos pacientes, y en pacientes con panbronquiolitis difusa. Aunque los macrólidos no poseen una actividad potente *in vitro* frente a *P. aeruginosa*, sus efectos adicionales a concentraciones menores a su CMI, ya descritos anteriormente, los hacen útiles en la terapia de estas (Rubin y Henke, 2004; Schultz, 2004; Southern y Barker, 2004). Pero ensayos clínico más recientes con azitromicina en pacientes no colonizados por *P. aeruginosa* han revelado otros beneficios clínicos, independientes de acciones sobre la bacteria (Clement *et al.*, 2006). En relación con esto, se ha comprobado que la adición de azitromicina a cultivos de células epiteliales con fenotipo de fibrosis quística disminuye el nivel de TNF- α e IL-8, pero no de IL-6, efecto que está asociado

con la inhibición de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B (Cigana *et al.*, 2006; Cigana *et al.*, 2007). Estudios recientes con claritromicina revelaron que su administración a largo plazo disminuye las concentraciones de TNF- α , IL-4 y IL-8 en el esputo, y por otra parte incrementa la concentración de IFN- γ (Pukhalsky *et al.* 2004). Además se observó una mejora de las funciones respiratorias en los pacientes tratados. Por otra parte se observó un incremento significativo del ratio INF- γ /IL-4, que se asoció al incremento en la respuesta linfoproliferativa de linfocitos de sangre periférica al mitógeno de células T fitohemaglutinina. Los resultados observados podrían indicar que los macrólidos actúan disminuyendo la inflamación pulmonar, pero creando un desequilibrio Th1/Th2, posiblemente a través de un proceso de tolerancia de células T mediada por IL-10 (Casaulta *et al.*, 2003).

En cuanto la panbronquiolitis difusa, diversos estudios (Kadota *et al.*, 1993; Sakito *et al.*, 1996; Schultz, 2004) han demostrado que la administración crónica y en bajas dosis de macrólidos disminuye la gran cantidad de neutrófilos presentes en los pulmones disminuyendo la quimiotaxis a través de la disminución de las quimioquinas responsables, como la IL-8. También se observa un cambio en el esputo tras meses de terapia, ya que éste se vuelve más parecido al de los pacientes sanos, en el que el porcentaje de macrófagos alveolares es mayor que el de PMN. Los efectos de los macrólidos, más allá de su actividad antibacteriana, parecen ser los responsables de esta mejora (Saiman, 2004). Hoy en día la claritromicina es el agente más estudiado, en sustitución de la eritromicina, la cual incrementó la tasa de supervivencia en un 90% cuando comenzó a usarse como terapia empírica en 1984. De hecho, la eritromicina disminuye las concentraciones de IL-1 β e IL-8 en el lavado broncoalveolar de pacientes con panbronquiolitis difusa (Sakito *et al.*, 1996), y los efectos beneficiosos de la claritromicina se ven reflejados en varios estudios clínicos que ponen de manifiesto una disminución del volumen del esputo (Schultz, 2004), y una mejora de la capacidad pulmonar entre otros beneficios (Kadota *et al.*, 2003). El mecanismo de acción de la claritromicina en la panbronquiolitis difusa se basa en su efecto directo sobre el epitelio respiratorio y sobre *P. aeruginosa*. Además, el epitelio de los pacientes con panbronquiolitis difusa sobreproduce mucinas, en las cuales la proteína muc5ac es un

componente fundamental, y parece que el tratamiento con claritromicina reduce la producción de muc5ac (Kaneko *et al.*, 2003).

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por un desarrollo progresivo e irreversible de la limitación de aire por las vías respiratorias (Tamaoki *et al.*, 2004), que se acompaña de infiltración neutrofílica e hipersecreción mucosa. Diversos estudios experimentales han mostrado que la administración oral de macrólidos reduce la acumulación de neutrófilos y la consecuente hipersecreción mucosa. El tratamiento de exacerbaciones agudas de EPOC con antibióticos está ampliamente establecido, aunque el uso de éstos como profilácticos es un tema discutido (Rennard, 2004). Algunos estudios han establecido un papel beneficioso de los macrólidos: en sujetos con EPOC que no recibían corticoides, la claritromicina redujo significativamente el recuento de leucocitos en el esputo y las concentraciones de TNF- α e IL-8 (Basygit *et al.*, 2004). Otro estudio ha demostrado que la administración de azitromicina disminuye los niveles séricos de IL-8 y lactoferrina, y los índices de desgranulación y de la cascada oxidativa en neutrófilos (Parnham *et al.*, 2005).

Los macrólidos pueden ser efectivos en episodios inflamatorios sin etiología infecciosa. El asma es un desorden crónico e inflamatorio del tracto respiratorio que se caracteriza por una hiperrespuesta bronquial y ataques paroximáticos de asfixia. Se han llevado a cabo numerosos estudios clínicos para evaluar el efecto de los macrólidos en enfermos asmáticos, en los que se reflejan numerosos efectos beneficiosos como la disminución de la infiltración de eosinófilos y la producción de eotaxina y RANTES (Hatipoglu y Rubinstein, 2004). La administración prolongada de claritromicina disminuye la disnea nocturna (Kraft *et al.*, 2002) y la dependencia de corticoides (Garey *et al.*, 2000). Además, disminuye de forma significativa el recuento de eosinófilos en suero y esputo, de proteínas catiónicas eosinofílicas, e incidencias de ataques asmáticos (Amayasu *et al.*, 2000). La azitromicina también parece jugar un papel en el tratamiento del asma, ya que disminuye de forma considerable el recuento de neutrófilos en el esputo (Piacentini *et al.*, 2007). Pero también se ha considerado que el beneficio de los macrólidos en asma podría ser debido

no únicamente a la inhibición de la inflamación, sino también a la supresión de infección crónica subyacente por *M. pneumoniae* o *C. pneumoniae*, como se resume en recientes revisiones (Gotfried, 2004; Beuther, 2004; Hatipoglu y Rubinstein, 2004).

Sin embargo, hay evidencias de eficacia anti-inflamatoria en otras situaciones clínicas sin infección. En un estudio en el que se administró claritromicina a mujeres que iban a sufrir una mastectomía, se observó que aquellas pacientes tratadas con el macrólido tenían suprimida la respuesta febril, taquicardia y taquipnea; también experimentaron menores molestias y dolores; aunque no se dieron alteraciones significativas en las concentraciones de citocinas (IL-6, TNF- α), los cambios en la proteína C reactiva y las tasas de sedimentación de eritrocitos fueron menores en aquellas tratadas con claritromicina. Por tanto, la claritromicina parece modular la respuesta inflamatoria aguda asociada con la cirugía y provoca una mejora en los pacientes (Chow *et al.*, 2000).

1.3.4. Ketólidos

Aunque la sucesiva introducción en clínica de antibióticos de la familia de los macrólidos supuso importantes contribuciones al arsenal antibacteriano, su eficacia se vio prontamente limitada por el ineludible problema de las resistencias. Se conocen tres mecanismos de resistencia a macrólidos: modificaciones en la estructura diana, eflujo activo e inactivación enzimática (Mensa *et al.*, 2003). La modificación de la subunidad 50S por metilación del rRNA 23S es el principal mecanismo de resistencia a macrólidos. La metilación está catalizada por una metilasa codificada por el gen *erm* (“*erythromycin ribosome methylation*”), cuya expresión da lugar al fenotipo MLS_B (“macrolide lincosamide streptogramin B”), resistente a macrólidos, lincosaminas y estreptogramina B. La expresión de *erm* puede ser constitutiva (cepas que presentan en todo momento el fenotipo de resistencia) o inducible (cepas que presentan el fenotipo solo cuando están en presencia del antibiótico). Los macrólidos con ciclos de 14 o 15 átomos, que poseen cladinosa como azúcar neutro, son inductores del fenotipo MLS_B en cepas portadoras de *erm* de expresión inducible. El eflujo activo es otro importante mecanismo de

resistencia frente a macrólidos. El correspondiente fenotipo de resistencia se denomina M. En cepas de *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*, el fenotipo M se debe a la expresión del gen *mef* (“*macrolide efflux*”), que codifica la proteína de membrana capaz de extraer macrólidos de la bacteria. En relación con la significación clínica de las resistencias a macrólidos, cabe señalar que la principal causa de morbilidad y mortalidad en neumonías comunitarias es *S. pneumoniae*, del cual datos recientes indican que más del 50% de las cepas han llegado a ser resistentes a penicilina, un 30% son ya resistentes a macrólidos (Mensa *et al.*, 2003). La rápida diseminación de resistencias a macrólidos en cocos Gram-positivos impulsó la investigación de compuestos relacionados que conservasen su actividad frente a las cepas resistentes de *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. Surge así la familia de los ketólidos, caracterizada por la sustitución del azúcar neutro (la cladinosa de la eritromicina) por un grupo ceto, que confiere a las nuevas moléculas mayor estabilidad a pH ácido y la propiedad de no inducir el fenotipo MLS_B en las cepas de estreptococos con genes *erm* inducibles (Bryskier, 2000; Ackermann y Rodloff, 2003). La telitromicina, inicialmente designada como HMR 3647, (**Figura 1.9**) ha sido el primer miembro de la nueva familia que se ha introducido en clínica. La telitromicina es un ketólido-carbamato, ya que se ha unido un carbamato a los carbonos 11 y 12 del macrociclo lactónico. En la telitromicina, el carbamato lleva una cadena de butil-imidazol-piridinil, constituyendo un conjunto que proporciona al antibiótico una mayor actividad antibacteriana, insensibilidad a la bomba de eflujo del fenotipo M y mejores propiedades farmacocinéticas (Bryskier, 2000). Además, el hidroxilo que la eritromicina posee en el carbono 6, ha sido transformado en un grupo metoxi, para evitar interacciones con el grupo ceto. Los mecanismos de acción siguen siendo los mismos que en los macrólidos y el espectro e indicaciones son similares, pero la telitromicina posee comparativamente mayor actividad antibacteriana. Desde 1999, está en marcha el estudio de vigilancia de resistencias, longitudinal e internacional, PROTEKT (“prospective resistant organism tracking and epidemiology for the ketolide telithromycin”), que entre 1999 y 2003 examinó un total de 20,750 cepas de *Streptococcus pneumoniae*, de las cuales 21 (0.1%) mostraron resistencia de bajo nivel a telitromicina (CMI entre 4 y 8 µg/ml): se concluye que, mientras que las resistencias a macrólidos como azitromicina se extienden

con rapidez, la proporción de cepas de neumococos resistentes a telitromicina no ha incrementado significativamente desde la introducción del ketólido en 2001.

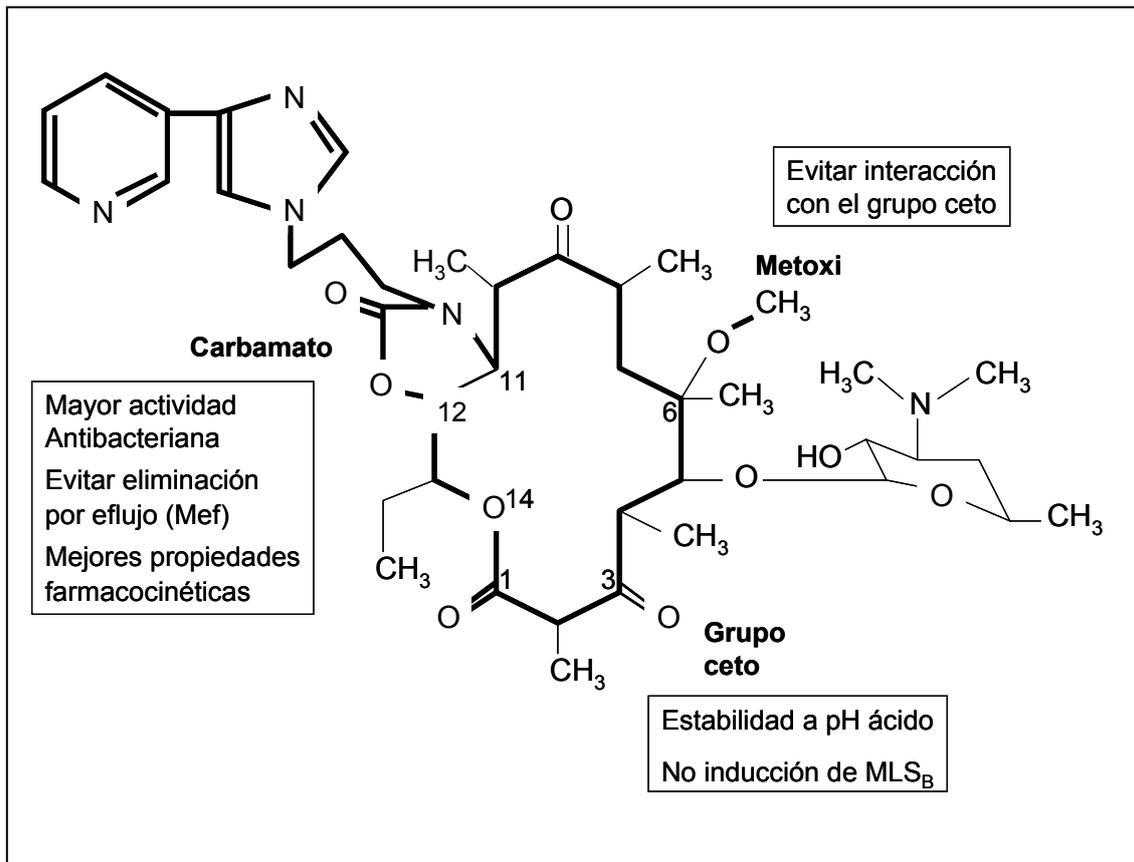
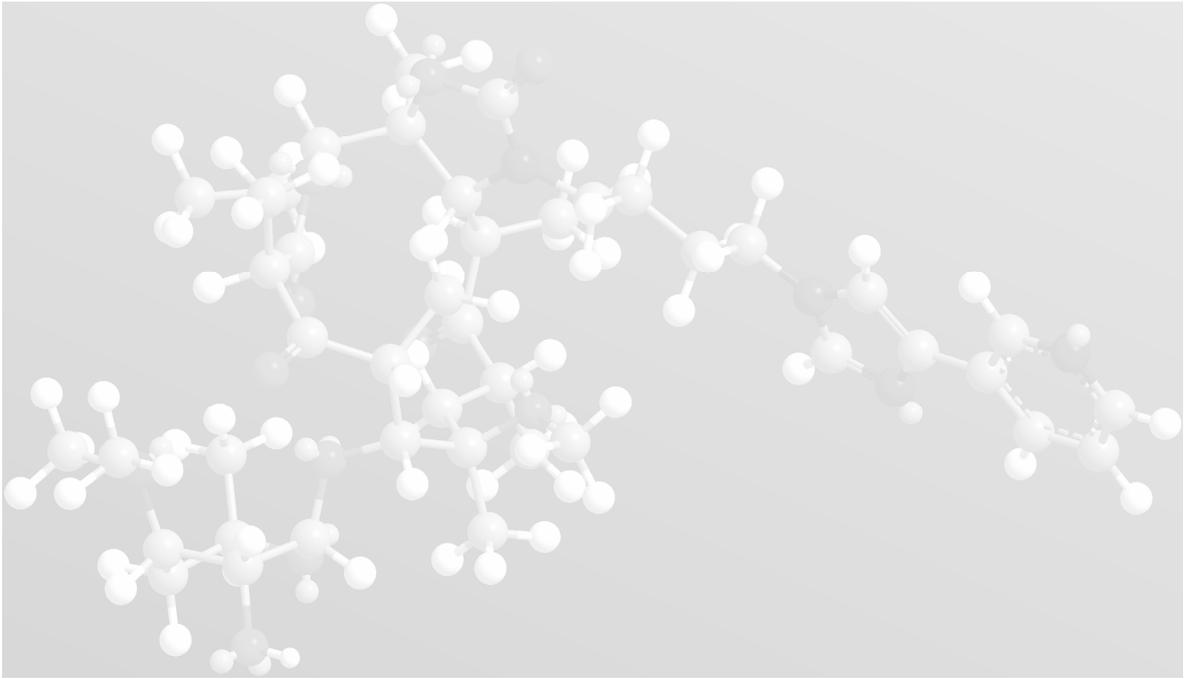


Figura 1.9. Telitromicina. Nótese las modificaciones estructurales respecto de la eritromicina (Figura 1.8) y sus implicaciones funcionales.

Dadas sus relaciones estructurales con los macrólidos, los ketólidos están siendo objeto de estudios para averiguar si se comportan también como BRMs. Al igual que los macrólidos, la telitromicina se acumula en células como los neutrófilos, en los que inhibe la producción de superóxido (Vazifeh *et al.*, 1998). Estudios *in vitro* han demostrado que telitromicina inhibe la secreción de IL-1 y TNF- α por monocitos humanos estimulados con LPS (Araujo *et al.*, 2002), y de

IL-6 e IL-8 por monocitos humanos estimulados con toxina Siga (Nakagawa *et al.*, 2003). El ketólido ejerce también efectos anti-inflamatorios *in vivo*, como se ha demostrado en modelos murinos de shock endotóxico, en los que se observa una reducción de los niveles plasmáticos de mediadores pro-inflamatorios (Lotter *et al.*, 2006; Leiva *et al.*, 2007) y una significativa protección de la muerte inducida por dosis letales de LPS (Leiva *et al.*, 2007). También se ha demostrado que telitromicina es capaz de mejorar la sintomatología en exacerbaciones agudas de asma, sin que parezca existir relación con infecciones simultáneas con micoplasmas (Johnston *et al.*, 2006).

Con posterioridad a la telitromicina, un segundo ketólido, designado inicialmente como ABT 773 y luego como cetromicina, del que se sabe que también se acumula en neutrófilos, utilizando posiblemente el mismo “carrier” que los macrólidos, y que suprime la producción de radicales oxidantes (Labro *et al.*, 2004). La cetromicina ejerce efectos anti-inflamatorios en un modelo murino de infección con *Mycoplasma pneumoniae* (Rios *et al.*, 2004).



2. OBJETIVOS

Por sus analogías estructurales con los macrólidos, es razonable proponer que los ketólidos deben poseer actividad inmunomoduladora. En el capítulo de Introducción se han mencionado algunas evidencias previas en este sentido.

El conocimiento de los efectos colaterales de agentes antimicrobianos sobre el sistema inmune permite un mejor uso terapéutico, especialmente en el caso de enfermos que, por causa de una patología de base, o del tratamiento que reciben, tienen comprometidas algunas funciones inmunitarias.

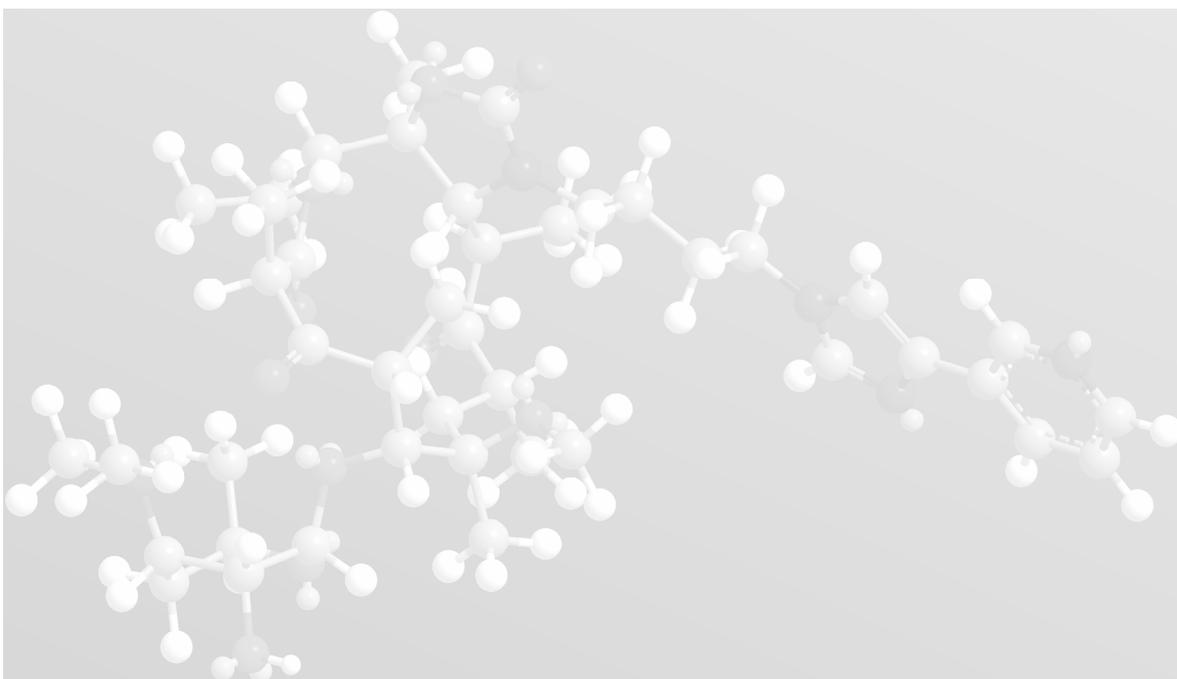
Estas razones han impulsado el planteamiento de la investigación contenida en la presente Tesis, cuyo objetivo general ha sido el estudio experimental de las propiedades inmunomoduladoras del primer ketólido introducido en la práctica clínica, la telitromicina. Para un eficaz desarrollo temporal del trabajo, nos hemos planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Investigación de la actividad moduladora de la telitromicina *in vitro*, sobre esplenocitos de ratones no tratados previamente y líneas celulares de macrófagos y linfocitos.
2. Evaluación del potencial anti-inflamatorio de telitromicina en un modelo *in vivo* de shock séptico inducido por LPS.
3. Estudio del potencial anti-inflamatorio de telitromicina en un modelo *in vitro* de inflamación respiratoria inducida por LPS basado en la interacción de macrófagos y células epiteliales.
4. Evaluación del potencial anti-inflamatorio de telitromicina en un modelo *in vivo* de inflamación respiratoria inducida por nebulización de LPS.

OBJETIVOS

Aunque el diseño general del trabajo se realizó *a priori*, no debe ocultarse que los objetivos 2, 3 y 4 se concretaron como tales a la luz de los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo del primer objetivo, que reforzaron la hipótesis inicial, basada en similitudes con macrólidos, de que la telitromicina poseía un interesante potencial anti-inflamatorio que debía ser explorado en modelos experimentales apropiados.

En la presentación y discusión de los resultados obtenidos, se ha seguido un diseño por capítulos que responde a la estructura de los cuatro objetivos reseñados.



3. MATERIAL Y METODOS

3.1. PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO CELULAR

3.1.1. Condiciones de cultivo de células de mamífero

El cultivo celular se llevó a cabo en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. En todo momento, tanto el material, como los reactivos y medios, que se usaron en la manipulación de los cultivos celulares estaban estériles. Para ello se usaron técnicas de esterilización como la filtración y el autoclavado, y el uso de material de laboratorio estéril desechable.

Las células fueron cultivadas en un incubador a 37°C, con 5% de tensión de CO₂, y humedad a saturación. Los cultivos se observaron diariamente, cambiando el medio cuando éste acidificaba, observándose un viraje de éste a amarillo, ya que todos los medios utilizados llevaban rojo fenol como indicador.

3.1.2. Líneas celulares

RAW 264.7 (ATCC TIB-71): se trata de una línea celular continua de macrófagos murinos, del linaje BALB/c, obtenida por transformación con el virus de la leucemia murina de Abelson (Raschke *et al.*, 1978). La línea RAW 264.7 fue amablemente cedida por el Dr. F. Gamarro (Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

Granada). Estas células tienen capacidad fagocítica y citolítica dependiente de anticuerpo; son adherentes y crecen formando monocapa.

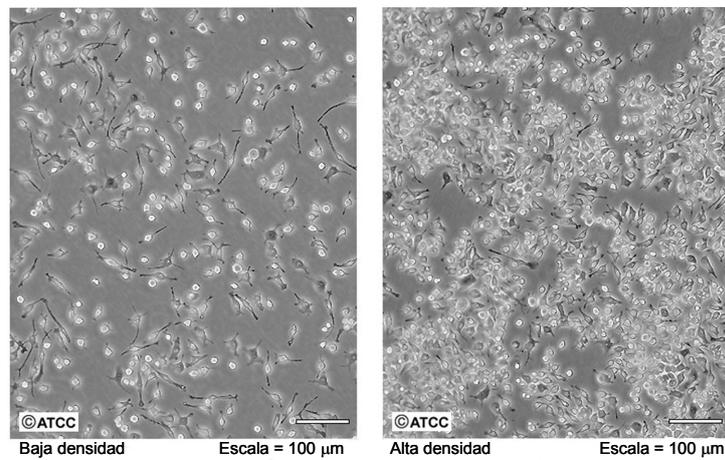


Figura 3.1. Células RAW 264.7 en baja y alta confluencia. Imagen tomada de la Colección Americana de Cultivos Tipo o ATCC (American Type Culture Collection).

JURKAT (ATCC TIB-152): línea celular humana procedente de leucemia aguda de células T (Gillis y Watson, 1980), establecida a partir de células de sangre periférica de un enfermo de 14 años de edad. Es una línea continua de cultivo en suspensión y produce IL-2 e IFN- γ tras su estimulación con distintos agentes.

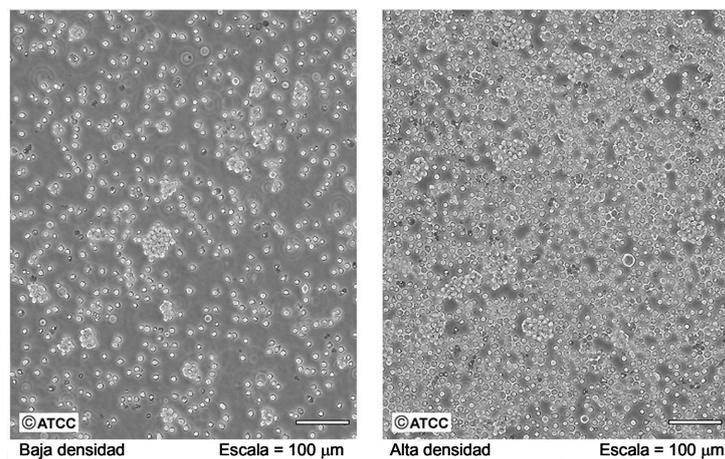


Figura 3.2. Células JURKAT en baja y alta confluencia. Imagen tomada de la ATCC.

MLE-12 (ATCC CRL-2110): línea celular continua derivada de tumor pulmonar generado en ratones transgénicos que expresan el antígeno tumoral 40 del virus SV40. Este antígeno está codificado por un oncogén viral bajo el control transcripcional de la región promotora del gen de la proteína C surfactante humana (SP-C). Esta línea posee características morfológicas y funcionales de células alveolares de tipo II, representativas del epitelio distal respiratorio (Wikenheiser *et al.*, 1993). La línea fue amablemente cedida por el Dr. S. M. Román (Hospital Marie Curie, París).

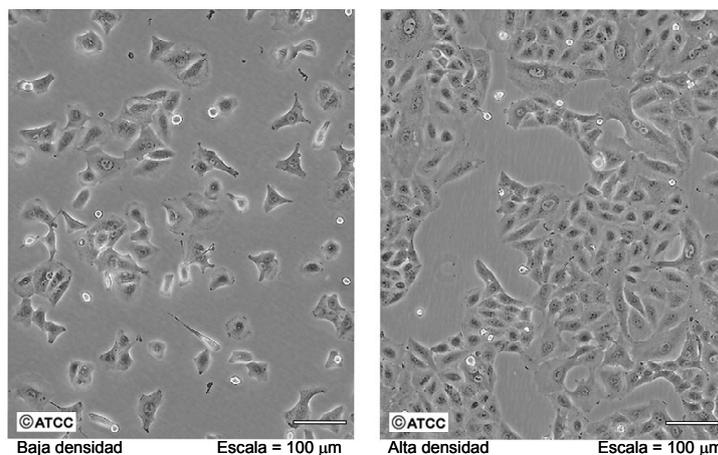


Figura 3.3. Células MLE-12 en baja y alta confluencia. Imagen tomada de la ATCC.

3.1.3. Subcultivo y expansión de líneas celulares

Las líneas adherentes fueron cultivadas hasta su confluencia y posteriormente separadas por tripsinización, procedimiento que se describe en el siguiente apartado. Una vez resuspendidas las células en medio fresco, éstas se diluyeron a una concentración aproximada de 5×10^5 células/ml y se distribuyeron en frascos de cultivo nuevos.

La línea JURKAT, que crece en suspensión, como se ha indicado anteriormente, se diluyó también a una concentración de 5×10^5 células/ml, previamente se recogió el cultivo con una pipeta desechable, y se llevó a un tubo de 50 ml para centrifugar las células a 1000 r.p.m. durante 10 min a 4°C.

Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio fresco para posteriormente llevar a cabo el recuento de células viables, y así ajustar la concentración celular.

3.1.4. Tripsinización

La tripsinización consiste en despegar las células mediante la acción de una solución de Tripsina-EDTA a 37°C (750 mg de tripsina y 200 mg de EDTA por litro de PBS, todos productos de Sigma (St Louis, MO, USA) esterilizada previamente por filtración a través de una membrana de 0,22 µm de diámetro de poro. La solución de Tripsina-EDTA se preparó extemporáneamente y se conservó a -20°C. Para un cultivo de 10 ml en frasco Falcon pequeño (25 cm²), se lavó la monocapa celular dos veces con un volumen de 1 ml de la solución Tripsina-EDTA (para eliminar los restos de FCS, que contiene inhibidores de la Tripsina) y se incubó, en posición horizontal, con 1 ml de la misma mezcla, durante menos de 5 minutos (para evitar efectos citotóxicos) a 37°C, tras lo cual se desprendió la monocapa mediante unas vigorosas sacudidas del frasco Falcon. Se añadió un volumen apropiado de medio fresco (cuyo contenido en FCS inhibe la acción de la Tripsina) y se procedió al recuento de células viables.

3.1.5. Recuento de células viables

De la suspensión celular se tomaron 50 µl que se llevaron a un tubo eppendorf conteniendo 400 µl de azul Tripán (Sigma) diluido 1:10 en solución salina estéril. De esta dilución 1:5, se tomó el volumen suficiente para llenar una cámara hemocitométrica de Neubauer y proceder al recuento de células viables (identificadas por su capacidad para excluir el colorante azul). La viabilidad de estas suspensiones fue siempre superior al 95% a la hora de realizar los distintos ensayos descritos en la presente memoria.

3.1.6. Congelación y descongelación de células

El mantenimiento de stocks de líneas celulares permite preservarlas, evitar su senescencia, reduce el riesgo de contaminación y minimiza los cambios genéticos. Para la congelación se deben usar agentes crioprotectores, como el dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), que protegen a las células durante el proceso de congelación, reduciendo el punto de congelación y permitiendo una bajada de temperatura más lenta, lo que minimiza la formación de cristales y evita el daño celular.

Para el proceso de criopreservación (o congelación de células) se prepararon suspensiones celulares en medio fresco base al 20% de FCS a una concentración de 5×10^6 células/ml. Se llevó 1 ml de la suspensión celular a un criotubo (Nalge Nunc International, Roskilde, Dinamarca) en un baño de hielo, y se adicionó gota a gota, y en frío, 0.5 ml de una solución de criopreservación (solución de DMSO al 30% en medio de cultivo base con un 20% de FCS), preparada extemporáneamente y conservada a -20°C . Una vez preparadas las alícuotas, se almacenaron en un recipiente aislante que se llevó a -20°C durante 24 h para ser almacenado finalmente en un arcón congelador a -80°C .

La descongelación se realizó con la mayor rapidez, en un baño, a 37°C e inmediatamente se diluyó la suspensión celular en 10 ml de medio de cultivo completo (el utilizado habitualmente para el cultivo de la línea celular descongelada), transfiriéndola a un frasco de cultivo celular, que se llevó a la estufa de cultivo. 24 h después se retiraron las células muertas y los restos de DMSO (es citotóxico), realizando lavados consecutivos (en el caso de las células adherentes se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células adheridas con medio fresco, y en el caso de los cultivos en suspensión se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 5 min, y se descartó el sobrenadante; en ambos casos, los respectivos procedimientos se realizaron dos veces.). Finalizados los lavados, se añadió el medio completo habitual y se inició el cultivo.

3.1.7. Obtención de suspensiones de esplenocitos

Se utilizaron ratones BALB/c hembras, adquiridos de la Unidad de Experimentación Animal de la Universidad de Granada, que fueron sacrificados por dislocación cervical. Tras aseptizar la superficie corporal con etanol de 96°, se dispusieron sobre soportes previamente aseptizados en el interior de una cabina de flujo laminar. Utilizando material quirúrgico estéril, se practicaron sucesivas incisiones en la piel y en el peritoneo para extraer el bazo, que se dispuso sobre una rejilla metálica estéril depositada en el interior de una placa Petri también estéril conteniendo ésta 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640. Se procedió a homogeneizar el bazo presionando sobre la rejilla con el extremo ancho de una jeringa de 5 ml estéril. Se dejaron decantar los restos titulares macroscópicos y se aspiró la suspensión celular con una pipeta desechable de 10 ml conectada a un dispositivo de pipeteo automático, para transferirla a un tubo de centrifuga de poliestireno de 15 ml. Las células se sedimentaron por centrifugación (10 min a 1000 r.p.m. y 5°C) (Kokusan H-103N, Eurocomercial S.A., Barcelona), desechando el sobrenadante. El sedimento celular obtenido se resuspendió en 5 ml de tampón de lisis de hematíes (Sigma) estéril manteniendo la suspensión 10 min a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 5 ml de medio para proteger a las células nucleadas de daño hipotónico. A continuación se realizó un lavado por centrifugación en las condiciones ya descritas y se resuspendieron las células en medio de cultivo estéril.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO CELULARES

Los medios base empleados fueron RPMI 1640 (Sigma) y DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma), que se suplementaron de distinta forma en función del cultivo celular y de los ensayos realizados. A continuación se describe la composición de los medios y su aplicación.

DMEM completo: Medio de cultivo para las células RAW 264.7. Este medio se suplementó como se detalla en la **Tabla 3.1**.

RPMI 1640 completo: Medio de cultivo para las células JURKAT. Este medio se preparó de la misma forma que el DMEM completo, únicamente varía, en este caso, el medio base.

RPMI 1640 completo con 5% FCS: Medio de cultivo para las células MLE-12. Este medio es igual al anterior, pero la proporción de suero fetal bovino con el que se suplementó el medio es de 5% en lugar de 10%, como en los casos anteriores.

Tabla 3.1. Suplementación del medio DMEM completo

Componente	Concentración por litro	Volumen para preparar 100 ml
L-glutamina ^a (Sigma)	2 mM	1 ml
Piruvato sódico ^b (Sigma)	1 mM	1 ml
Penicilina ^c (Sigma)	100000 U.I.	} 1 ml
Estreptomina ^c (Sigma)	100 mg	
Anfotericina B ^c (Sigma)	250 µg	
Suero fetal bovino ^d (Sigma)	90.9 ml	10 ml

^a Adquirida como una solución 200 mM.

^b Adquirida como una solución 100 mM.

^c Penicilina, estreptomina y anfotericina B se adquirieron como una única solución que contiene respectivamente 10⁴ U.I., 10 mg y 25 µg por ml.

^d El suero fetal bovino (FCS) se usó descomplementado, en éste, y en el resto de los medios de cultivo, para ello se calentó en un baño de agua a 56°C durante 30 min.

Para los distintos ensayos con telitromicina se prepararon los mismo medios descritos anteriormente, pero sin añadir la mezcla de antibiótico-antimicótico, para evitar posibles interacciones.

Para los ensayos de transfección, western-blot y apoptosis se prepararon los mismos medios variando la concentración de FCS al 1% ó 2%, y sin la mezcla de antibiótico-antimicótico.

RPMI 1640 para cultivo de esplenocitos: Medio de cultivo para la obtención y cultivo de esplenocitos, como su nombre indica. El medio se suplementó tal como se indica en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2. Suplementación del medio RPMI 1640 para esplenocitos.

Componente	Concentración por litro	Volumen para preparar 100 ml
L-glutamina	2 mM	1 ml
Piruvato sódico	1 mM	1 ml
2-mercaptoetanol ^a (Merck)	50 μ M	350 μ l ^b
Suero fetal bovino	90.9 ml	10 ml

^a Se añade 2-mercaptoetanol al medio para favorecer la proliferación de los esplenocitos.

^b Volumen a tomar de una dilución 1:1000 en PBS del producto comercial.

Los medios, preparados en una cabina de flujo laminar, se esterilizaron por filtración con presión positiva (suministrada por una bomba peristáltica) a través de membranas Millipore de 0.22 μ m de diámetro de poro. La esterilidad se comprobó manteniendo el medio a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se observaron parámetros como el color, transparencia y ausencia de sedimentos, así como cualquier alteración indicativa de crecimiento de bacterias u hongos, en cuyo caso deberá desecharse. Los medios se conservaron en el frigorífico, siendo utilizados en un plazo de tiempo inferior a 10 días, ya que la glutamina se hidroliza de forma espontánea, por lo que sufre una pérdida gradual de concentración a lo largo del tiempo. Antes de su utilización, el medio de cultivo se atemperó a 37°C en un baño de agua.

3.3. PREPARACION DEL ANTIBIÓTICO

La telitromicina fue generosamente cedida por Aventis (Neuville-sur-Saonc, Francia), y, debido a sus características físico-químicas, fue disuelta en DMSO, y posteriormente diluida en medio DMEM base para obtener las concentraciones con las que se realizaron los ensayos *in vitro* descritos en la presente memoria. La concentración final de DMSO en ningún caso superó el 0.01%, para evitar de este modo resultados erróneos debido a la toxicidad de éste agente. Además, se añadió como control el vehículo de la telitromicina a los pocillos correspondientes.

Las concentraciones a las que se trabajó fueron 10, 5 y 2.5 µg/ml, y su elección se basó en que estas concentraciones son extrapolables a las concentraciones plasmáticas alcanzadas con el antibiótico en terapia humana (Namour *et al.*, 2001).

3.4. ENSAYOS DE VIABILIDAD EN PRESENCIA DE TELITROMICINA

3.4.1. Estudio de viabilidad celular por exclusión con azul tripán

Este estudio se realizó únicamente con la línea JURKAT, ya que al tratarse de una línea en suspensión posibilita este ensayo.

Se cultivaron 10^6 células/ml en placas microtiter de poliestireno de fondo plano (Costar), a razón de 100 µl/pocillo, añadiendo telitromicina a los pocillos correspondientes (se hicieron triplicados), a una concentración final de 10 µg/ml, que es la dosis mayor empleada en todos los ensayos realizados *in vitro*. 24 h después se realizó el recuento de células viables, diluyendo las células en azul tripán (1:5), en cámaras de Neubauer. Se contaron 100 células de cada pocillo.

3.4.2. Estudio de viabilidad celular por medida de la actividad mitocondrial

Esta técnica consiste en la determinación colorimétrica de la actividad metabólica. La sal soluble de tetrazolio MTT, descrita en el apartado 3.5.3, es convertida en cristales de formazán por la actividad succinato-tetrazolio reductasa, perteneciente a la cadena respiratoria mitocondrial, la cual se activa sólo en células viables. La cantidad de cristales de formazán producidos por el cultivo celular se correlaciona directamente con el número de células viables.

Para realizar este ensayo, en las líneas celulares adherentes, se distribuyeron 100 µl de una suspensión celular, preparada en medio completo sin antibiótico, ajustada a 10^5 células/ml, en el caso de la línea RAW 264.7, o a 5×10^5 células/ml en el caso de las MLE-12, en una placa de 96 pocillos. 24 h después se añadió la telitromicina, a las concentraciones finales de 2.5, 5 y 10 µg/ml, a los pocillos correspondientes, y se volvió a incubar la placa 24 h más. Tras este periodo se añadió 5 µl por pocillo de MTT, y se incubó la placa 2 h. Transcurrida esta incubación, cada pocillo recibió 100 µl de isopropanol ácido y se siguieron los mismos pasos que en la medida de proliferación de esplenocitos en respuesta a mitógenos (apartado 3.5.3).

En la línea JURKAT se realizó el mismo ensayo con alguna modificación. Se preparó una suspensión celular en medio completo sin antibiótico, ajustada a 10^6 células/ml, distribuyéndose 100 µl/pocillo, añadiéndose posteriormente la telitromicina, a las concentraciones ensayadas, y se incubó la placa. 24 h después se procedió a medir la viabilidad de la misma forma que en el caso de las células adherentes.

Respecto a los ensayos de viabilidad de los esplenocitos murinos, se siguieron los mismos pasos que en los ensayos de proliferación celular (apartado 3.5.2 y 3.5.3) en respuesta a mitógenos, pero sin estimular las células.

3.5. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE ESPLENOCITOS MURINOS EN RESPUESTA A MITÓGENOS

El procedimiento seguido, que se describe a continuación, ha sido optimizado en nuestro laboratorio, donde se utiliza de forma rutinaria (Ruiz-Bravo *et al.*, 2001).

3.5.1. Ajuste de la suspensión

De la suspensión de esplenocitos, previamente descrita en el apartado 3.1.7, se realizó el recuento de células viables, se centrifugó en las condiciones ya descritas, y el sedimento celular se resuspendió en un volumen adecuado de medio de cultivo para obtener una concentración de 5×10^6 células viables/ml.

3.5.2. Cultivo de esplenocitos

Las células se cultivaron en placas microtiter de poliestireno de fondo plano (Costar). Se distribuyeron 100 μ l de suspensión por pocillo, de modo que cada pocillo recibió 5×10^5 células. La suspensión (procedente del pool de esplenocitos de varios ratones) se distribuyó en columnas de ocho pocillos. La primera columna sólo recibió células y se utilizó como blanco. El resto de las columnas recibieron células así como distintas concentraciones de telitromicina y/o diferentes agentes mitogénicos a razón de 10 μ l por pocillo. Se probaron dos agentes distintos, LPS (mitógeno estándar de células B) y Concanavalina A (Con A, mitógeno estándar de células T).

El LPS de *Salmonella typhi* se obtuvo de Sigma y se utilizó a una concentración final en cultivo de 2.5 μ g/ml. Del reactivo comercial liofilizado estéril se preparó una solución madre, disolviendo 1 mg del líofilo en 5 ml de medio RPMI 1640 sin suplementar (concentración de 200 μ g/ml). Esta solución se alicuotó en criotubos que se almacenaron a -20°C. En el momento de su uso, la solución se diluyó a 1:8 para añadir 10 μ l de esta dilución por pocillo.

La Con A, también de Sigma, se utilizó a la concentración final de 1 µg/ml. Del reactivo comercial liofilizado se disolvieron 5 mg en 5 ml de medio RPMI 1640 sin suplementar. Esta solución madre se distribuyó en alícuotas que se conservaron a -20°C. En el momento de realizar los cultivos, se tomaron 0.1 ml de Con A y se le añadieron 9.9 ml de medio de cultivo RPMI 1640 sin suplementar. Cada pocillo de la placa de cultivo recibió 10 µl de esta solución para obtener la concentración final deseada.

Las placas así preparadas se incubaron a 37°C, 5% de tensión de CO₂ y humedad a saturación, durante 72 h, tras lo cual se procedió a la lectura de las mismas. Un esquema de los pasos seguidos hasta este punto se presenta en la **Figura 3.4**.

3.5.3. Medida de la proliferación celular

La proliferación celular se determinó por el método colorimétrico descrito por Mosmann [1983]. Tras tres días de incubación, las placas se llevaron a la cabina de flujo laminar, donde se añadieron a cada pocillo 10 µl de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2 il)-2,5-difenil tetrazolio, compuesto designado con las siglas MTT (Sigma), al 0.5% en PBS. Se trata de un reactivo extemporáneo, que debe prepararse inmediatamente antes de su uso. La solución de MTT se esterilizó por filtración a través de membrana Millipore de 0.22 µm y se mantuvo en frío, protegida de la luz.

Las placas se reincubaron en las condiciones descritas anteriormente durante 4 h. Durante este tiempo, las células metabólicamente activas reducen el MTT a un derivado tetrazólico coloreado. Transcurrida esta incubación, cada pocillo recibió 200 µl de isopropanol ácido (0.42 ml de HCl al 35% por cada 100 ml de isopropanol), con el fin de extraer de las células el colorante reducido. Se aspiró y expelió varias veces el contenido de cada pocillo, para solubilizar completamente los cristales del colorante reducido. La densidad óptica de los cultivos se determinó en un lector de microELISA (Behring EL 311), previamente programado para leer absorbancias a 570 nm y 630 nm de

referencia. Para los cultivos de cada bazo, se usaron como blanco los ocho pocillos de la columna reservada para ello, que no recibieron antibiótico ni estímulo mitogénico. Los resultados se expresaron como la media aritmética de las densidades ópticas de los ocho pocillos de cada columna destinada a un determinado mitógeno.

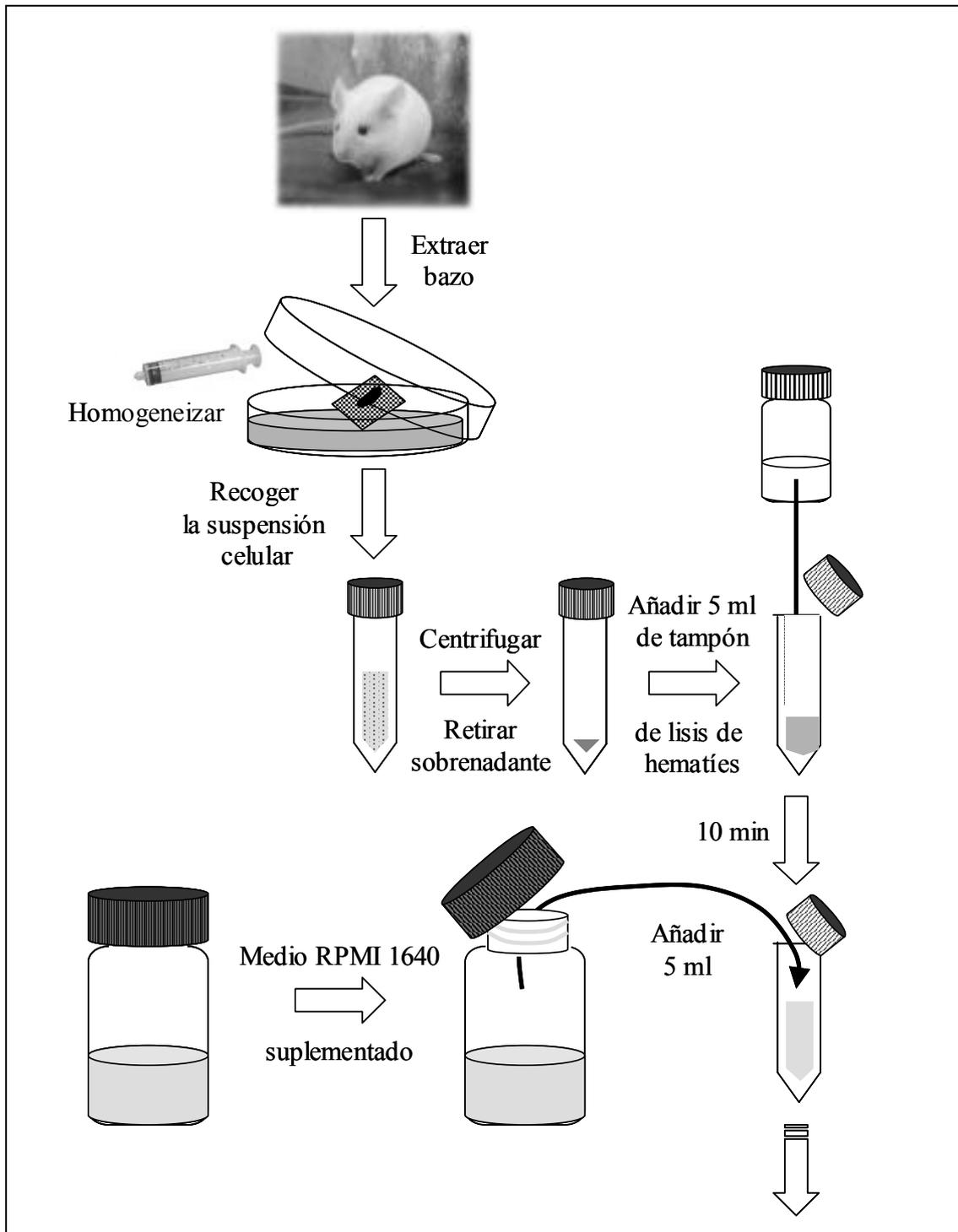


Figura 3.4. Proliferación de esplenocitos en respuesta a mitógenos.

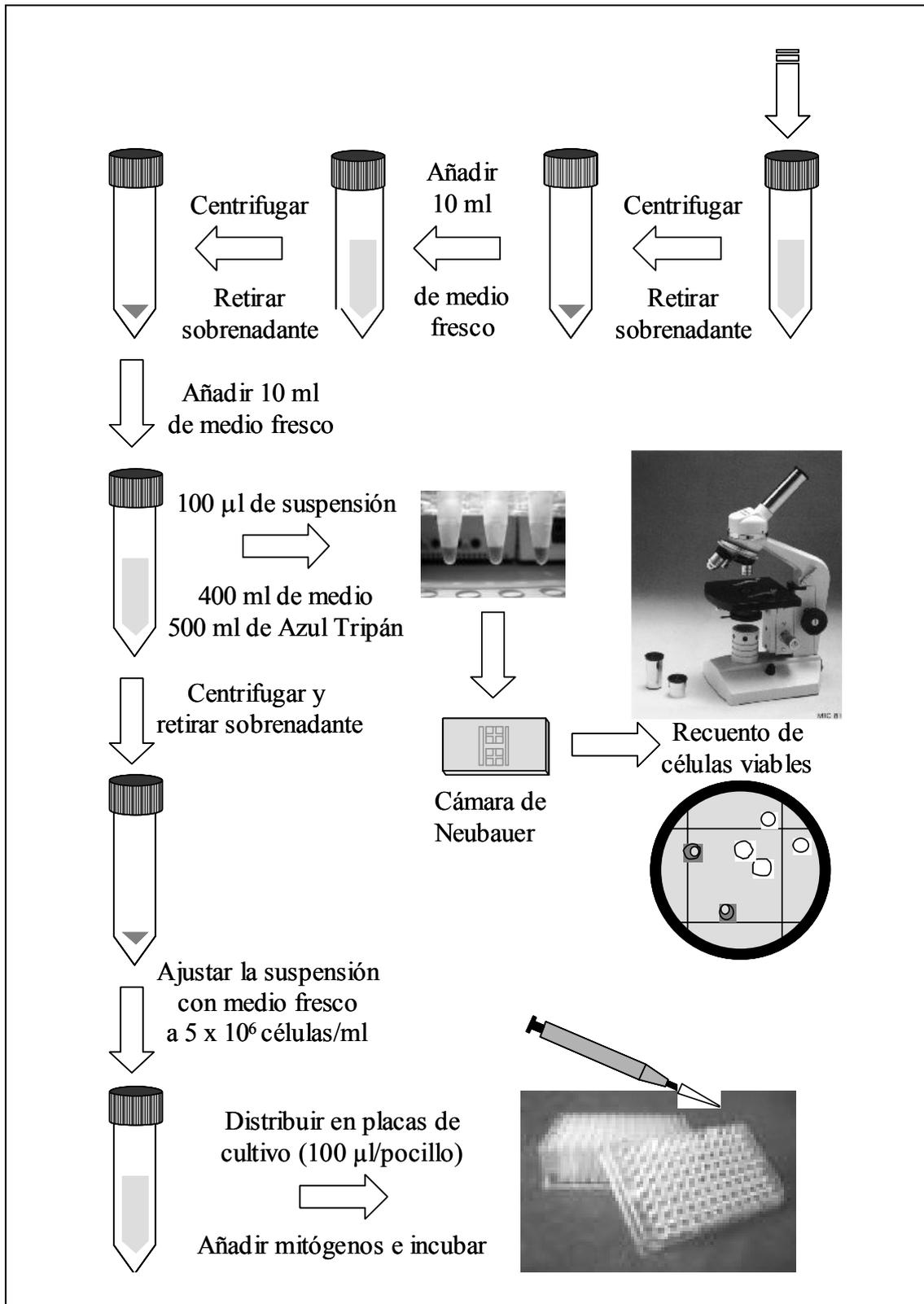


Figura 3.1. (Continuación)

3.6. PRODUCCIÓN DE CITOKINAS IN VITRO

3.6.1. Producción de citokinas por células RAW 264.7

Las células RAW 264.7 fueron cultivadas en DMEM completo sin antibiótico en placas de poliestireno de 24 pocillos (Costar) a una concentración de 5×10^5 células/ml, a razón de 1 ml por pocillo. 24 h después, tras comprobar que las células estaban 95-100% confluentes, las células fueron tratadas con 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de telitromicina 1 h antes de ser estimuladas con LPS de *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma) a la concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$. El tiempo de estimulación varió en función de la citokina a determinar. Para TNF- α se realizaron ensayos a 6 y 24 h post-estimulación, para MIP-2 a 24 h, y para la determinación de IL-10 se realizaron ensayos a 24 y 72 h. Para este último ensayo se cultivó inicialmente 2.5×10^5 células/ml, debido a la velocidad de crecimiento de ésta línea. Se realizaron triplicados de cada muestra en todos los ensayos realizados. El diseño de la placa se muestra, a continuación, en la **Figura 3.5**.

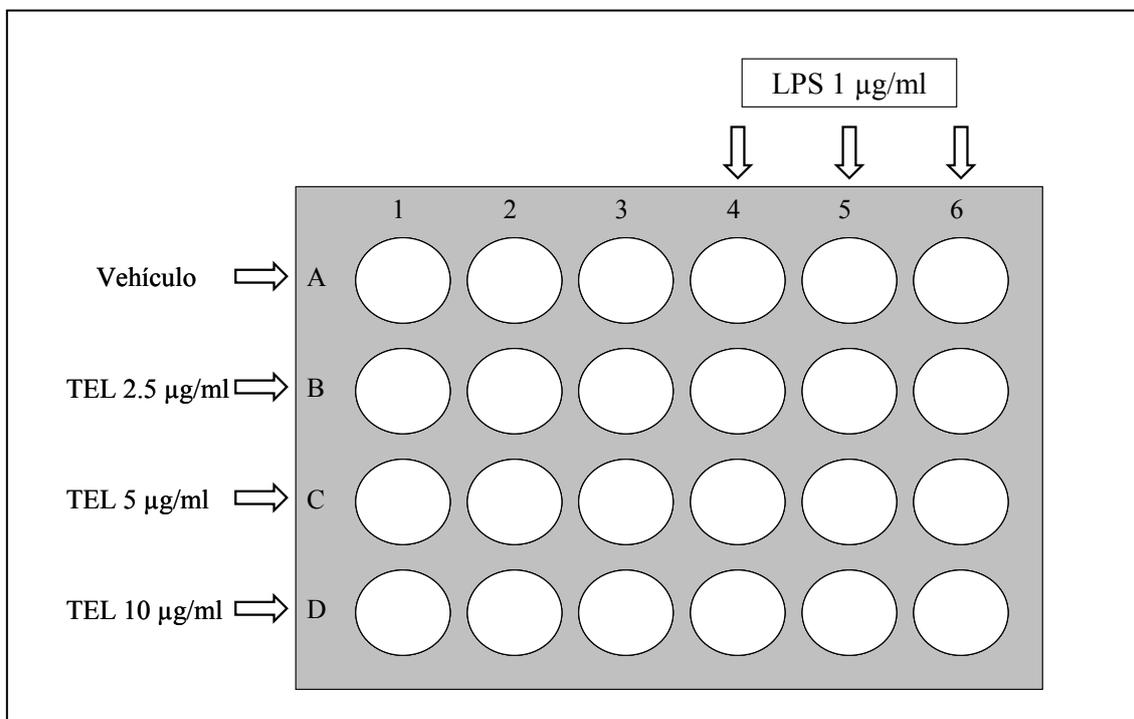


Figura 3.5. Diseño de la placa para los ensayos de producción de citokinas por células RAW 264.7.

El LPS de *Escherichia coli* O55:B5 se disolvió en solución salina al 0.9% estéril a una concentración de 1 mg/ml. De esta solución se prepararon alícuotas en criotubos de que se almacenaron a -20°C. En el momento de su uso, se realizaron las diluciones apropiadas, para obtener finalmente la concentración final deseada.

3.6.2. Producción de citokinas por células MLE-12

La línea MLE-12 fue cultivada en RPMI 1640 completo al 5% FCS sin antibiótico, en placas de 24 pocillos, a una densidad de 10^6 células/ml, a razón de 500 μ l por pocillo. 24 h después, estando las células 95-100% confluentes, se retiró el medio y se añadieron 250 μ l de DMEM completo sin antibiótico a cada pocillo, se añadió la telitromicina a una concentración final de 10 μ g/ml, y se incubó la placa durante 1 h, tras lo cual se procedió a estimular la línea epitelial con sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7 estimuladas con LPS durante 24 h, cuya concentración de TNF- α fue de 750 pg/ml. Se añadieron 250 μ l por pocillo, quedando éstos diluidos 1:2 en el medio fresco añadido 1 h antes. A los pocillos control se añadió el mismo volumen de sobrenadantes de RAW 264.7 sin estimular. Aunque experimentos previos demostraron que las células MLE-12 no producen MIP-2 en respuesta a LPS, para asegurar la ausencia de cualquier efecto provocado por los residuos del LPS empleado para estimular la línea macrofágica, se añadió a los sobrenadantes polimixina B (Sigma) para neutralizarlo, a una concentración final de 10 μ g/ml. Se incubaron las células durante 24 h, y se recogieron los sobrenadantes para la posterior determinación de MIP-2. En la **Figura 3.6** se presenta un esquema del proceso.

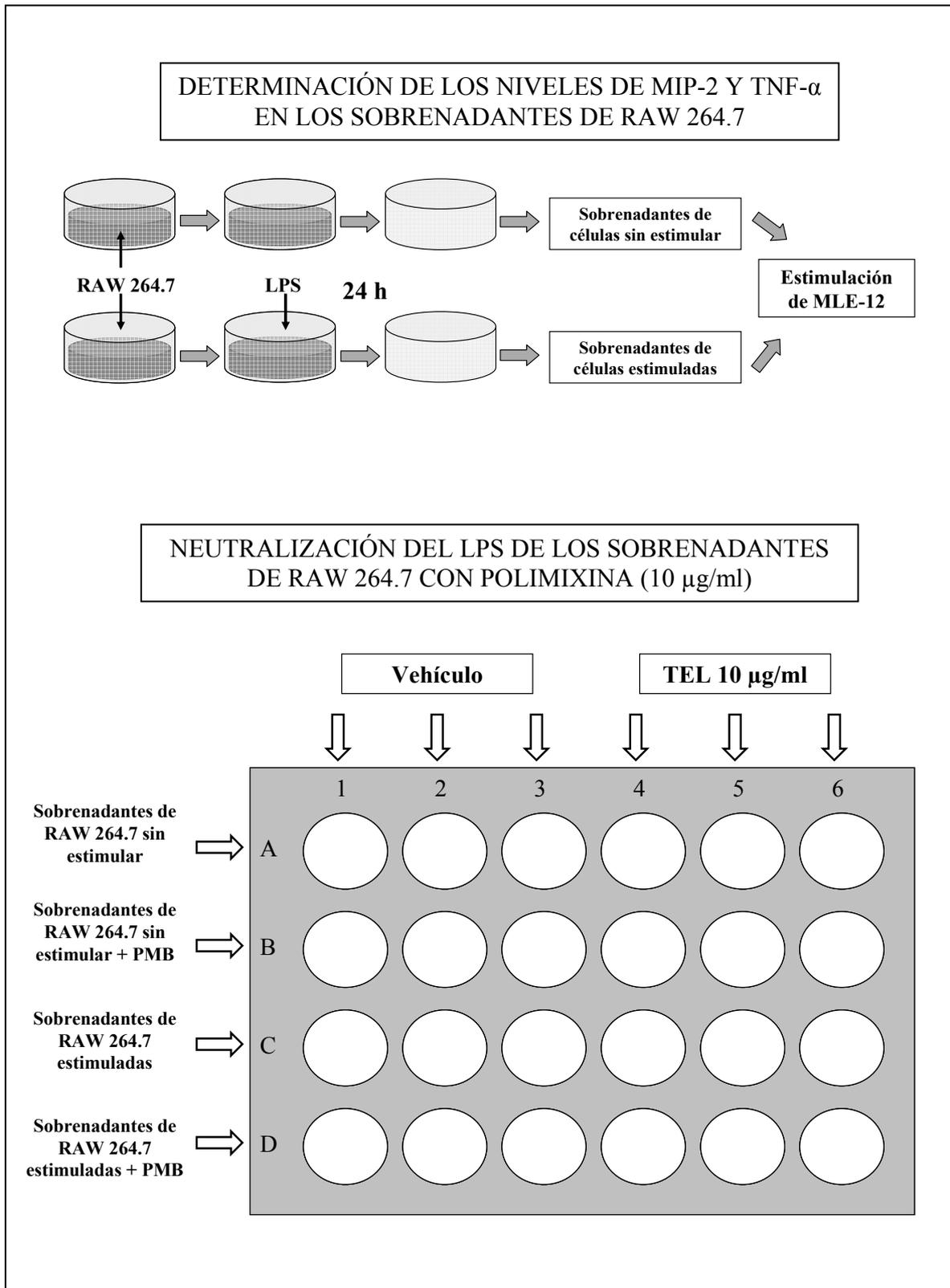


Figura 3.6. Procedimiento para la obtención de sobrenadantes de células MLE-12 estimuladas con sobrenadantes de células RAW 264.7.

3.6.3. Producción de citokinas por esplenocitos murinos

Los esplenocitos recién obtenidos como se describió en 3.1.7 se cultivaron en placas de 24 pocillos, a una concentración de 5×10^6 células por pocillo en RPMI 1640 para el cultivo de esplenocitos, y fueron pretratados con telitromicina de la misma forma que las líneas celulares, y estimulados con LPS ($2.5 \mu\text{g/ml}$) o Con A ($1 \mu\text{g/ml}$), haciendo duplicados de cada muestra. Los tiempos de incubación de los esplenocitos fueron de 24 h para la determinación de IL-2 y de 72 h para la determinación de IFN- γ e IL-10. El diseño de placa se muestra en la **Figura 3.7**.

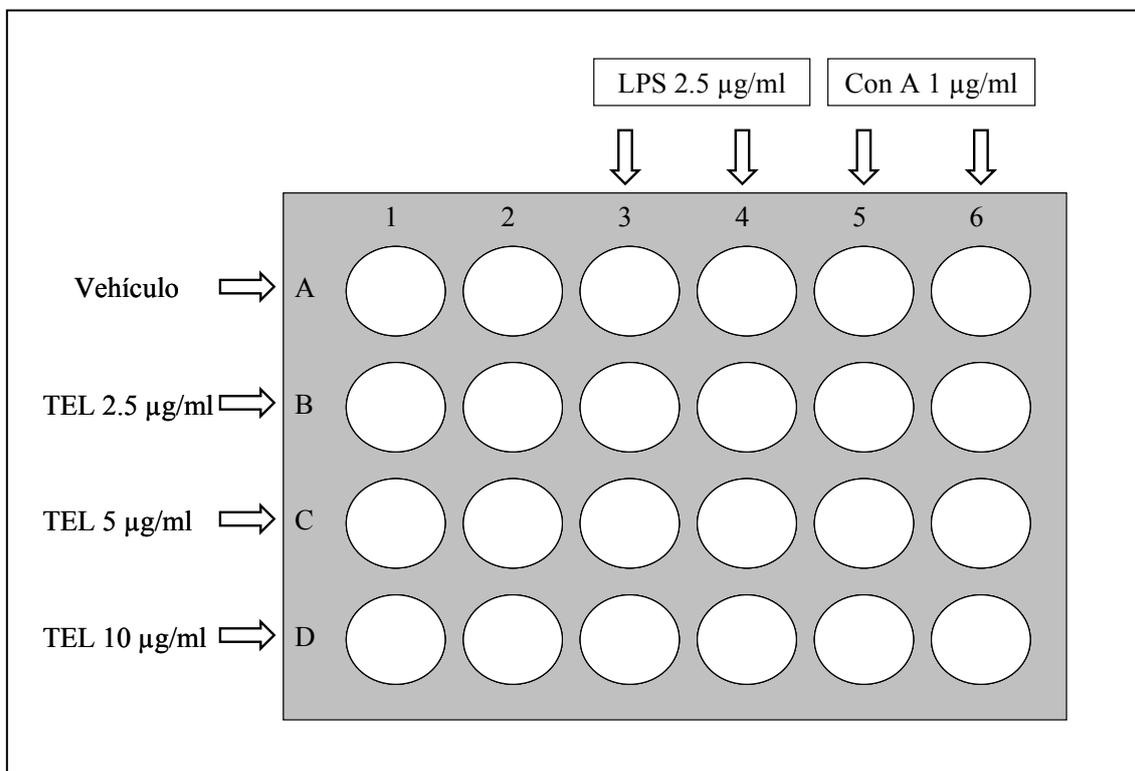


Figura 3.7. Diseño de placa para los ensayos de producción de citokinas por esplenocitos murinos.

3.6.4. Determinación de citokinas en sobrenadantes de cultivo

En todos los casos, finalizado el tiempo de estimulación, se recogieron los sobrenadantes de cultivo cuidadosamente, procurando no arrastrar células, y se centrifugaron en una microfuga (Centrifuge Eppendorf 5415R) para descartar restos celulares. Los sobrenadantes se recogieron en criotubos y se conservaron a -20°C hasta la cuantificación de citokinas, que se realizó mediante enzimo-inmunoensayos (ELISA) comerciales, todos adquiridos a Endogen (Woburn, MA), excepto MIP-2, que fue suministrado por R&D Systems (Minneapolis, MN). Las concentraciones problema se determinaron, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, por interpolación en la recta de calibrado obtenida a partir de las densidades ópticas correspondientes a estándares de concentraciones conocidas, suministradas por la casa comercial.

3.7. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN SOBRENADANTES DE RAW 264.7

Una forma indirecta de medir NO (óxido nítrico), índice de la actividad óxido nítrico sintasa, es mediante la cuantificación de uno de sus metabolitos estables, los nitritos. Este ensayo se basa en una reacción de diazotización descrita por primera vez por Griess en 1879 a partir de sulfanilamida y naftiletilendiamina, en condiciones ácidas, que da lugar a un compuesto azóxico coloreado.

El procedimiento ha sido adaptado al ensayo en placas microtiter (Green *et al.*, 1982). Se usaron placas de 96 pocillos, en las que se distribuyeron, por triplicado, 100 μl de sobrenadantes de células RAW 264.7 estimuladas o no durante 24 h con LPS a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$, 1 h después del pre-tratamiento con telitromicina o con el vehículo, previamente descrito en el apartado 3.6.1. Una vez dispuestas las muestras se añadió el mismo volumen de reactivo de Griess (Sigma), y se incubó la placa durante 15 min a temperatura ambiente. Tras la incubación se leyó la absorbancia de las

muestras en el lector de placas microELISA a 550 nm. Las concentraciones de nitritos se determinaron por interpolación en una recta de calibrado preparada a partir de una solución madre 10 mM de nitrito sódico (NaNO_2) en medio DMEM completo sin antibiótico. El reactivo de Griess utilizado se reconstituyó siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y detecta un rango de concentraciones de 0.43 a 65 μM .

3.8. TRANSFECCIÓN

La transfección de células es el proceso mediante el cual se introduce DNA en la célula a través de métodos físicos o químicos. Ésta puede ser transitoria, cuando el DNA persiste en la célula durante un corto periodo y no se integra en el genoma celular, o estable, si el DNA extraño se integra en el genoma de la célula hospedadora.

Las técnicas de transfección están dirigidas al estudio de la expresión génica eucariota y su regulación, y pueden clasificarse en:

- Métodos químicos: basados en la formación de complejos que las células sean capaces de adquirir e incorporar, bien sea directamente mediante la ruta endocítica (fosfato cálcico, DEAE dextrano) o a las membranas (lipofección).
- Métodos físicos: basados en la introducción mecánica de las moléculas en el interior de la célula. Dentro de éste grupo se engloban las técnicas de microinyección directa y electroporación.

La eficiencia de la transfección, el mecanismo de entrada de los ácidos nucleicos, la reproducibilidad, la citotoxicidad, y la comodidad de uso diferencian esta variedad de técnicas disponibles.

En nuestro caso empleamos la técnica de lipofección, dirigida al estudio de la acción de la telitromicina en la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, y del gen del TNF- α , para lo cual se transfectaron células con los plásmidos descritos a continuación.

3.8.1. Plásmidos

Los plásmidos que se transfectaron son construcciones de DNA recombinante en la que se situó la secuencia codificante de un gen “reporter”, bajo la secuencia de regulación objeto de estudio, permitiendo medir tasas de expresión génica en diferentes situaciones experimentales.

Todos los vectores “reporter” fueron amablemente suministrados por el Dr. S. Roman-Roman (Prostrakan Pharmaceuticals, Romainville, France), y se describen a continuación:

- pNF- κ B: vector que codifica para el enzima luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*), y que se encuentra bajo el control de un elemento de respuesta que se activa con la forma activa de NF- κ B.
- pAP-1: codifica para el mismo enzima pero se encuentra bajo el control de un elemento de respuesta a AP-1.
- pTNF- α : al igual que los dos vectores anteriores codifica para el mismo enzima luciferasa, que se encuentra bajo el control del promotor TNF- α .

El enzima luciferasa de luciérnaga es una proteína monomérica de 61 kDa, que no requiere modificaciones post-translacionales para su actividad. Por esta razón el enzima puede funcionar como “reporter” inmediatamente una vez finalizada la translación, lo que es un requisito indispensable para funcionar como gen “reporter”.

Para normalizar la eficiencia de la transfección se utilizó como control interno el vector “reporter” pRL-TK (Promega, Madison, WI, USA) que codifica el enzima luciferasa de *Renilla*, clonado del organismo marino *Renilla reniformis*. Este vector contiene el promotor de la timidina-kinasa del virus del herpes simplex (HSV-TK) que da lugar a niveles bajos y constitutivos de expresión de la luciferasa de *Renilla* en células de mamífero co-transfectadas. La luciferasa de *Renilla* es una proteína monomérica de 36kDa que, al igual que la luciferasa de luciérnaga, no requiere modificaciones post-translacionales para su actividad.

3.8.2. Transformación, amplificación, extracción, y purificación del DNA plasmídico

Transformación

La técnica utilizada, por ser la más eficaz para la transformación de *Escherichia coli* fue la electroporación, que consiste, básicamente, en introducir DNA en el interior de las bacterias a través de una descarga eléctrica. Para ello se utilizaron 50 µl de *E. coli* de la cepa XL1-Blue competentes, amablemente cedidas por la Dra. I. Llamas (Departamento de Microbiología, Universidad de Granada) que fueron mezcladas con el plásmido a amplificar, diluido éste en agua bidestilada y estéril. La mezcla se introdujo dentro de la cubeta de electroporación (Electroporador 2510, Eppendorf) y se sometió a un pulso eléctrico de 2500 voltios a 16-19 kV/cm². Las bacterias fueron recogidas añadiendo directamente a la mezcla un ml de medio LB (Medio Luria Bertani; Difco) a 37°C. Las bacterias transformadas se incubaron durante 1 h a 37°C en un agitador orbital con agitación suave (100 r.p.m.) para favorecer su recuperación tras la electroporación. Pasado ese tiempo se sembró una alícuota bacteriana en una placa de LB agar (LB con 2% de agar) con ampicilina (100µg/ml) (Sigma), ya que el plásmido introducido contiene un gen de resistencia a éste antibiótico, tras lo cual la introdujimos en una estufa a 37°C 24 h. Tras la incubación, se observó la placa, y las colonias crecidas en ésta fueron las transformadas.

Amplificación plasmídica

Para la amplificación del plásmido se picó una colonia de un cultivo fresco de la bacteria transformada y se inoculó en 5 ml de medio LB con ampicilina, que se incubó aproximadamente 8 h a 37°C en agitación (200 r.p.m.). Tras la incubación se inoculó 250 µl del cultivo inicial en 250 ml de medio LB con ampicilina y se dejó crecer en agitación (200 r.p.m) a 37°C durante 16 h aproximadamente. La masa bacteriana obtenida se recogió centrifugando a 6000 x g durante 15 min a 4°C.

Extracción y purificación plasmídica

La extracción y purificación plasmídica se llevó a cabo utilizando el kit Endofree Plasmid Maxi (Qiagen, Izasa, Barcelona), que se basa en un procedimiento de lisis alcalina bacteriana, seguido por la unión plasmídica a una resina de intercambio aniónico bajo condiciones apropiadas de pH y baja concentración de sal. El RNA, las proteínas, y las impurezas de bajo peso molecular se retiraron tras un lavado con una concentración intermedia de sales. El DNA plasmídico se eluyó en un tampón con alta concentración de sales, tras lo cual se concentró y desaló mediante un proceso de precipitación con isopropanol. Este kit permite obtener DNA plasmídico libre de contaminación por endotoxina, ya que incorpora un tampón especial para evitar que las moléculas de LPS se unan a las resinas de purificación, contaminando así el DNA plasmídico. En nuestro caso, este hecho tiene mucha importancia ya que una vez transfectado cualquiera de los plásmidos utilizados a la línea de macrófagos RAW 264.7, la endotoxina causaría la activación de respuestas inmunes no específicas; además, uno de los estimulantes que utilizamos fue LPS, y si las células han tenido contacto previo con esta molécula (que se daría en el caso hipotético de transfectar DNA plasmídico contaminado) al estimular posteriormente con ella, no responderían de forma adecuada; ambas situaciones nos hubieran llevado a resultados experimentales erróneos en los experimentos de transfección. Finalizados los procesos de extracción y

purificación, se determinó la concentración obtenida de cada plásmido en un biofotómetro midiendo la absorbancia de cada muestra a 260 nm. Además, se determinó la pureza de cada plásmido, midiendo la absorbancia a 280 nm, ya que la relación de las absorbancias obtenidas a 260 nm/280 nm permite conocer la ausencia o no de contaminación proteica (un ratio menor a 1,7 indica contaminación por proteínas). También se comprobó la pureza mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.8.3. Ensayos de transfección: lipofección.

Los ensayos de transfección se realizaron con el método de la lipofección, que se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y DNA. La elección se basó en que éste método proporciona una alta eficiencia de transfección en un amplio rango celular, es fácil de llevar a cabo, y proporciona resultados reproducibles, además minimiza otros inconvenientes asociados a la transfección como la toxicidad celular.

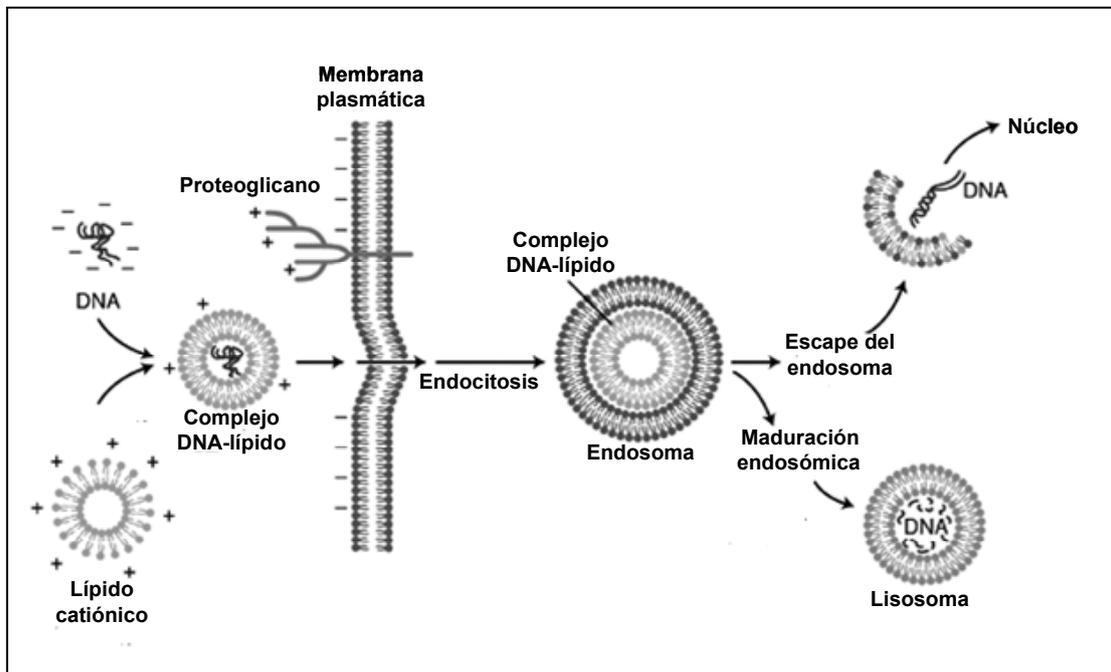


Figura 3.8. Proceso de lipofección.

Los reactivos lipídicos catiónicos forman pequeños (100-200 nm) liposomas unilamelares cuando se formulan en agua en óptimas condiciones. La superficie de estos liposomas, está cargada positivamente, y es atraída electroestáticamente por los grupos fosfato del DNA, al igual que a la superficie de la membrana celular cargada negativamente. La solución de DNA no es encapsulada dentro del liposoma, sino que la carga negativa del DNA se une espontáneamente a la carga positiva del lípido formando complejos DNA-lípido catiónico. Aproximadamente, de 2 a 4 liposomas se asocian con un único plásmido de aproximadamente 5 kb. Así, el DNA capturado se dirige a las células cultivadas. Existen evidencias de que el mecanismo de entrada del DNA se da a través de lisosomas o endosomas (**Figura 3.8**).

Es esencial optimizar las condiciones específicas de transfección para obtener buenas eficiencias, que suelen ser en buenas condiciones de entre el 70 y el 90% de las células de la placa. No todos los lípidos funcionan en todos los tipos celulares, además, hay que optimizar el ensayo para cada tipo celular. Los parámetros a optimizar son la relación entre lípido y DNA (relación de cargas), la cantidad de DNA empleado (resulta tóxico a partir de determinadas cantidades), así como el ratio entre varios vectores, en el caso de que se realicen ensayos de co-transfección (pueden existir interferencias entre los elementos promotores, originando resultados erróneos), el tiempo que se exponen las células al complejo y la presencia o ausencia de suero (ambos parámetros influyen en la viabilidad celular). A continuación se describen las condiciones de transfección empleadas, tras experimentos previos que posibilitaron la puesta a punto de los ensayos:

- Ratio DNA total (μg)-lipofectamina (μl): para las líneas RAW 264.7 y MLE-12 fue de 1:2. Para la línea JURKAT el ratio fue de 1:3.
- Ratio DNA problema-DNA control: 20:1 para todas las líneas celulares (la alta sensibilidad del kit para medir la actividad luciferasa posibilita añadir pequeñas cantidades del vector control).

- μg DNA empleado: la concentración final de DNA en el medio fue de 1 μg por pocillo en placas de 24, y de 0.2 μg en placas de 96.
- Tiempo de exposición al complejo DNA-lípido: 18-20 h.
- Concentración de FCS en el medio: 2%.

Una vez optimizados los parámetros se realizaron los ensayos de transfección siguiendo los protocolos descritos en el apartado 3.8.4.

3.8.4. Transfección en placas de 24 pocillos

Condiciones de cultivo celular

Células adherentes: las células fueron cultivadas a una densidad de 10^5 células/pocillo en 1 ml de medio DMEM completo sin antibiótico. 24 h después, cuando las células alcanzaron un 60-70% de confluencia, se cambió en medio añadiendo 500 μl de DMEM sin antibiótico al 2% de FCS y se añadió la mezcla transfectante.

Células en suspensión: previamente a la preparación y posterior adición de la mezcla transfectante, se cultivaron las células a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en 500 μl de DMEM sin antibiótico al 2% de FCS.

Mezcla transfectante

Preparación de la mezcla transfectante (por pocillo):

1. Se diluyó 1 μg de DNA (DNA problema + DNA control) en 50 μl de Opti-MEM I (Gifco, Invitrogen, Izasa, Barcelona) sin suero y se mezcló.

2. Se diluyó 2 ó 3 μl (en función del ratio) de Lipofectamina2000 (Invitrogen, Izasa, Barcelona) en 50 μl de Opti-MEM sin suero y se mezcló. Se incubó 5 min a temperatura ambiente.
3. Se mezcló el DNA diluido con la Lipofectamina2000 diluída (50 μl + 50 μl) y se incubó 20 min a temperatura ambiente para dar lugar a la formación de los complejos Lipofectamina-DNA.

Se añadió 100 μl de la mezcla transfectante a cada pocillo, agitando suavemente para conseguir una distribución homogénea de los complejos, y se incubó la placa a 37°C al 5% de CO₂ durante 18-20 h.

Ensayos post-transfección

En el caso de las líneas adherentes se volvió a cambiar el medio a DMEM sin antibiótico al 2% FCS tras la incubación. 10-12 h después se cambió el medio a DMEM sin antibiótico al 1% FCS, incubándose la placa 12 h más antes de tratar las células con telitromicina, y estimularlas 1 h después con LPS o PMA (Sigma) (100 ng/ml), en el caso de las RAW 264.7, o con sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7, en el caso de las MLE-12, del mismo modo que se realizó en el apartado 3.6.1., y 3.6.2.

Respecto a la línea JURKAT, se recogió de cada pocillo la suspensión celular y se hizo un pool de células que se centrifugó a 1000 r.p.m. 5 min, se descartó el sobrenadante, se resuspendió en DMEM sin antibiótico al 2% FCS, se realizó el recuento de viables y se ajustó la concentración celular a 5×10^5 células/ml, añadiendo en una placa estéril de 24 pocillos 1 ml por pocillo. La nueva placa se incubó 24 h tras lo cual se procedió al pre-tratamiento con telitromicina, y a la estimulación con Con A a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ o con una disolución de PMA (Sigma) a 2 $\mu\text{g/ml}$ y Ionomicina (Sigma) a 0.5 μM durante 24 h.

3.8.5. Transfección en placas de 96 pocillos

Este ensayo sólo se realizó en líneas adherentes.

Condiciones de cultivo celular

Las células fueron cultivadas a una densidad de $2-3 \times 10^4$ células/pocillo en 200 μ l de medio DMEM completo sin antibiótico. 24 h se transfectó siguiendo el mismo procedimiento que en el ensayo para placas de 24 pocillos pero ajustando los volúmenes a la placa de 96.

Mezcla transfectante

Preparación de la mezcla transfectante (por pocillo):

1. Se diluyó 0.2 μ g de DNA en 10 μ l de Opti-MEM I sin suero y se mezcló.
2. Se diluyó 0.4 μ l de Lipofectamina2000 en 10 μ l de Opti-MEM sin suero, se mezcló, y se incubó 5 min a temperatura ambiente.
3. Se mezcló el DNA diluído con la Lipofectamina2000 diluida (50 μ l + 50 μ l) y se incubó 20 min a temperatura ambiente para dar lugar a la formación de los complejos Lipofectamina-DNA.

Los tiempos de incubación y ensayos post-transfección fueron los mismos que en los ensayos en placas de 24 pocillos.

3.8.6. Medida de la actividad luciferasa

La actividad luciferasa de las células transfectadas se determinó en un luminómetro (Lumat LB 9587; Biogen Científica SL, Madrid) utilizando el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Este sistema permite medir la actividad luciferasa de luciérnaga y de *Renilla* secuencialmente de una misma muestra. La actividad luciferasa de luciérnaga se determina primero añadiendo un reactivo que lleva Luciferina, que por la acción del enzima se oxida dando lugar a Oxiluciferina, AMP, PP_i, CO₂ y luz, siendo ésta una señal luminiscente estable. Tras cuantificar la señal luminiscente emitida por la luciferasa de luciérnaga, la reacción se bloquea con otro reactivo, que lleva Coelenterazina, que a su vez va a servir para iniciar la reacción de la luciferasa de *Renilla*, ya que este enzima va a actuar sobre esta molécula originando Coelenteramida, CO₂ y luz, siendo esta señal luminosa también estable, que decae lentamente con el paso del tiempo.

Debido a sus distintos orígenes evolutivos, la luciferasa de luciérnaga y la de *Renilla* tienen distintas estructuras y utilizan distintos substratos. Estas diferencias hacen posible discriminar de forma selectiva entre sus respectivas reacciones de bioluminiscencia. El kit utilizado permite bloquear la reacción de la luciferasa de luciérnaga, una vez medida, mientras se activa simultáneamente la reacción de luminiscencia de la luciferasa de la *Renilla*.

3.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B Y JNK1/2 EN EXTRACTOS CELULARES TOTALES POR WESTERN BLOT.

3.9.1. Obtención de muestras

Obtención del lisado celular

Las células se cultivaron a una densidad de 10^6 células/ml en placas de 6 pocillos en DMEM sin antibiótico al 10% de FCS. 24 h después se cambió el medio añadiendo DMEM sin antibiótico al 1% de FCS y se incubó la placa 18 h más. Tras este periodo de incubación se añadió la telitromicina a las concentraciones finales de 2.5, 5 y 10 μ g/ml, el diluyente del antibiótico, o el inhibidor específico de la kinasa JKN1/2 SP600125 (Sigma) a la concentración final de 25 μ M (este último únicamente en el caso de los western-blots para fosfo JNK1/2), se incubó durante 1 h más y se estimularon las células con LPS de *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma) a una concentración final de 1 μ g/ml durante 15 min o 1 h para determinar la activación de JNK1/2 o NF- κ B, respectivamente. Una vez finalizado el periodo de estimulación, las células fueron lavadas con PBS estéril, y lisadas con 200 μ l del reactivo de extracción de proteínas totales M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent suplementado con el cocktail inhibidor de proteasas Halt Protease Inhibitor Cocktail (Pierce, Rockford, IL) siguiendo el procedimiento descrito por el protocolo de la casa comercial, manteniendo en todo momento las muestras a 0°C.

Determinación de la concentración de proteínas. Método del ácido bicinconínico

Para la determinación de la concentración de proteínas se usó el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985), sal sódica capaz de formar un complejo púrpura intenso con el catión cuproso Cu^+ , formado a partir de la reducción, mediada por proteínas, del catión cúprico Cu^{2+} en medio alcalino. El

complejo formado por 2 moléculas de BCA con un catión cuproso presenta un máximo de absorbancia a 560 nm, permitiendo de este modo la cuantificación espectrofotométrica de proteínas en solución acuosa.

Para realizar el ensayo se empleó una solución de albúmina bovina sérica (BSA), suministrada por Sigma, en solución salina al 0.9% estéril, preparada en agua bidestilada, de la que se realizaron diluciones 1:2 consecutivas que se utilizaron como estándares. A 200 μ l de las diluciones estándar y al mismo volumen de las muestras problema (lisado celular) diluida 1:100, se les añadió 200 μ l de la solución de trabajo, preparada a partir de un kit suministrado por Pierce, siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y se incubó a 60° C durante 1 h, tras lo cual se procedió a medir la absorbancia a 560 nm.

El aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de proteínas de cada muestra, así, según los valores de absorbancia de los estándares, se construyó una curva patrón que fue empleada para interpolar las concentraciones de las muestras problema. Se realizaron triplicados de los estándares y de las muestras para llevar a cabo este ensayo.

3.9.2. Western blot

Cada muestra del lisado celular se llevó a ebullición diluyendo éstas en tampón de muestra (200 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% dodecil sulfato sódico, 20% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, y 0.1% azul de bromofenol) 1:2 durante 10 minutos, tras lo cual se llevó a un baño de hielo durante 5 min. Este proceso se repitió una vez más.

Se cargaron 20 μ g de proteínas de cada muestra, y 3 μ l del marcador de peso molecular Chemiluminiscent BlueRanger (Pierce) en un gel de poliacrilamida al 12% y se separaron en la célula de electroforesis Bio-Rad Mini-PROTEAN II (Bio-Rad Laboratories, Barcelona) durante 45 min a 150V. El tampón de electroforesis utilizado fue Tris-HEPES-SDS (Pierce).

Una vez separadas las proteínas se procedió a la electro-transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa (Pierce) durante 90 min a 40 V y a 4°C aproximadamente. El tampón de transferencia utilizado fue BupH Tris-Glicine Transfer Buffer (Pierce) con un 20% de metanol.

Finalizada la electro-transferencia se bloqueó la membrana en tampón Tris-salino (pH 7.6) al 0.1% Tween-20 y 5% leche desnatada, en agitación, durante 1 h a temperatura ambiente. Terminado el bloqueo se lavó la membrana 3 veces, durante 5 minutos en tampón Tris-salino al 0.1% Tween-20, y se incubó toda la noche y en agitación en el tampón de dilución del anticuerpo primario (Tris-salino al 0.1% de Tween-20 y 5% de albúmina sérica bovina). Los anticuerpos primarios utilizados fueron el monoclonal de conejo anti-fosfo NF- κ B p65 (Ser536) (Cell Signaling Technology, MA), que reconoce la subunidad p65 de la forma activada de NF- κ B cuando está fosforilada en la Serina 536, y se incubó con la membrana a 4°C, y el monoclonal de conejo anti-fosfo JNK1/2 amablemente cedido por la Dra. M. Comalada (Departamento de Farmacología, Universidad de Granada), que se incubó a temperatura ambiente. Ambos anticuerpos se utilizaron a una dilución 1:1000. Después de lavar 5 veces, durante 3 min con tampón Tris-salino al 0.1% de Tween-20, se incubó la membrana durante 1 h, en agitación, y a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulina G de conejo, marcado con fosfatasa alcalina para anti-fosfo NF- κ B p65, o con peroxidasa en el caso de anti-fosfo JNK1/2, diluido 1:2000 en el tampón de bloqueo. Posteriormente se lavó 5 veces, durante 5 min con tampón Tris-salino al 0.1% Tween-20. Las bandas inmunoreactivas se revelaron con un kit de detección en membrana de fosfatasa alcalina (Sigma), basado en la reacción de la fosfatasa alcalina con la mezcla de bromo-cloro-indol fosfato y nitro-azul tetrazolio, originando un producto azul púrpúreo en el caso del western-blot para NF- κ B. La membrana del western-blot para JNK1/2 se reveló por luminiscencia utilizando un substrato quimioluminiscente de la peroxidasa (ECL; Amersham Biosciences Europe GMBH, GE Healthcare, Sevilla). Una vez reveladas, las membranas fueron escaneadas y el perfil densitométrico de cada banda fue analizada con el programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD).

3.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B EN EXTRACTOS NUCLEARES POR ELISA

3.10.1. Obtención de muestras

Extractos nucleares

Las células se cultivaron a una densidad de 10^6 células/ml en placas de 60 mm de diámetro tratadas para cultivo celular (Costar) siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 3.9.1. Una vez alcanzada la confluencia se cambió el medio, añadiendo DMEM sin antibiótico al 1% de FCS y se incubó la placa 18 h más. Tras este periodo de incubación se añadió la telitromicina a las concentraciones finales de 2.5, 5 y 10 μ g/ml, o el diluyente del antibiótico, se incubó durante 12 h más y se estimularon las células con LPS de *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma) a una concentración final de 1 μ g/ml durante 1 ó 9 h. Una vez finalizado el periodo de estimulación, se procedió a la extracción de las proteínas nucleares siguiendo las instrucciones del kit Nuclear Extract Kit (Active Motif, Bélgica), que utiliza un tampón hipotónico para fragilizar la membrana plasmática celular y un detergente para romperla, permitiendo la separación del contenido citoplasmático y del núcleo.

Determinación de la concentración de proteínas nucleares. Método de Bradford

La cuantificación de las proteínas nucleares se realizó empleando el método de Bradford debido a que el tampón en el que se obtienen las proteínas interfiere con el método del BCA, descrito en el apartado 3.9.1.

El método de Bradford se basa en la unión del colorante Comassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante, en solución ácida existe en dos formas, una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

La concentración de proteínas de cada muestra se obtuvo interpolando en la curva patrón obtenida a partir de los estándares de albúmina, realizados del mismo modo que en el apartado 3.9.1.

3.10.2. ELISA para NF- κ B p65

Para la determinación y la cuantificación relativa de la activación de NF- κ B en los extractos celulares nucleares se empleó el kit TransAMTM NF- κ B p65 (Active Motif), que consiste en un ELISA colorimétrico sensibilizado con el oligonucleótido que contiene la secuencia consenso de unión de p65 (5'-GGGACTTTCC-3'). Este ensayo es específico para la activación de NF- κ B, y es más sensible y rápido que el EMSA (Electrophoretic mobility shift assay), siendo 0.4 ng el límite de detección de p65.

3.11. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS

La medida de apoptosis se realizó con el kit de Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), que permite hacer una determinación cuali- y cuantitativa *in vitro* de fragmentos de DNA asociados a histonas (mono- y oligonucleosomas) en el citoplasma celular, generados durante la fragmentación del DNA en células apoptóticas. Este kit posee una alta sensibilidad y está preparado para determinar apoptosis en 10^4 células, motivo por el cual se realizaron las diluciones descritas en cada ensayo.

Se siguió el procedimiento descrito por la casa comercial que a continuación se resume:

- El citoplasma de un número apropiado de células es lisado con un tampón de lisis que deja los núcleos de éstas intacto.

- Tras la centrifugación del lisado a 5000 r.p.m. durante 10 min (éste paso se modificó del protocolo de la casa comercial para asegurarnos de que ningún fragmento de DNA asociado a histonas de alto peso molecular queda en el sobrenadante) obtenemos la fracción citoplasmática en el sobrenadante.
- La fracción citoplasmática se transfiere a una placa sensibilizada con estreptavidina, se añade a ésta la mezcla inmunorreactiva que contiene un anticuerpo anti-histona marcado con biotina, y un anticuerpo anti-DNA marcado con peroxidasa y se incuba. Durante la incubación el anticuerpo anti-histona se une a la histona, componente del nucleosoma, y simultáneamente captura la estreptavidina de la placa sensibilizada a través de la biotina. Por otro lado, el anticuerpo anti-DNA marcado con peroxidasa reacciona con el DNA, que forma parte del nucleosoma.
- Tras los lavados correspondientes se determina la cantidad de nucleosomas en la fracción citoplasmática de cada muestra a partir de la peroxidasa, que forma parte del inmunocomplejo, añadiendo para ello un sustrato, que bajo la acción del enzima da lugar a un producto coloreado que se mide espectrofotométricamente.

3.11.1. Determinación de apoptosis en células RAW 264.7. inducida con LPS o camptotecina

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células por pocillo en DMEM al 10% FCS sin antibiótico. 24 h después se cambió el medio a DMEM al 1% FCS sin antibiótico y se pre-trataron con telitromicina (10 $\mu\text{g/ml}$) una hora antes de estimularlas con LPS (5 $\mu\text{g/ml}$). 24 h después se procedió a la determinación de apoptosis, siguiendo las instrucciones del kit. Una vez lisadas las células, el lisado resultante se diluyó 1/10 en buffer de lisis, y se siguieron las instrucciones del kit.

Se realizó el mismo procedimiento anterior pero las células se estimularon 5 horas con camptotecina (CAM), en lugar de LPS, a una concentración final de 2 μ M.

3.11.2. Determinación de apoptosis en células MLE-12 inducida con sobrenadantes de RAW 264.7 estimuladas o camptotecina

Con la línea MLE-12 se siguió el mismo procedimiento que con la línea RAW 264.7 pero en lugar de estimularlas con LPS fueron estimuladas por sobrenadantes de células RAW 264.7 estimuladas con LPS durante 24 h.

3.11.3. Determinación de apoptosis inducida por camptotecina en esplenocitos murinos activados

Se cultivaron los esplenocitos (obtenidos del modo ya descrito en el apartado 3.1.7.) en RPMI 1640 para el cultivo de esplenocitos a una concentración de 5×10^6 células/ml, distribuyendo 1 ml por pocillo en placas de 24 pocillos. Se activaron los esplenocitos durante 48 h añadiendo los mitógenos (LPS y Con A a una concentración final de 5 μ g/ml y 3 μ g/ml respectivamente). Tras la incubación se realizó el pre-tratamiento con telitromicina, y una hora después se añadió la CAM a una concentración de 10 μ g/ml, la placa se incubó 6 horas más, y se procedió a realizar una dilución 1:20 de cada pocillo en PBS, y de cada dilución se tomaron 100 μ l que se llevaron a un eppendorf con 400 μ l de PBS para centrifugar las células. Los eppendorf se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se procedió al lisado de la membrana celular siguiendo las instrucciones del kit.

3.12. INDUCCIÓN DE SHOCK SÉPTICO

3.12.1. Animales

Se emplearon ratones BALB/c, hembras, de 8 a 12 semanas de edad y de 18 a 22 g de peso procedentes de la Unidad de Animales de Experimentación pertenecientes al Centro de Instrumentación de la Universidad de Granada. Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos, con libre acceso a pienso estándar (Dieta AO4, Panlab, Barcelona) y agua estériles. Los procedimientos experimentales contaron con la aprobación de la Comisión de Ética de la Universidad de Granada. Los Directores de la Tesis cuentan con la calificación legal para el diseño, dirección y ejecución de investigaciones con animales de experimentación, y la doctoranda posee la acreditación de formación en la categoría B para llevar a cabo procedimientos con animales con fines científicos según el Real Decreto 1202/2005 de 10 de Octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

3.12.2. Dosis empleadas

Las dosis de LPS (*Escherichia coli* O26:B6, Sigma) ensayadas, tras experimentos previos, fueron 25 mg y 50 mg por kg de peso, correspondientes a la dosis capaz de matar al 50% de los ratones inyectados (DL₅₀), y a la dosis capaz de matar al 100% de los ratones (DL₁₀₀), respectivamente. El LPS se diluyó en PBS estéril a una concentración de 2 mg/ml, y cada ratón, tras determinar su peso corporal, fue inyectado con esta solución por vía intraperitoneal con jeringas estériles de 1 ml.

Para estudiar el efecto de la telitromicina en nuestro modelo de endotoxemia, los ratones correspondientes recibieron una única dosis de 20 mg de antibiótico por kg de peso por vía intraperitoneal, 1 h antes de recibir la inyección de LPS. La dosis seleccionada es comparable a las usadas en terapia humana. Se

preparó una suspensión de telitromicina en PBS a una concentración de 1 mg/ml. La suspensión fue sonicada durante 10 min (Ultrasons, J. P. Selecta S.A., Barcelona) para conseguir una suspensión totalmente homogénea, y se administró el antibiótico a cada ratón en función de su peso.

3.12.3. Diseño experimental

Los animales se dispusieron, de manera aleatoria en 6 grupos de 13 ratones cada uno (**Figura 3.9**):

Grupo CONTROL: únicamente recibieron PBS.

Grupo TEL: recibieron una dosis de telitromicina, y 1 h después PBS.

Grupo LPS DL₅₀: recibieron la DL₅₀ de LPS, y 1 h antes se les inyectó el volumen de PBS correspondiente al de la dosis de telitromicina.

Grupo LPS DL₅₀ + TEL: recibieron la DL₅₀ de LPS, y 1 hora antes la dosis de telitromicina.

Grupo LPS DL₁₀₀: recibieron la DL₁₀₀ de LPS, y 1 h antes se les inyectó el volumen de PBS correspondiente al de la dosis de telitromicina.

Grupo LPS DL₁₀₀ + TEL: recibieron la DL₁₀₀ de LPS, y 1 hora antes la dosis de telitromicina.

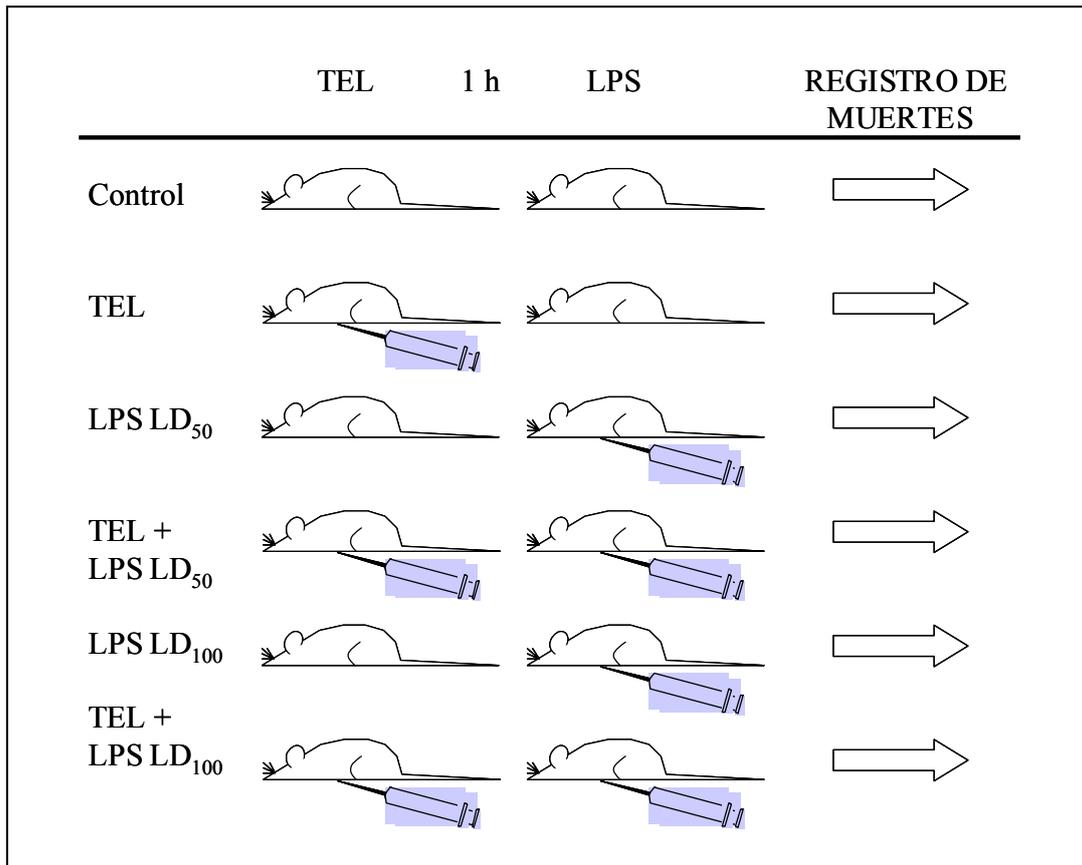


Figura 3.9. Esquema de los grupos experimentales en el ensayo de shock séptico. No se incluyen los animales destinados a suministrar muestras de sangre a las 2 h y 8 h después de la inyección de LPS.

3.12.4. Obtención de muestras

2 h y 8 h después de la inyección, se extrajo sangre a 5 animales de cada grupo empleando una pipeta Pasteur heparinizada que se introdujo en el seno venoso retro-orbital. Las muestras obtenidas se recogieron en tubos eppendorf con heparina y se centrifugaron a 8000 r.p.m. durante 5 min. Los sobrenadantes se recogieron con una pipeta Pasteur preparando 2 alícuotas de cada muestra, una para determinar los niveles de nitritos en plasma, y otra para congelarla a -20°C , en la que se llevó a cabo posteriormente la determinación de citocinas.

3.12.5. Ensayo de supervivencia

Tras la inducción de shock séptico, los ratones (8 de cada grupo) fueron observados diariamente durante una semana para hacer un registro de las muertes, y determinar así la tasa de supervivencia de cada grupo.

3.12.6. Determinación de la producción de óxido nítrico en plasma

Las concentraciones de nitritos se determinaron con el reactivo de Griess. Para ello se distribuyeron 100 µl de cada muestra de plasma, diluida 1:4 en solución salina estéril, en placas de 96 pocillos, y se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.7. La curva patrón, en este caso, se realizó a partir de una solución madre de nitrito sódico diluida en muestras de plasma de ratones testigos.

3.12.7. Determinación de citokinas

Los niveles de las citokinas TNF- α , IL-1, e IL-10 en las muestras de plasma se cuantificaron mediante enzimoimmunoensayo (ELISA) comercial (Endogen). Las concentraciones problema se determinaron por interpolación en la recta de calibrado obtenida a partir de las densidades ópticas correspondientes a estándares de concentraciones conocidas, suministradas por la casa comercial y de acuerdo con las instrucciones del fabricante, tal como se ha descrito en el apartado 3.6.4.

3.13. INDUCCIÓN DE INFLAMACIÓN RESPIRATORIA AGUDA

3.13.1. Dosis empleadas

La dosis de telitromicina utilizada fue la misma que en el ensayo de protección frente al shock séptico (20 mg/kg de peso), y también se administró 1 h antes que la inducción de inflamación respiratoria.

El LPS se disolvió en solución salina estéril a una concentración final de 500 µg/ml, dosis seleccionada tras experimentos previos, y se administró a los ratones vía respiratoria a través de un aerosol.

3.13.2. Diseño experimental

Para estudiar el efecto de la telitromicina, los ratones recibieron una única dosis de telitromicina, o del vehículo (PBS, 0.5 ml), por vía intraperitoneal, 1 h antes de ser nebulizados con LPS. Los animales se dispusieron, de manera aleatoria en 4 grupos de 8 ratones cada uno (**Figura 3.10**):

Grupo CONTROL: únicamente recibieron PBS.

Grupo TEL: recibieron una dosis de telitromicina, y 1 h después PBS.

Grupo LPS: fueron nebulizados con LPS, y 1 h antes se les inyectó el volumen de PBS correspondiente al de la dosis de telitromicina.

Grupo LPS + TEL: fueron nebulizados con LPS, y 1 hora antes recibieron la dosis de telitromicina.

Los ratones fueron expuestos durante 20 min a un aerosol de LPS usando una cámara cilíndrica de 22 cm de largo y 12 cm de diámetro) directamente conectada a un nebulizador (Miko, CA-MI s.n.c. Italy) que produce partículas

del rango de 1 a 5 μm , con un flujo de aire de 7 l/min. Ensayos previos demostraron que la dosis utilizada de LPS indujo inflamación respiratoria en estas condiciones experimentales.

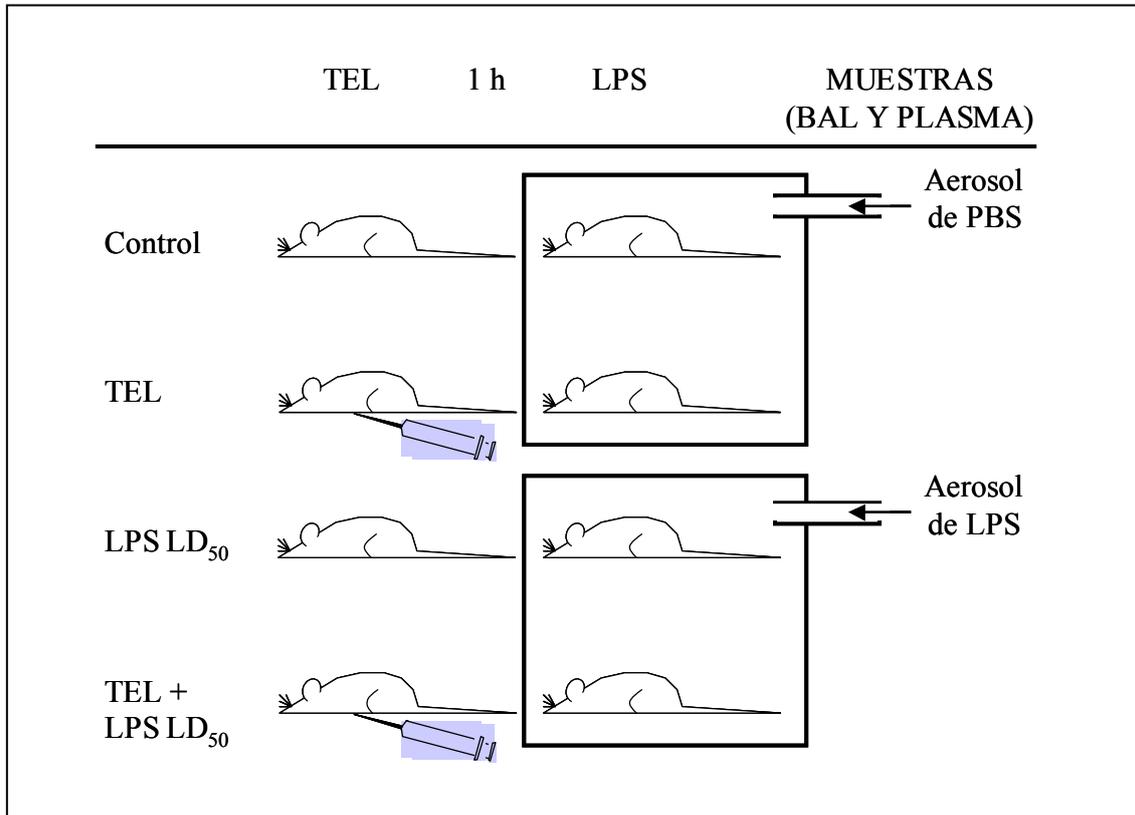


Figura 3.10. Esquema los grupos experimentales en el ensayo de inflamación respiratoria aguda.

3.13.3. Lavado broncoalveolar (BAL)

4 y 24 h post-nebulización, se extrajeron muestras de sangre mediante sangrado retro-orbital, que se procesaron para la posterior determinación de citocinas. Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se les practicó una incisión media para dejar la tráquea expuesta, se lavó con PBS para limpiar la zona, y se obliteró parcialmente en la parte superior con un hilo de sutura para facilitar el lavado (**Figura 3.11**). Se inyectó, lentamente, un volumen de 0.8 ml de PBS estéril con una jeringa de 1 ml, procediendo a

continuación a aspirar el líquido de lavado. Por término medio, se recuperó de cada ratón 0.7 ml de BAL aproximadamente. El BAL de cada ratón fue centrifugado a 1000 r.p.m. a 4°C, y los sobrenadantes se recogieron en criotubos correctamente identificados y se conservaron a -70°C para posteriormente realizar la determinación de citokinas, nitritos y proteínas. Los pellets celulares fueron resuspendidos en PBS para realizar el recuento de células viables (mediante exclusión por azul tripán), preparar frotis en portaobjetos desengrasados, y preparar las muestras para citometría.

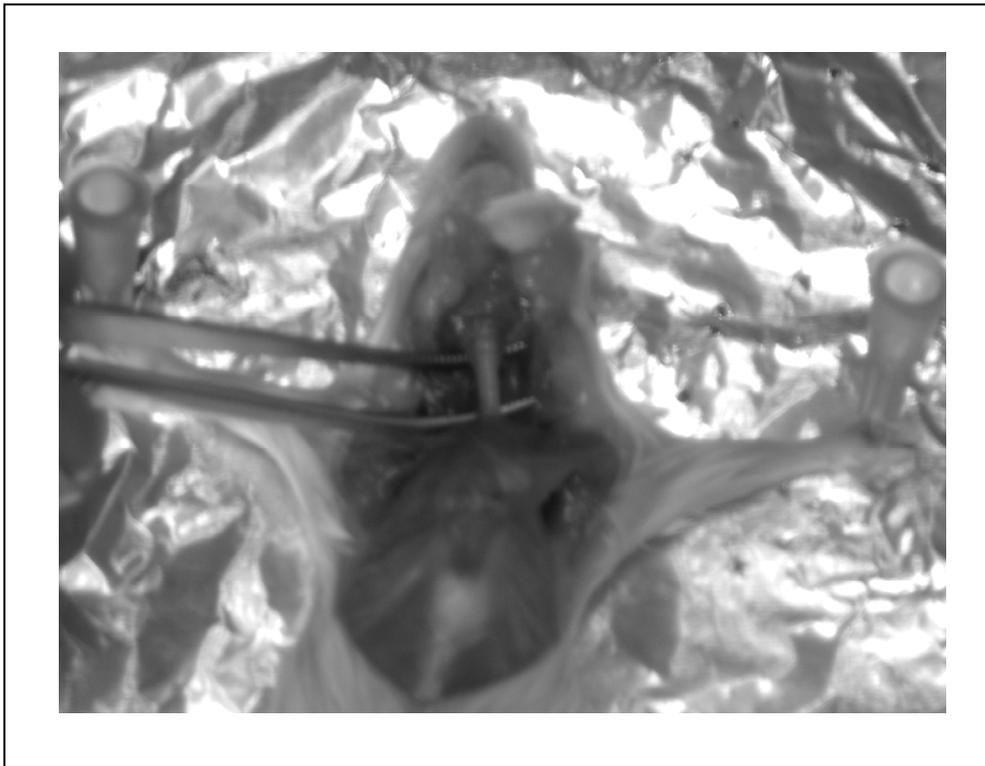


Figura 3.11. Preparación de la tráquea para el lavado broncoalveolar.

3.13.4. Determinación de citokinas

Los niveles de las citokinas TNF- α , e IL-10, y de la quimiokina MIP-2 en muestras de plasma y BAL se cuantificaron con kits de ELISA comercial, como se ha descrito anteriormente (apartado 3.6.4).

3.13.5. Determinación de la producción de óxido nítrico en BAL

Las concentraciones de nitritos se determinaron con el reactivo de Griess. Para ello se distribuyeron 100 µl de cada muestra de BAL siguiendo los mismos pasos descritos en el apartado 3.7. La recta de calibrado en este caso, se preparó a partir de una solución de nitrito sódico preparada en agua bidestilada estéril.

3.13.6. Determinación del contenido de proteínas. Método del ácido bicinconínico

Para la determinación de la concentración de proteínas se usó el método del ácido bicinconínico (BCA), descrito en el apartado 3.9.1.

En este caso se diluyeron las muestras de BAL 1:100 en solución salina al 0.9% estéril, preparada en agua bidestilada, y se procedió a la realización del ensayo.

3.13.7. Preparación de frotis celulares

Con el objeto de evaluar la infiltración de PMN neutrófilos en los pulmones se realizó una tinción de las células presentes en el BAL utilizando un kit para tinción rápida en hematología (Panreac Quimica SA, Barcelona) compuesto por un fijador, eosina, y azul de metileno. Este sistema tiñe los núcleos de los leucocitos de color azul-violeta, lo que facilita su identificación y recuento.

Para preparar los frotis se resuspendieron 10^4 células en 50 µl de FCS y se realizó la extensión de cada muestra en un porta-objetos. Una vez seca la muestra se siguió el procedimiento descrito por las instrucciones del kit, y una vez seca la tinción se realizó el recuento en el microscopio, contando 200 células en cada preparación. Además algunas de las preparaciones se fotografiaron, como se muestra en el apartado de resultados.

3.13.8. Citometría de flujo

La citometría de flujo consiste en la medida de características físicas y/o químicas de las células u otras partículas subcelulares mientras se hacen pasar en un fluido, de una en una, en el aparato de medida. Una de las aplicaciones de esta técnica consiste en el análisis de poblaciones celulares mediante la tinción de éstas con anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos. Las células, una vez marcadas, atraviesan una a una un fino capilar alcanzando un campo de detección atravesado por un potente rayo láser que produce la dispersión de la luz y la activación de la fluorescencia. La señal producida como consecuencia de la excitación del fluorocromo, recogida por un detector, nos permitirá conocer el porcentaje de células reconocido por el anticuerpo monoclonal empleado. En nuestro caso aplicamos esta técnica para conocer los porcentajes poblacionales de granulocitos y macrófagos, a través del marcaje de antígenos de superficie propios de éstas células, en BAL de ratones de nuestro modelo de inflamación respiratoria.

Anticuerpos para citometría en BAL

Para identificar la población de macrófagos se utilizó un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD14, conjugado con R-ficoeritrina (BD Pharmingen). El antígeno de superficie CD-14 interviene en el reconocimiento del LPS, y es específico de monocitos y macrófagos.

Para identificar la población de granulocitos (neutrófilos y eosinófilos) se utilizó un anticuerpo monoclonal de rata anti-Ly-6G y anti-Ly-6C (Gr-1), conjugado con Fluoresceína Isotiocianato (FITC) (BD Pharmingen). El antígeno Gr-1 es una molécula de diferenciación mieloide, directamente relacionada con la diferenciación y maduración de granulocitos.

Identificación de las poblaciones de macrófagos y granulocitos en BAL

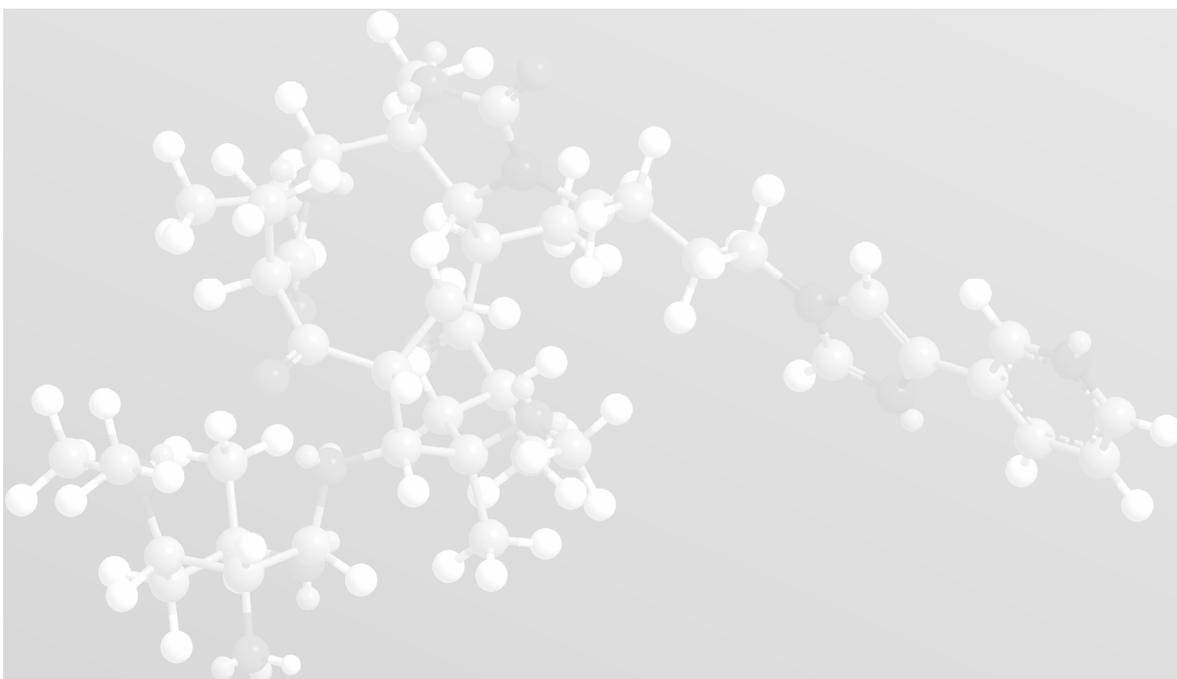
El análisis de la expresión de antígenos de superficie se llevó a cabo utilizando 10^5 células procedentes del BAL de cada ratón, las cuales fueron lavadas dos veces en PBS y resuspendidas en 50 μ l de PBS con 1% de BSA. Cada muestra recibió 1 μ g de cada anticuerpo, siguiendo las indicaciones del proveedor, y se incubaron a 4°C, en oscuridad, durante 1 h. Posteriormente añadió a cada tubo 1 ml de PBS con 1% de BSA en frío, y se centrifugó en una microfuga a 2000 r.p.m. durante 3 min. A continuación se descartó el sobrenadante y se lavaron las células dos veces con 1 ml de PBS, para resuspender finalmente en 0.5 ml de PBS con 2% de formaldehído, para fijar las células, ya que el análisis no se realizó de forma inmediata, y se guardaron a 4°C en oscuridad.

La medición de las muestras se realizó en el Servicio de Instrumentación de la Universidad de Granada. Se utilizó un citómetro de flujo FACS Vantaje (Becton Dickinson), serie C0005, equipado con dos cabezas de láser (láser dual Coherente Enterprise 621 a 488 nm y 351-364 nm (UV), y láser rojo visible Spectra Physics a 630 nm), y un software de adquisición y análisis CELL Quest (Becton Dickinson). Se determinaron 10^4 células por muestra.

3.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significación estadística de las diferencias entre los grupos de medidas se determinó mediante la prueba de la *t* de Student. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos.

Para el estudio estadístico de los ensayos de supervivencia descritos en el apartado 3.12.5. se empleó el test de Kaplan Meier para comparar las tasas de mortalidad entre los distintos grupos.



4. RESULTADOS Y DISCUSION I

**Modificación *in vitro* de la respuesta de
esplenocitos y de líneas celulares
inmunitarias**

4.1. Efecto de TEL en la proliferación de esplenocitos murinos en respuesta a mitógenos.

Cuando se examinó la proliferación de esplenocitos cultivados 72 h en presencia de mitógenos, se observaron incrementos moderados pero significativos de la respuesta al LPS en cultivos pre-tratados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de TEL, y de la respuesta a Con A en cultivos pre-tratados con 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de TEL (Figura 4.1).

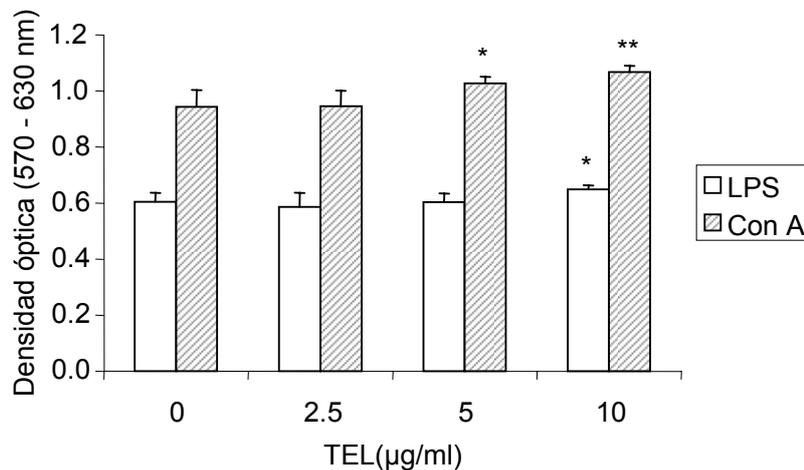


Figura 4.1. Efecto de TEL en la proliferación de esplenocitos murinos en respuesta a LPS y Con A. Los esplenocitos fueron incubados sin TEL y con 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de TEL 1 h antes de la adición de los mitógenos. Los resultados son las medias aritméticas de los datos obtenidos en 8 cultivos. Las líneas representan la desviación estándar de las medias. Cada grupo de cultivos con TEL fueron comparados con el respectivo grupo sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$).

4.2. Efecto de TEL en la apoptosis de esplenocitos inducida por CAM.

En experimentos previos se estableció que TEL no modificaba la apoptosis en esplenocitos estimulados con mitógenos (datos no mostrados), lo cual era previsible ya que tampoco se observaron diferencias en la viabilidad de cultivos de esplenocitos incubados con o sin TEL. Sin embargo, nos planteamos estudiar si TEL tenía alguna acción en la apoptosis inducida por un agente clásico como CAM, que actúa sobre células en estado de proliferación, ya que es un inhibidor de la topoisomerasa I. Para ello se indujo apoptosis con CAM durante 5 h a esplenocitos estimulados durante 48 h con LPS y Con A. Previamente a la inducción de apoptosis, las células fueron tratadas o no con TEL. El pre-tratamiento con TEL (10 µg/ml), 1 h antes de la inducción de la apoptosis, incrementó 1.42 veces la actividad apoptótica inducida por CAM en esplenocitos estimulados con LPS ($P < 0.0001$), y 1.3 veces la inducida por CAM en esplenocitos estimulados con Con A ($P < 0.05$) (Figura 4.2).

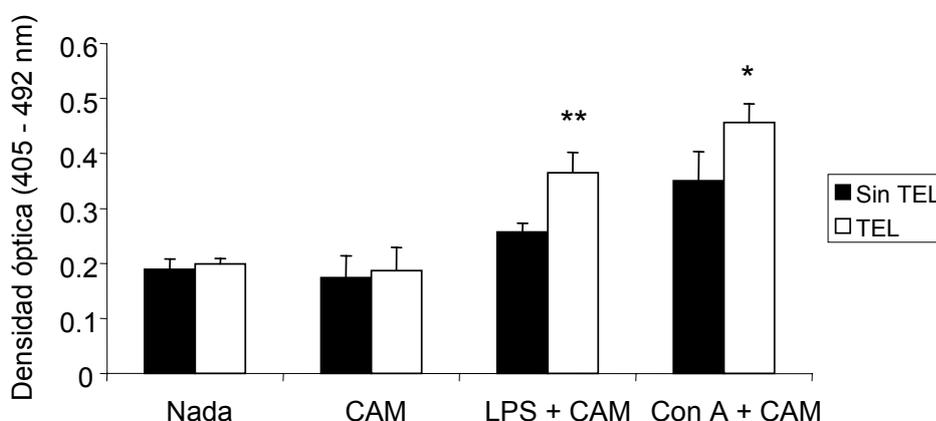


Figura 4.2. Efecto de TEL en la apoptosis inducida por CAM en esplenocitos proliferando en respuesta a mitógenos. Los mono- y oligonucleosomas generados durante la apoptosis celular fueron cuantificados con un inmunoensayo comercial descrito en el apartado 3.11 de Material y Métodos. Los esplenocitos fueron estimulados con los mitógenos LPS o Con A durante 48 h. Tras la incubación las células fueron pre-tratadas o no con 2.5, 5 y 10 µg/ml de TEL 1 h antes de la inducción de apoptosis con CAM durante 5 h. Los resultados son las medias de los datos procedentes de tres cultivos. Se representan las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos pre-tratados con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.05$; ** $P < 0.0001$).

4.3. Efecto de TEL en la producción de citocinas por esplenocitos murinos en respuesta a mitógenos.

Los efectos de TEL en los esplenocitos estimulados con mitógenos se muestran en la **Figura 4.3.**

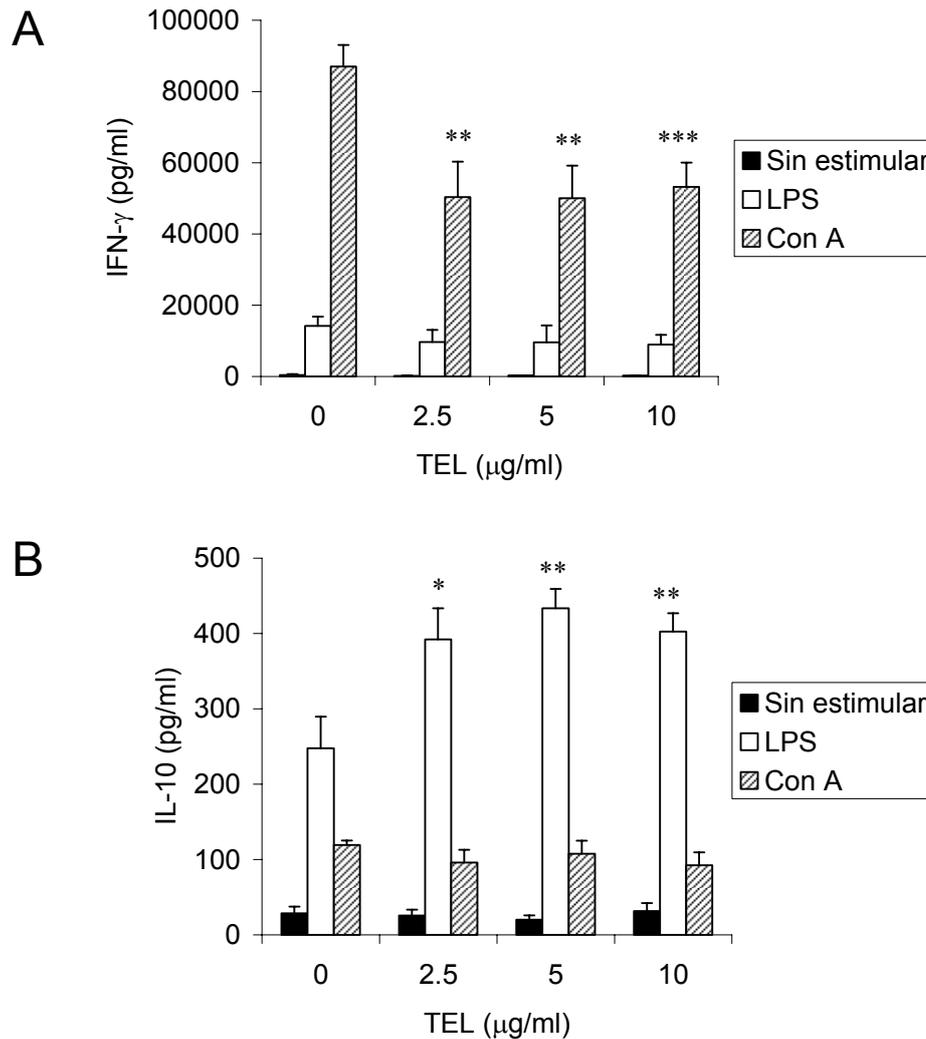


Figura 4.3. Efecto de TEL en la producción de IFN- γ (A), e IL-10 (B) por esplenocitos murinos en respuesta a LPS y Con A. Los esplenocitos fueron incubados sin TEL y con 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de TEL 1 h antes de la estimulación mitogénica. Los resultados son las medias aritméticas de los datos obtenidos en 3 cultivos. Las líneas representan las desviaciones de las medias. Cada grupo tratado con TEL se comparó con su respectivo grupo sin el agente aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.02$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$).

La concentración de IFN- γ en los sobrenadantes de los cultivos de células esplénicas tras 3 días de incubación con Con A se redujo en un 42% ($P < 0.01$), 42.5% ($P < 0.01$), y 39% ($P < 0.005$) con 2.5, 5, y 10 $\mu\text{g/ml}$ de TEL, respectivamente, mientras que en los cultivos estimulados con LPS, la adición del antibiótico no tuvo efecto (**Figura 4.3.A**). La producción de IL-2 en respuesta a Con A se determinó tras 24 h de incubación, y no se vio afectada por TEL (datos no mostrados). La producción de IL-10 inducida tras tres días de incubación con LPS se incrementó un 58% ($P < 0.02$), 75% ($P < 0.01$), y 62.5% ($P < 0.01$) en presencia de 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de TEL, respectivamente; pero la producción de esta citokina en respuesta a Con A no se vio afectada por el antimicrobiano (**Figura 4.3.B**).

4.4. Estudio de viabilidad de células JURKAT cultivadas con TEL.

Basándonos en el hecho de que el tratamiento con TEL no tuvo ningún efecto en la producción de IL-2 por esplenocitos estimulados con Con A pero si fue capaz de disminuir la producción de IFN- γ por estas células, nos planteamos estudiar si TEL tenía algún efecto en la activación de NF- κB . Previamente estudiamos posibles efectos de TEL, a las concentraciones empleadas, en la viabilidad celular para no interpretar equivocadamente la inhibición de determinadas respuestas como un efecto supresor cuando pudiera deberse a un efecto tóxico en las células. Para ello se realizó la medida de la actividad mitocondrial de cultivos celulares (Menge *et al.*, 1999) con o sin TEL a la concentración final de 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$.

Como se muestra en la **Tabla 4.1** no existieron diferencias significativas entre las células incubadas con TEL o sin ella durante 24 h. Estos datos fueron confirmados con el estudio de la viabilidad celular con Azul Tripán, siendo ésta mayor al 95% en todos los casos (datos no mostrados).

Tabla 4.1. Viabilidad de células JURKAT en presencia de TEL.

TEL (µg/ml)	Actividad mitocondrial (Densidad óptica 570 - 630 nm)
No	0.671 ± 0.049
2.5	0.672 ± 0.040
5	0.669 ± 0.031
10	0.679 ± 0.040

Los resultados de cada grupo son medias de 8 cultivos

4.5. Efecto de TEL en la activación de NF-κB en células JURKAT.

Para el estudio de la acción de TEL en la activación de NF-κB se realizaron transfecciones transitorias en la línea de linfocitos T con el plásmido “reporter” pNF-κB. Las células JURKAT transfectadas fueron estimulados con Con A durante 24 h. TEL se adicionó 1 h antes de la estimulación. La activación de NF-κB se inhibió en un 26% ($P < 0.0005$) a 2.5 µg/ml, 44% ($P < 0.0001$) a 5 µg/ml y 54% ($P < 0.0001$) a 10 µg de TEL (**Figura 4.4**).

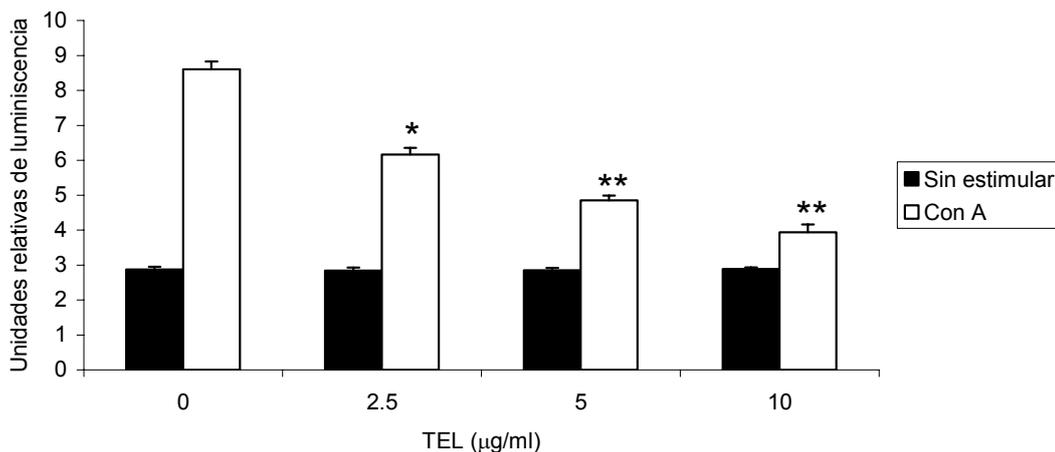


Figura 4.4. Efecto inhibitor de TEL en la activación de células JURKAT transfectadas transitoriamente con el vector “reporter” de la luciferasa pNF-κB. Las células JURKAT transfectadas de manera transitoria con vector “reporter” de la luciferasa pNF-κB fueron incubadas sin TEL o con las concentraciones finales de 2.5, 5 y 10 µg/ml de TEL 1 h antes de la estimulación con Con A. Los resultados son las medias aritméticas de cuatro cultivos celulares. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.0005$, ** $P < 0.0001$).

4.6. Estudio de viabilidad de células RAW 264.7 cultivadas con TEL.

Al igual que con las células JURKAT, se realizaron ensayos de citotoxicidad con la línea de macrófagos RAW 264.7 antes de iniciar los estudios de inmunomodulación por TEL.

Como se refleja en la **Tabla 4.2**, la actividad metabólica de la línea de macrófagos no se vio afectada por TEL a las concentraciones empleadas cuando las células fueron incubadas con el ketólido durante 24 h.

Tabla 4.2. Viabilidad de células RAW 264.7 en presencia de TEL.

TEL ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad mitocondrial (Densidad óptica 570 - 630 nm)
No	0.493 ± 0.023
2.5	0.513 ± 0.048
5	0.518 ± 0.044
10	0.493 ± 0.028

Los resultados de cada grupo son las medias de 8 cultivos.

4.7. Efecto de TEL en la producción de TNF- α en RAW 264.7 estimuladas con LPS.

Basándonos en el hecho de que el TNF- α es una citokina de expresión temprana en respuesta a estímulos pro-inflamatorios como LPS, se determinaron las concentraciones de ésta a las 6 y a las 24 h. A las 6 h, la producción de TNF- α se inhibió un 24% ($P < 0.05$), 36% ($P < 0.05$), y 54% ($P < 0.001$), a las concentraciones finales de 2.5, 5, y 10 $\mu\text{g/ml}$ de TEL, respectivamente (**Figura 4.5.A**). Este efecto se mantuvo a las 24 h, siendo los porcentajes de inhibición de un 24% ($P < 0.05$), 35% ($P < 0.05$), y 46 % ($P < 0.01$) (**Figura 4.5.B**).

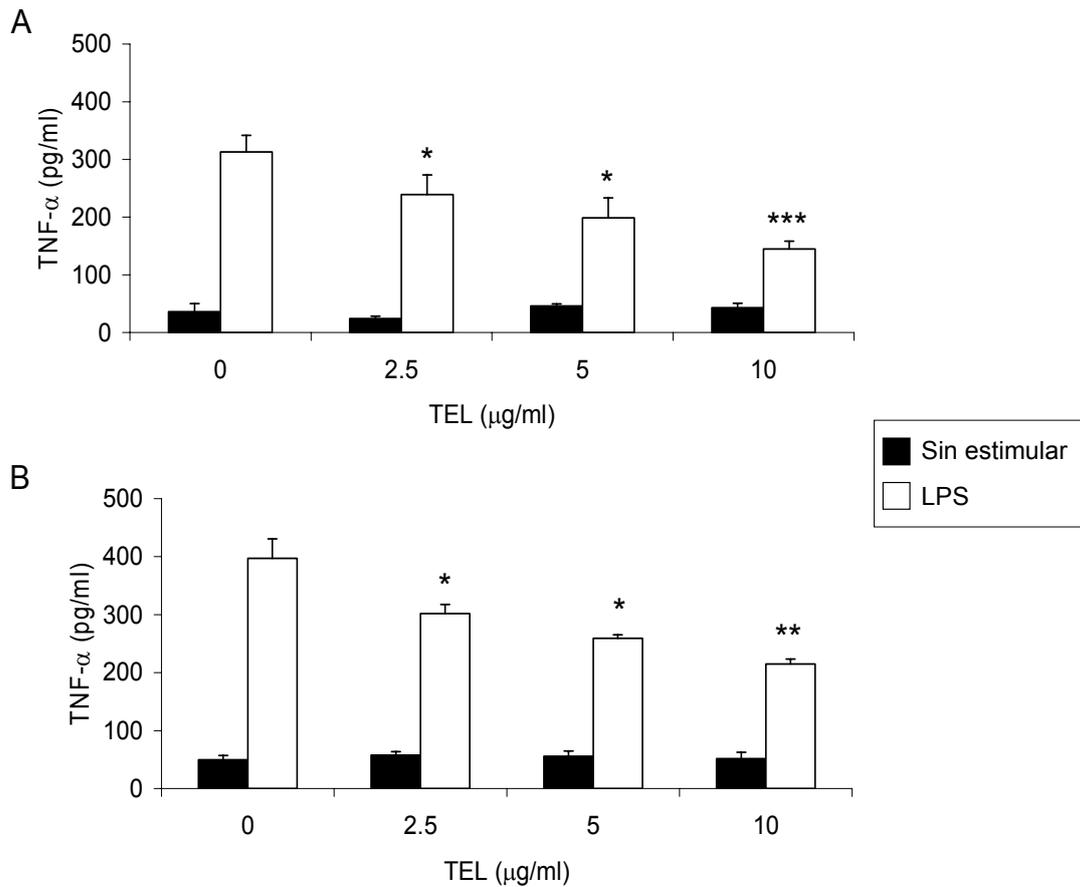


Figura 4.5. Inhibición por TEL de la producción de TNF- α por células RAW 264.7 sin estimular y estimuladas con LPS. Figura 4.5.A representa los datos obtenidos de células estimuladas 6 h. Figura 4.5.B representan a las células estimuladas con LPS 24 h. TEL se añadió a los cultivos celulares 1 h antes de la estimulación con LPS. Los resultados son las medias aritméticas de los datos procedentes de 3 cultivos. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos con TEL fueron comparados con el respectivo cultivo sin TEL aplicando el test de la *t* de Student: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$.

Para confirmar la inhibición de la expresión de TNF- α por TEL, se transfectó transitoriamente la línea de macrófagos con el plásmido “reporter” codificante para la luciferasa bajo el control del promotor TNF- α . La activación del promotor de TNF- α fue inhibida con las tres dosis utilizadas, lo que concuerda con los datos obtenidos en la cuantificación de TNF- α , aunque esta supresión no fue significativa para todas las dosis, sino para las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$, encontrándose inhibiciones de 50% ($P < 0.02$) y de 80% ($P < 0.005$), respectivamente (Figura 4.6).

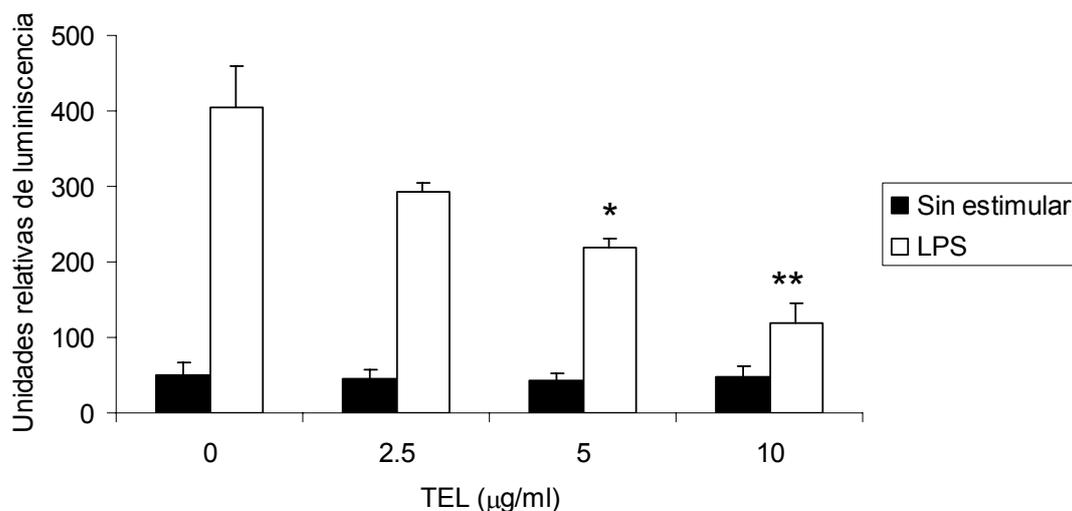


Figura 4.6. Efecto de TEL en la activación del promotor de TNF- α por LPS. Las células RAW 264.7 transfectadas de manera transitoria con vector “reporter” de la luciferasa pTNF- α fueron incubadas sin TEL o con las concentraciones finales de 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de TEL 1 h antes de la estimulación con LPS. Los resultados son las medias aritméticas de cuatro cultivos celulares. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.02$; ** $P < 0.005$).

4.8. Efecto de TEL en la producción de IL-10 por células RAW 264.7 estimuladas con LPS.

La producción de IL-10 se vio moderada pero significativamente afectada por el ketólido, tras 24 h de estimulación con LPS. Como se refleja en la **Figura 4.7** TEL incrementó la producción de la citokina anti-inflamatoria un 41% ($P < 0.05$) y un 57% ($P < 0.005$) para las concentraciones finales de 2.5 y 10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. De todas formas estos resultados no fueron muy relevantes, ya que tras 24 h de estimulación los niveles de IL-10 en los sobrenadantes de cultivo son muy bajos, y en posteriores determinaciones, tras 72 h de incubación con LPS, donde los niveles son más altos, no se encontraron diferencias significativas entre las células tratadas con TEL y las no tratadas (datos no mostrados).

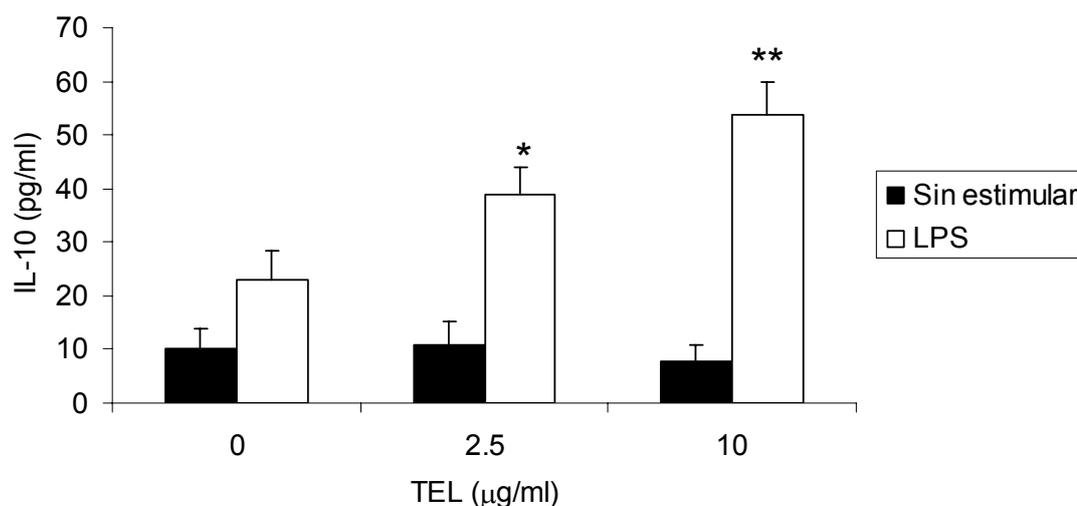


Figura 4.7. Efecto de TEL en la producción de IL-10 en células RAW 264.7 estimuladas por LPS. Los resultados son las medias aritméticas de los datos procedentes de 3 cultivos. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos con TEL fueron comparados con el respectivo cultivo sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$).

4.9. Efecto de TEL en la producción de NO por células RAW 264.7 estimuladas con LPS.

Como medida del efecto de TEL en la producción de NO inducida por LPS se determinaron los nitritos en los sobrenadantes de cultivo. La concentración de nitritos en los sobrenadantes de cultivo estimulados con LPS fue inhibida un 17% ($P < 0.001$), 22% ($P < 0.005$), y 33% ($P < 0.001$) con 2.5, 5, y 10 µg/ml de TEL, respectivamente (**Figura 4.8**).

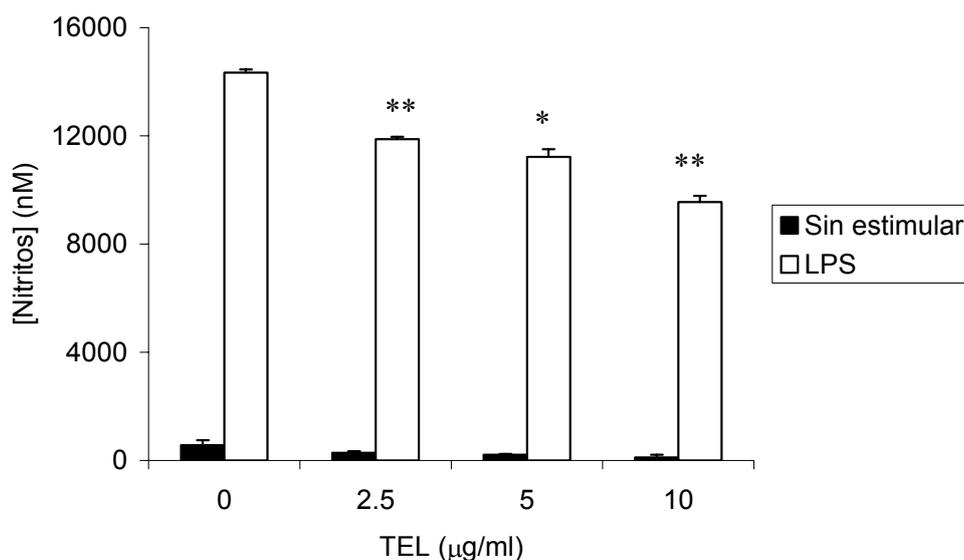


Figura 4.8. Efectos de TEL en la producción de nitritos por células RAW 264.7 estimuladas con LPS. Las células fueron incubadas sin TEL o con 2.5, 5 y 10 µg/ml de TEL como concentraciones finales, 1 h antes de la estimulación. Los resultados son las medias aritméticas de tres cultivos celulares. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.005$, ** $P < 0.001$).

4.10. Inhibición de la activación de NF-κB por TEL en células RAW 264.7 estimuladas con LPS.

TEL suprimió de forma dosis-dependiente la activación inducida por LPS del factor de transcripción NF-κB en los macrófagos RAW 264.7 transfectados transitoriamente con un plásmido codificante para la luciferasa y bajo el control de NF-κB. Tras sustraer el blanco de los cultivos sin estimular de la actividad luciferasa relativa a los cultivos estimulados con LPS, los niveles de inhibición fueron de 27% ($P < 0.05$) y 33% ($P < 0.05$) para las concentraciones finales de 5 y 10 µg/ml, respectivamente, tras 6 h de estimulación (**Figura 4.9.A**). Efecto que se mantuvo, ya que los niveles de inhibición 24 h después de estimular con LPS, fueron de 33% ($P < 0.005$) a 2.5 µg/ml, 49% ($P < 0.005$) a 5 µg/ml, y 78% ($P < 0.001$) a 10 µg/ml como concentraciones finales de TEL (**Figura 4.9.B**).

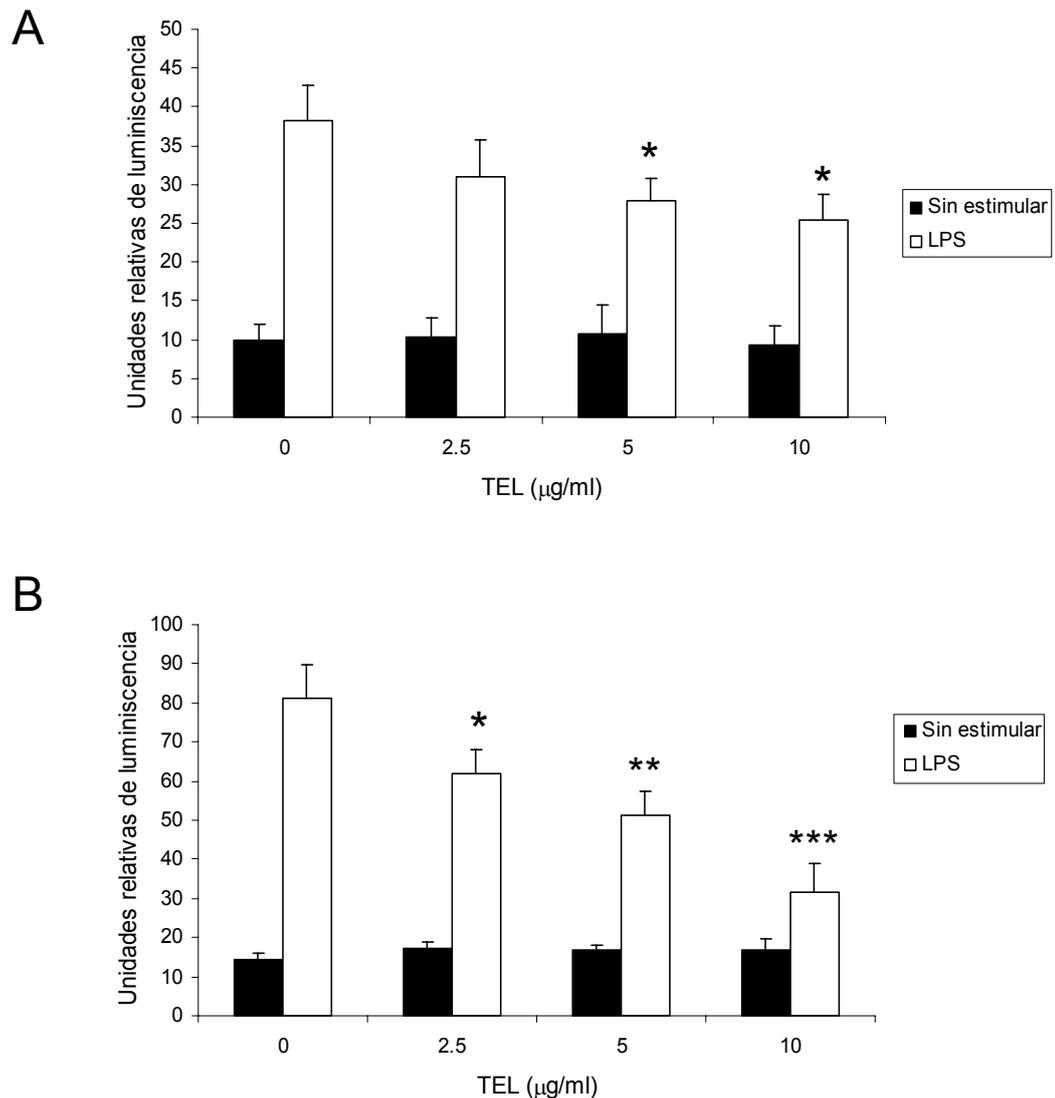


Figura 4.9. Efecto de TEL sobre la activación del factor de transcripción NF-κB en monocitos RAW 264.7 estimulados con LPS durante 6 h (A) y 24 h (B). Las células RAW 264.7 transfectadas transitoriamente con pNF-κB fueron incubadas sin TEL y con 2.5, 5 y 10 µg/ml de TEL 1 h antes de la estimulación. Los resultados son las medias aritméticas de cuatro cultivos celulares. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$).

Para confirmar la inhibición de NF-κB por TEL se determinó la activación de p65 mediante western-blot en extractos celulares totales, y la capacidad de unión de NF-κB p65 al DNA mediante ELISA empleando extractos nucleares. Las determinaciones por western-blot mostraron la inhibición de p65 1 h después de la estimulación con LPS en cultivos pre-tratados con 2.5, 5 y 10 µg/ml de TEL (**Figura 4.10.A**). Aunque se detectó una activación basal de NF-

κ B en la línea de macrófagos, la cuantificación de las bandas observadas mediante el programa Scion Image mostró que NF- κ B p65 fosforilado, forma activa de NF- κ B inducida por LPS, se inhibió en un 47 % con 5 μ g/ml, y en un 80% con 10 μ g de TEL (**Figura 4.10.B**).

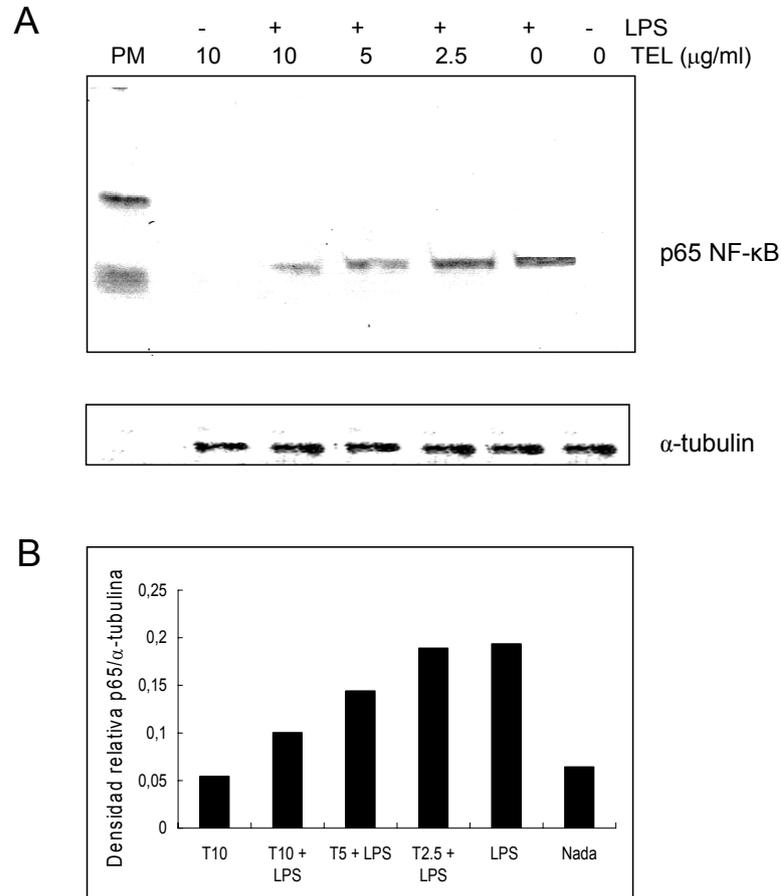


Figura 4.10. Efecto inhibitor de TEL en la activación de NF- κ B en monocitos RAW 264.7. El Western-blot ilustra la activación de NF- κ B en células estimuladas durante 1 h con LPS y pre-incubadas con distintas concentraciones de TEL (**A**). La densidad de las bandas inmunorreactivas se determinó con el programa Scion Image y se normalizaron con los valores obtenidos de la densitometría de la α -tubulina (**B**).

La misma inhibición observada en los casos anteriores fue también reflejada realizando el ELISA comercial para detectar NF- κ B p65 activado, que determina la capacidad de unión de este factor a su secuencia consenso (descrito en el apartado 3.10.2 de Material y Métodos). Para ello, se utilizaron extractos nucleares de los macrófagos sin estimular y estimulados 1 h con LPS, tratados o no con las distintas concentraciones de TEL, observándose una inhibición, significativa en todos los casos, de un 26% ($P < 0.05$), 34% ($P <$

0.01) y 41% ($P < 0.005$), para las concentraciones finales de 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente **Figura 4.11**.

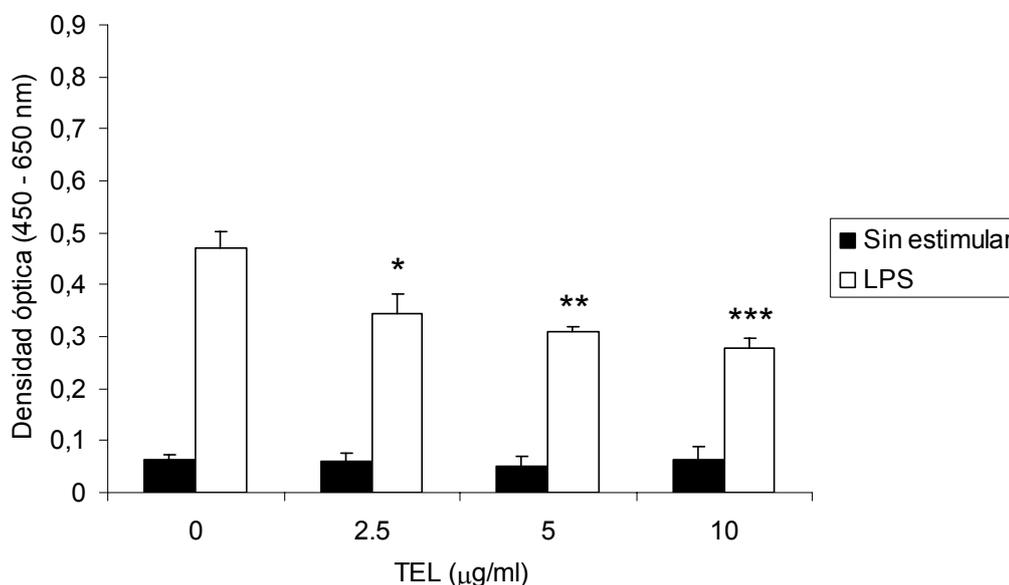


Figura 4.11. Efecto inhibitor de TEL en la activación de NF- κ B p65 en extractos nucleares. La figura muestra el efecto de TEL la capacidad de unión de NF- κ B p65 al DNA en cultivos de células RAW 264.7 sin estimular y estimuladas con LPS 1 h. Esta unión se examinó en extractos nucleares mediante un inmunoensayo comercial, descrito en Material y Métodos. Los resultados son las medias aritméticas de tres cultivos celulares. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la t de Student (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$).

Se realizó el mismo ensayo pero determinando NF- κ B p65 activado a las 9 h de estimular con LPS, con el objeto de determinar si esta inhibición también se mantenía en la activación tardía de NF- κ B por LPS. En este caso únicamente se utilizó la concentración mayor de TEL, debido a su mayor efecto inhibitor. Como se refleja en la **Figura 4.12**, el efecto de TEL perduró, encontrándose una inhibición significativa ($P < 0.005$) de un 26% respecto a las células sin tratar.

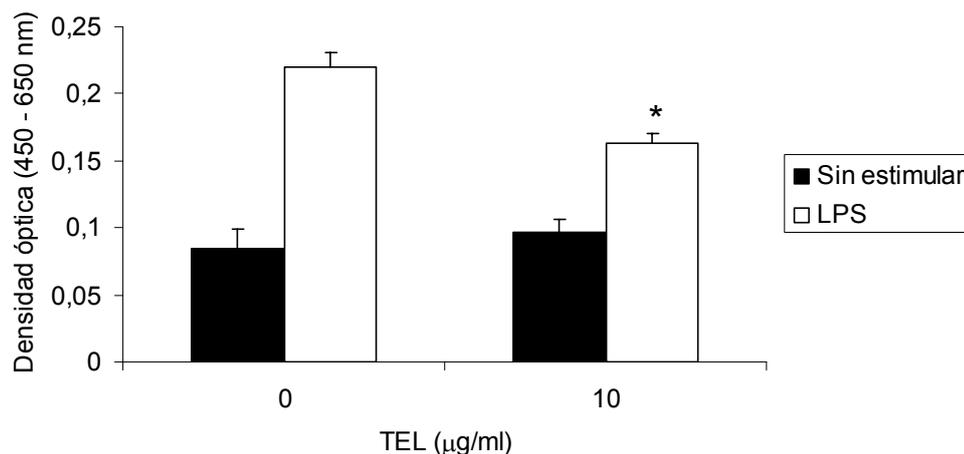


Figura 4.12. Efecto inhibitor de TEL en la activación de NF-κB p65 en extractos nucleares tras 9 h de estimulación. La figura muestra el efecto de TEL la capacidad de unión de NF-κB p65 al DNA en cultivos de células RAW 264.7 sin estimular y estimuladas con LPS 9 h. Esta unión se examinó en extractos nucleares mediante un inmunoensayo comercial, descrito en Material y Métodos. Los resultados son las medias aritméticas de tres cultivos celulares. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.005$).

4.11. Inhibición de la activación de NF-κB por TEL en células RAW 264.7 estimuladas con PMA.

Además de la estudiar la modulación de NF-κB por TEL en células RAW 264.7 estimuladas con LPS se realizaron ensayos con otros activadores como el PMA. En este caso, TEL, a la concentración final de 10 μg/ml, también mostró poseer un efecto inhibitor de un 61% ($P < 0.05$) (**Figura 4.13.A**), en los ensayos de transfección realizados. Esta inhibición fue también confirmada con western-blot (**Figura 4.13.B**).

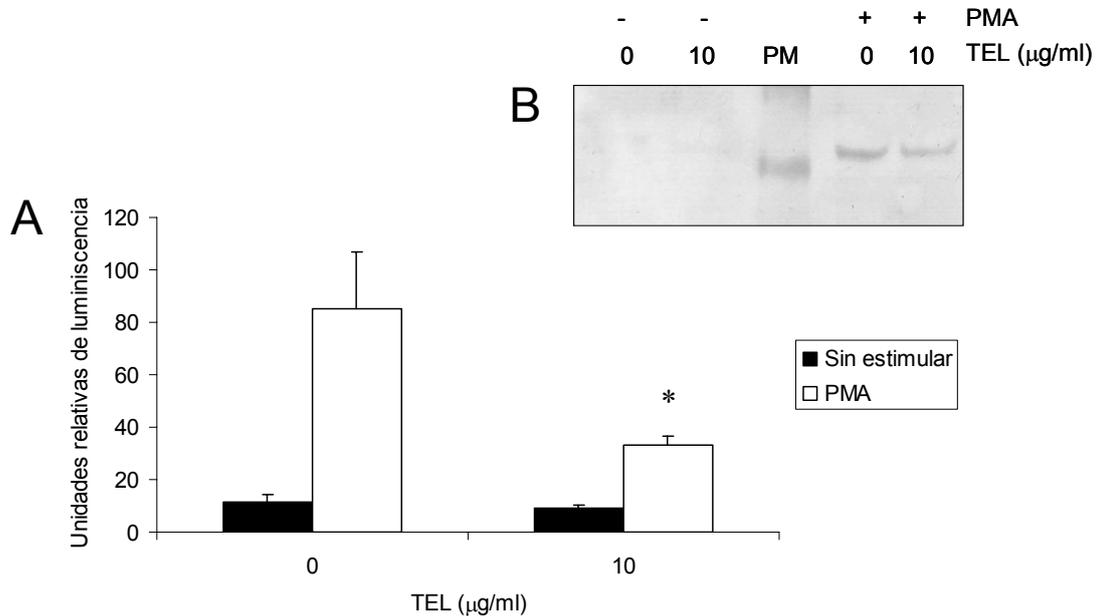


Figura 4.13. Efecto inhibitor de TEL en la activación de NF-κB por PMA en monocitos RAW 264.7. Las células RAW 264.7 transfectadas transitoriamente con pNF-κB fueron incubadas sin TEL y con 10 μg/ml de TEL 1 h antes de la estimulación. Los resultados son las medias aritméticas de cuatro cultivos celulares. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.05$) (A). El Western-blot confirma la inhibición de la activación de NF-κB (B).

4.12. Inhibición de la activación de AP-1 por TEL en células RAW 264.7 estimuladas con LPS y PMA

La activación de AP-1 también fue inhibida por TEL en células RAW 264.7 estimuladas con LPS o PMA. Tras estimular durante 6 h, y sustraer los valores de luminiscencia de los cultivos sin estimular, TEL inhibió un 39% ($P < 0.005$) y 43% ($P < 0.0005$) la activación de AP-1 por LPS, a las concentraciones de 5 y 10 μg/ml, mientras que la inhibición de la activación inducida por PMA fue más acentuada, siendo de 50% ($P < 0.02$), 54% ($P < 0.02$) y 67% ($P < 0.02$) a las concentraciones de 2.5, 5 y 10 μg/ml, respectivamente (Figura 4.14).

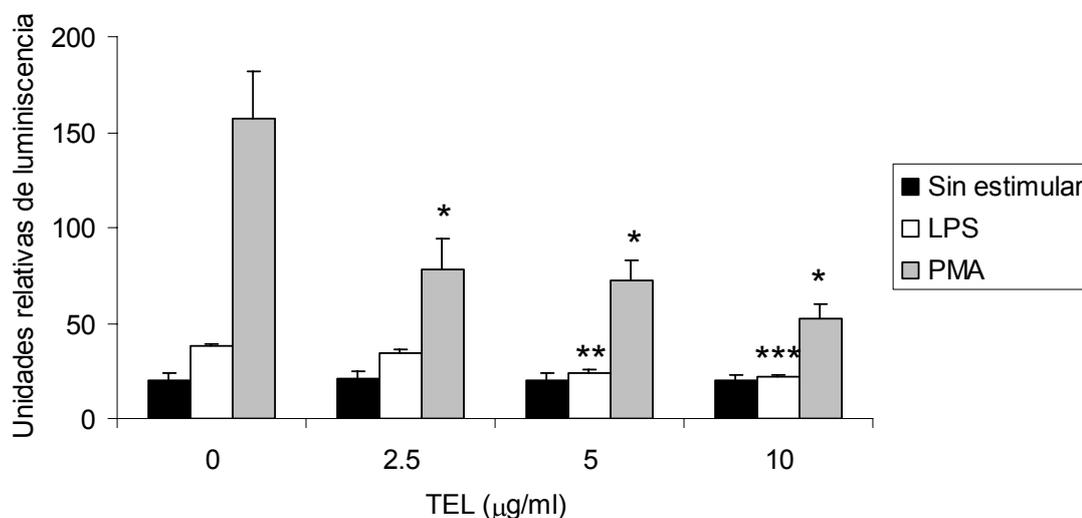


Figura 4.14. Inhibición de AP-1 por TEL en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS o PMA. Las células RAW 264.7 transfectadas transitoriamente con pAP-1 fueron incubadas sin TEL y con 2.5, 5 y 10 µg/ml de TEL 1 h antes de la estimulación. Los resultados son las medias aritméticas de cuatro cultivos celulares. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.02$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$).

La inhibición por TEL a las 6 h de estimulación, también pudo observarse a las 24 h con ambos activadores. De hecho, tras restar los blancos (cultivos sin estimular) de los valores procedentes de los cultivos estimulados, la activación de AP-1 por LPS se inhibió en un 88% ($P < 0.02$) con una concentración final de 5 µg/ml, y en un 96% ($P < 0.02$) con 10 µg/ml (**Figura 4.15.A**), y la activación por PMA se inhibió en un 78% ($P < 0.005$) y 80% ($P < 0.001$), a las concentraciones de 2.5, 5 y 10 µg/ml, respectivamente (**Figura 4.15.B**).

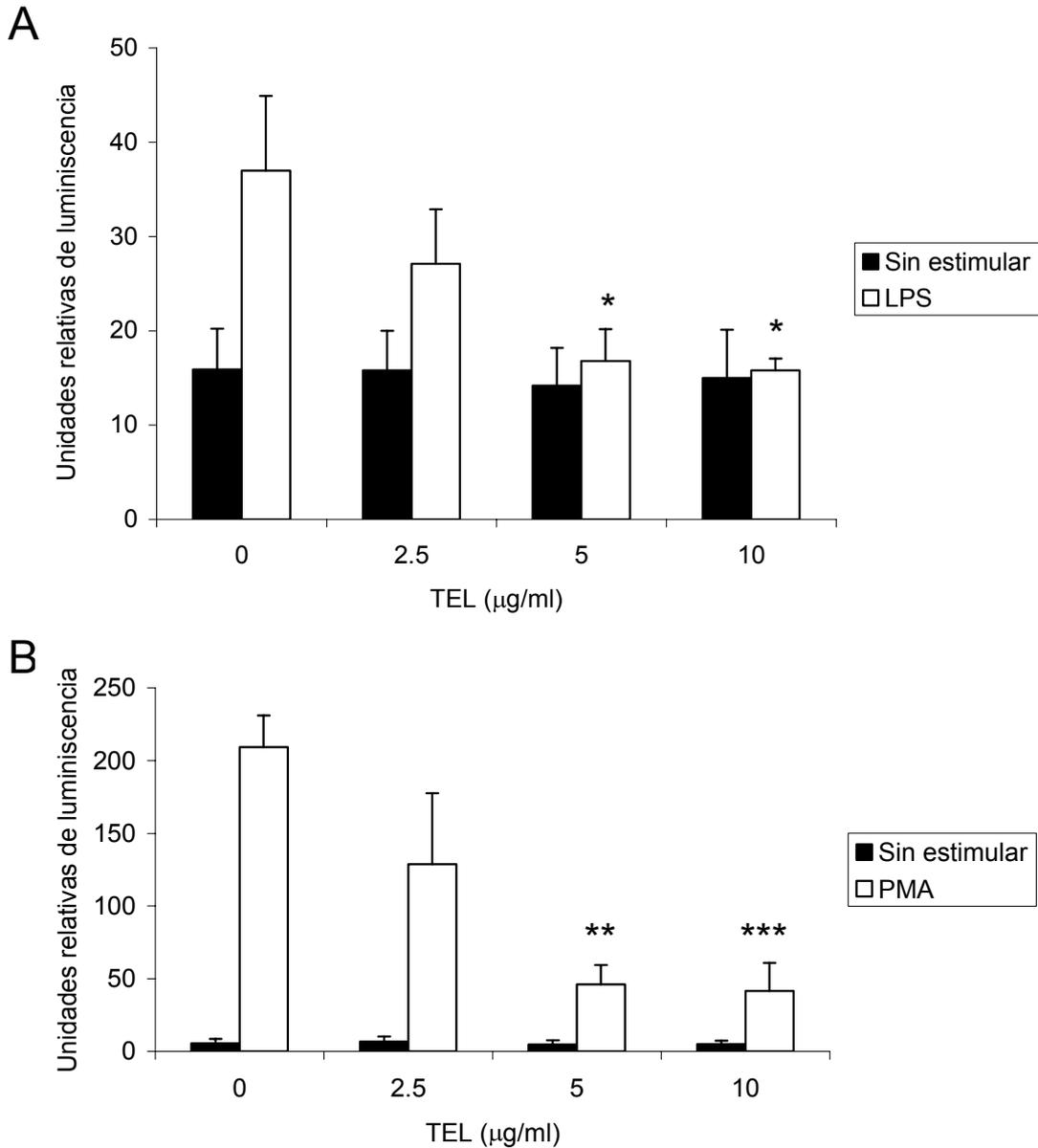


Figura 4.15. Inhibición de AP-1 por TEL en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS o PMA 24 h. Las células RAW 264.7 transfectadas transitoriamente con pAP-1 fueron incubadas sin TEL y con 2.5, 5 y 10 µg/ml de TEL 1 h antes de la estimulación. Los resultados son las medias aritméticas de cuatro cultivos celulares. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.02$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$).

4.13. Inhibición de la activación de JNK1/2 por TEL en células RAW 264.7 estimuladas con LPS.

Debido al hecho de que la MAPK JNK1/2 juega un papel importante en la activación de AP-1 en respuesta a estímulos inflamatorios, nos planteamos estudiar si TEL tenía algún efecto a ese nivel. Para ello se realizaron western-blot para determinar fosfo-JNK1/2. Tras realizar el análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas, y una vez sustraída la activación basal, se observó una inhibición del 35% de fosfo-JNK1/2 por TEL, utilizada a la concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$, comparando con las células sin tratar y estimuladas con LPS. Como control se utilizó el inhibidor SP600125, que inhibió la activación de JNK1/2 un 55% (**Figura 4.16**).

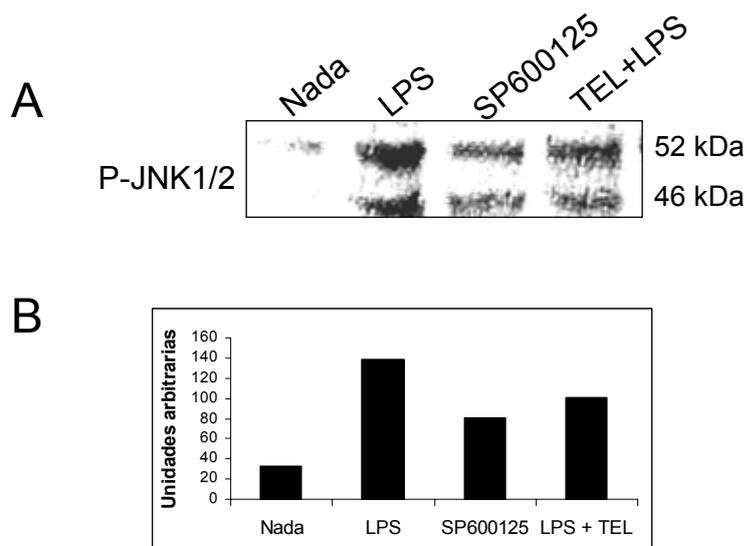


Figura 4.16. Inhibición de la activación de JNK1/2 por TEL en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. El Western-blot ilustra la activación de JNK1/2 en células estimuladas durante 15 min con LPS y pre-incubadas con TEL a la concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ o con el inhibidor SP600125 a la concentración final de 25 μM (**A**). La densidad de las bandas inmunorreactivas se determinó con el programa Scion Image (**B**).

4.14. Discusión

La modulación de las funciones de los esplenocitos se reflejó en la producción de citocinas: la producción de IFN- γ inducida por Con A fue suprimida, mientras que la de IL-10 inducida por LPS se incrementó con la adición de TEL a los cultivos de esplenocitos. Con A se une al complejo receptor TCR/CD3 induciendo la activación de células T a través de una serie de eventos intracelulares vía fosfolipasa C, y los efectos de Con A en la activación de células T maduras mimetizan el efecto de la unión de alta afinidad al TCR (Miao *et al.*, 2005). En consecuencia, la estimulación *in vitro* con Con A ha sido empleada con frecuencia para estudiar los efectos de agentes inmunomoduladores sobre el perfil de citocinas T_H1/T_H2 (Viveros-Paredes *et al.*, 2006). El IFN- γ es una citokina de tipo 1 activadora de macrófagos y reguladora tanto de mecanismos de la inmunidad innata como de la específica (Bohem *et al.*, 1997), por otra parte, IL-10 es una citokina de tipo 2 con actividad anti-inflamatoria (Moore *et al.*, 2001). Algunos agentes inmunomoduladores son capaces de inhibir la respuesta T_H1 y potenciar la de T_H2 (Iwata *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 1999). Sin embargo, la inmunomodulación por TEL parece ser más compleja. La producción de IL-2 inducida por Con A no se vio afectada por el ketólido. Este hecho fue inesperado, ya que los genes que codifican para IFN- γ e IL-2 pertenecen a los patrones de genes Th1, expresión que está relacionada con la activación de los factores de transcripción de la familia NF-AT (Porter y Clipstone, 2002). Sin embargo, este tipo de modulación diferencial de IFN- γ y IL-2 no es inaudita (Zeyda *et al.*, 2003). Junto con NF-AT, la vía de señalización NF- κ B se encuentra también implicada en la regulación de la expresión de IFN- γ (McCracken *et al.*, 2004) y, en algunos casos, NF- κ B y no NF-AT se requiere para la producción de IFN- γ (Rodríguez-Galan *et al.*, 2005); por todo ello, es razonable correlacionar la actividad inhibitoria de TEL en la activación de NF- κ B y la disminución de la expresión de IFN- γ .

La secreción de IL-10 inducida por Con A no se modificó por TEL. Esto sugiere que la función T_H2 no se potenció por TEL. Junto con las células T_H2 estimuladas con Con A, los macrófagos estimulados con LPS constituyen una

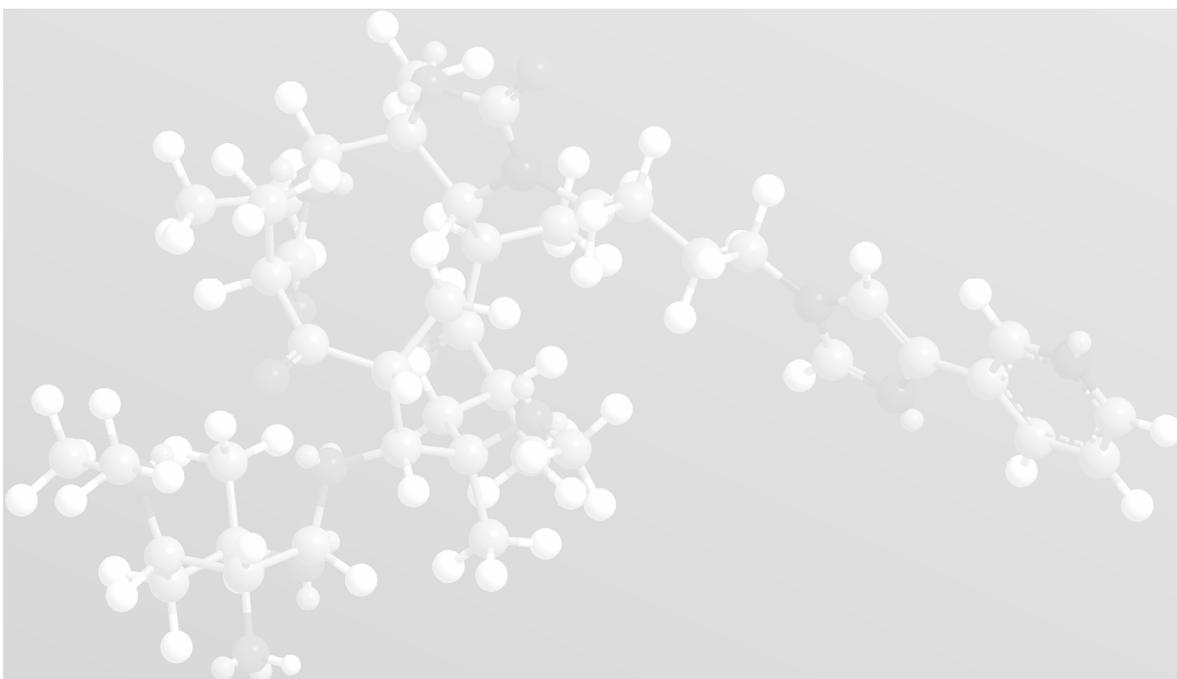
fuente celular de IL-10 (Meisel *et al.*, 1996). Debido a que la producción de IL-10 se incrementó con TEL, es razonable la hipótesis de que las funciones de los macrófagos esplénicos fueron moduladas por el antibiótico. Esto plantea dos cuestiones. Primero, la IL-10 es una citokina anti-inflamatoria (Moore *et al.*, 2001), que inhibe la producción de IFN- γ inducida por LPS (Varma *et al.*, 2002); sin embargo, los niveles de IFN- γ en los cultivos de esplenocitos estimulados con LPS no se vieron modificados por TEL. Respecto a esto, es importante considerar que las células NK y NKT son la mayor fuente de IFN- γ en el bazo de ratón tras el desafío con LPS (Varma *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2000), y algunos investigadores han reportado que la IL-10 e IFN- γ pueden ser producidas simultáneamente por células accesorias y células NK, respectivamente, cuando se cocultivan en presencia de LPS (Kikuchi *et al.*, 2004), o invasinas de *Shigella* (Samandari *et al.*, 2000). Segundo, TEL incrementó la producción de IL-10 inducida con LPS por macrófagos esplénicos, lo cual es acorde con datos obtenidos *in vitro* en la línea de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

Otra discrepancia es que TEL incrementó la producción de IL-10 en células esplénicas y suprimió la producción de TNF- α en células RAW 264.7, siendo así que la expresión de ambas citokinas se encuentra bajo el control de NF- κ B. Sin embargo, NF- κ B regula de forma diferente la producción de citokinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (Cao *et al.*, 2006), y existen factores de transcripción alternativos que pueden inducir la producción de IL-10 en ausencia de NF- κ B (Lucas *et al.*, 2005). Por ello, el mismo agente inmunomodulador que incrementa la producción de IL-10 puede simultáneamente ejercer un efecto inhibitor en la secreción de citokinas pro-inflamatorias como TNF- α y en la activación de NF- κ B, como ha sido documentado por numerosos autores (Changhua *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007).

El modesto efecto estimulador causado por TEL en la proliferación de linfocitos esplénicos estimulados por mitógenos se asoció a un incremento en la apoptosis inducida por CAM. Contrariamente, se ha descrito que la eritromicina, que también inhibe la activación de NF- κ B y promueve apoptosis

en linfocitos T activados, tiene efecto anti-proliferativo en estas células (Wu *et al.*, 2007). Nuestros datos sugieren que el efecto de TEL no se explica simplemente a través de una disminución de células viables por incremento de apoptosis; de hecho, la viabilidad en los cultivos sin CAM no se vio afectada por el ketólido. TEL no actúa como inductor de apoptosis, pero lleva a las células a un estado de susceptibilidad incrementada frente a inductores de apoptosis. Los efectos anti-inflamatorios de TEL deben explicarse, al menos en principio, a través de la inhibición de la activación de factores de transcripción.

En efecto, en la investigación expuesta en este capítulo, la actividad anti-inflamatoria de TEL, revelada por la supresión de la liberación de TNF- α y NO inducida por LPS, ha sido confirmada a nivel de la activación transcripcional. NF- κ B y AP-1 se encuentran implicados en la expresión de iNOS y citocinas pro-inflamatorias como TNF- α en macrófagos estimulados con LPS (Jones *et al.*, 2001), y los agentes inhibidores de la activación de estos factores de transcripción poseen propiedades anti-inflamatorias (Ban *et al.*, 2004). Además, JNK 1/2, que es la kinasa terminal de c-Jun y que por tanto está implicada en el control de la activación de AP-1 y, finalmente, de la producción de quimiocinas como MIP-2 por células RAW (Kim *et al.*, 2003), se ve inhibida también por el ketólido, lo que también se ha observado con macrólidos como roxitromicina (Oyama *et al.*, 2007). Nuestros resultados sugieren que la actividad supresora de TEL en la respuesta inflamatoria es similar a la descrita para los macrólidos con macrociclo de 14 y 15 átomos (Kikuchi *et al.*, 2002), y debe ser responsable, en parte, de su eficacia clínica en la terapia de las infecciones del tracto respiratorio.



5. RESULTADOS Y DISCUSION II

Efecto anti-inflamatorio en un modelo experimental de shock séptico

5.1. Efectos de TEL en la supervivencia a shock endotóxico inducido por LPS

Como se ha descrito en la introducción, existen numerosas evidencias experimentales de la inhibición de la respuesta inflamatoria sistémica por macrólidos. En nuestro caso, nos planteamos estudiar el efecto de TEL en un modelo de shock séptico inducido por dos dosis de LPS (DL₁₀₀ y DL₅₀), previamente establecidas en nuestro Laboratorio.

El diseño experimental se ha detallado en Material y Métodos (3.11.3 y Figura 3.9).

En la **Figura 5.1** se muestran los resultados representativos de las experiencias realizadas. Como puede observarse, el pre-tratamiento con TEL incrementó la tasa de supervivencia significativamente, de hecho, protegió al 50% de los animales a los que se administró la DL₁₀₀ de LPS (**Figura 5.1.A**); y en los animales inyectados con la DL₅₀, TEL incrementó la tasa de supervivencia de un 37.5% a un 87.5% (**Figura 5.1.B**).

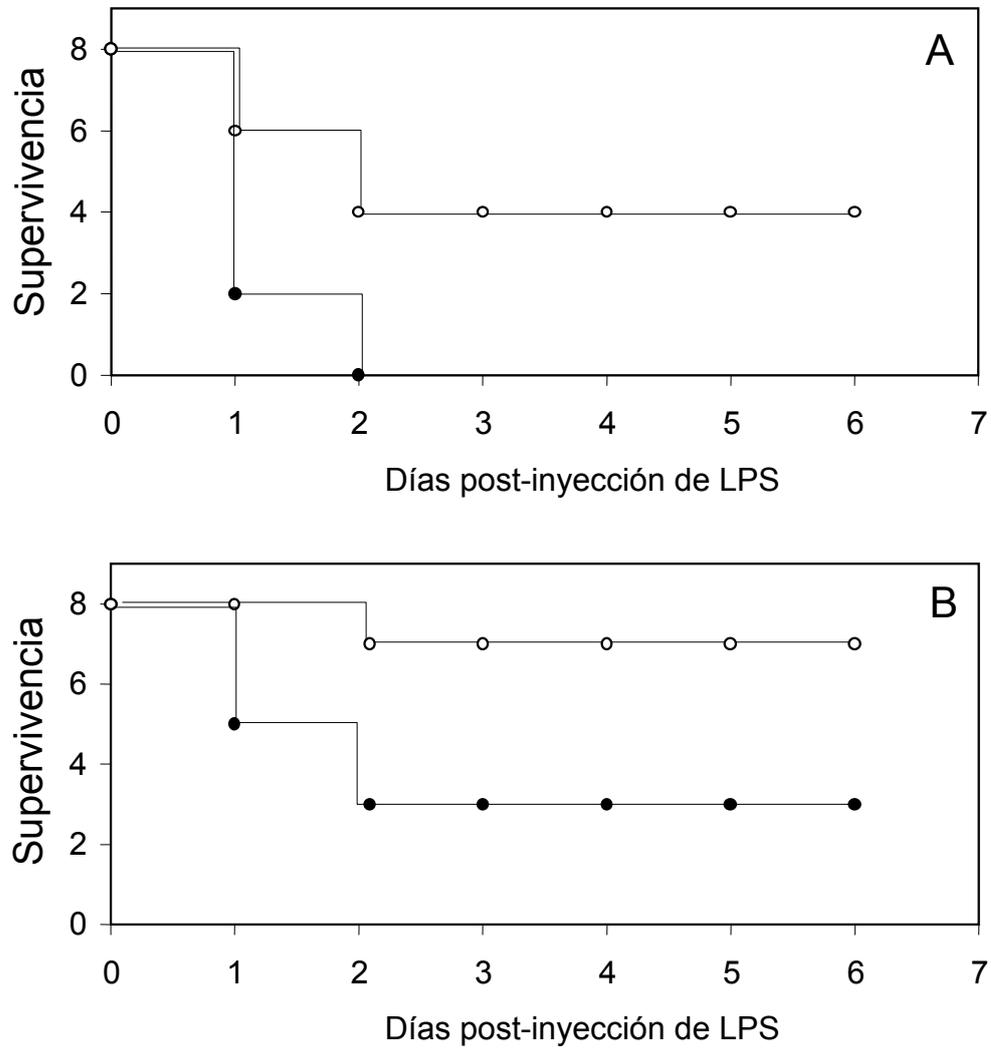


Figura 5.1. Efecto del pre-tratamiento con TEL en la supervivencia tras la administración de LPS a las dosis de 50 mg/kg (A) y 25 mg/kg (B). Los ratones recibieron 20 mg/kg de TEL (○) o PBS (●) 1 h antes de la inyección de LPS por vía intraperitoneal. El análisis estadístico aplicado (test de Kaplan-Meier), reveló una $P < 0.05$ al comparar los distintos grupos.

5.2. Efectos de TEL en la producción *in vivo* de citocinas en el modelo de shock endotóxico

En experimentos posteriores, investigamos si TEL llevaba a cabo su acción protectora en los ensayos de letalidad a través de la modulación *in vivo* de la secreción de citocinas. El diseño experimental fue el mismo que el utilizado para el ensayo de supervivencia. Dos y ocho horas después de la administración de LPS, se procedió a realizar la extracción de sangre a los ratones, con el objeto de determinar la producción temprana y tardía de citocinas inducidas por la endotoxina.

Los resultados mostrados en la **Figura 5.2.A.** reflejan una disminución significativa ($P < 0.05$) en la concentración de IL-1 β en plasma 8 h después de la administración de la dosis mayor de LPS cuando los ratones fueron pre-tratados con TEL. Además, TEL disminuyó significativamente ($P < 0.05$) los niveles plasmáticos de TNF- α 2 h después de la inyección de la dosis mayor de LPS (50 mg/kg de peso corporal), datos mostrados en la **Figura 5.2.B.**

Respecto al efecto de TEL en los animales a los que se les administró 25 mg/kg de peso corporal de LPS (dosis menor), se observó la misma acción inhibitoria en la producción de las citocinas pro-inflamatorias, aunque las diferencias con los ratones no pre-tratados no alcanzaron significación estadística (datos no mostrados).

Por el contrario, el pre-tratamiento con TEL incrementó de forma significativa los niveles plasmáticos de IL-10 ($P < 0.05$) tanto a las 2 como a las 8 h después de la administración de la dosis mayor de LPS (**Figura 5.2.C.**)

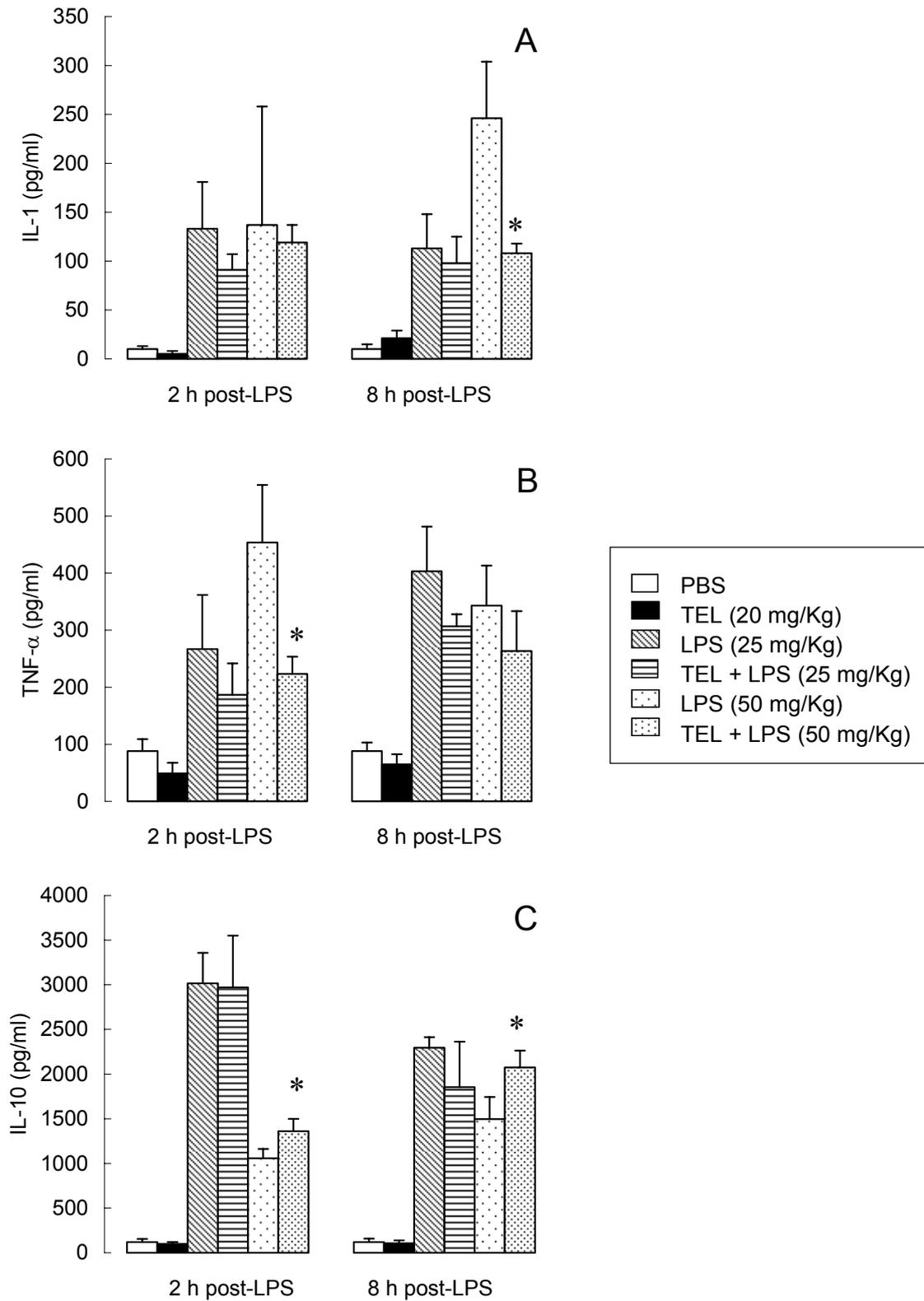


Figura 5.2. Efectos de TEL y LPS en los niveles plasmáticos de IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-10 (C). Los ratones fueron tratados por vía intraperitoneal con PBS, 20 mg/kg de TEL, 25 mg/kg de LPS, TEL 1 h antes de la inyección de 25 mg/kg de LPS, 50 mg/kg de LPS y TEL 1 h antes de la inyección de 50 mg/kg de LPS. * $P < 0.05$ frente a LPS únicamente (test t Student).

5.3. Efectos de TEL en la producción *in vivo* de NO en el modelo de shock endotóxico

El aumento de la expresión de las isoformas de iNOS y la producción excesiva de NO y otras especies reactivas del nitrógeno, están asociadas con los mecanismos patológicos del shock séptico (Nava *et al.*, 1991; Thiemermann, 1997). La medida de nitritos, metabolito estable del NO, permiten conocer de forma indirecta, el grado de expresión de iNOS. En consecuencia, se determinaron los niveles de nitritos en las muestras de plasma. Tanto la dosis mayor como la menor de LPS inducían niveles de nitritos siete veces más altos que las concentraciones basales (controles con TEL y con vehículo). Los resultados que se presentan en la **Figura 5.3** muestran un efecto muy marcado de la TEL en las concentraciones de nitritos, de hecho, 8 h después de la administración de la dosis menor de LPS, TEL inhibió dicho efecto muy significativamente ($P < 0.01$), inhibición que continuó siendo significativa para el resto de las determinaciones ($P < 0.05$).

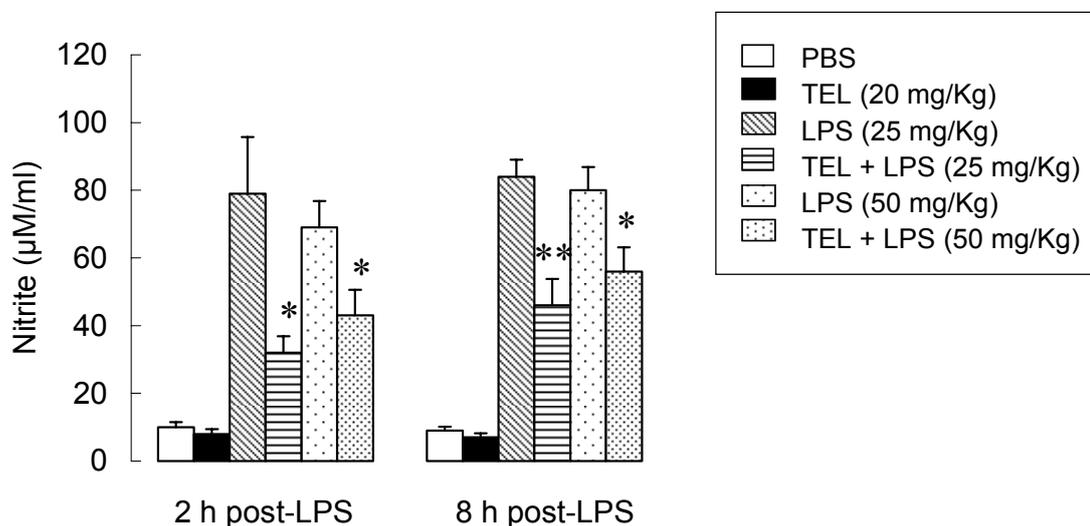


Figura 5.3. Efectos de TEL y LPS en las concentraciones plasmáticas de nitritos. Los ratones fueron tratados por ruta intraperitoneal con PBS, 20 mg/kg de TEL, 25 mg/kg de LPS, TEL 1 h antes de la inyección de 25 mg/kg de LPS, 50 mg/kg de LPS y TEL 1 h antes de la inyección de 50 mg/kg de LPS. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ frente a LPS únicamente (test *t* Student).

5.4. Discusión

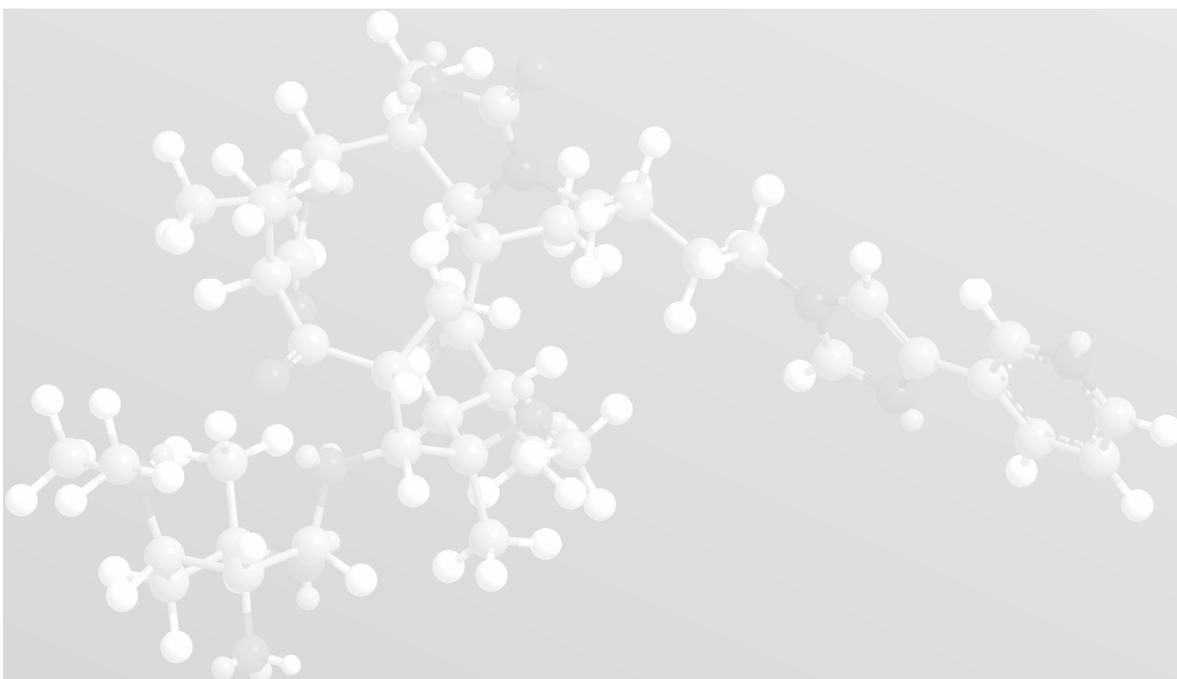
Los datos obtenidos muestran, por vez primera, que TEL es un BRM con capacidad de prevenir la letalidad inducida por LPS en ratones, probablemente a través de la modulación de los niveles plasmáticos de citocinas en los animales a los que se les inyectó el LPS. La inducción experimental de shock endotóxico es un modelo exigente y bien conocido para establecer el potencial anti-inflamatorio de un posible o supuesto BRM. Las citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α han sido descritas como mediadores en la patogénesis del shock séptico (Butler *et al.*, 1989; Remick *et al.*, 1987). Por ello, TEL podría proteger a los ratones en nuestro modelo a través de la disminución de ambas citocinas, como se ha sugerido en el caso de otros agentes antimicrobianos inmunomoduladores (Hirata *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2000).

La citokina anti-inflamatoria IL-10 parece jugar un papel en el efecto protector de TEL frente a altas dosis de LPS. Se cree que la actividad anti-inflamatoria de la IL-10 media la inhibición de la producción de citocinas pro-inflamatorias (Grutz, 2005; Louis *et al.*, 1997). En nuestro modelo, los incrementos de la IL-10 se correlacionan con la disminución significativa tanto de IL-1 β 8 h después de la inducción del shock, como del TNF- α 2 h después de la administración de LPS. Una relación entre el incremento de la producción de IL-10 y la disminución de los niveles de citocinas pro-inflamatorias ha sido también observado en un modelo similar de shock inducido por LPS con fluorquinolonas (Khan *et al.*, 2000). Sin embargo, otros estudios no encontraron esta correlación, mostrando que estos agentes inmunomoduladores pueden inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias sin afectar a los niveles en sangre de IL-10 (Nicoletti *et al.*, 2001). Estos estudios indican que aunque la falta de un balance apropiados entre citocinas pro- y anti-inflamatorias se considera central en la patofisiología del shock séptico, otros mediadores distintos de la IL-10 pueden jugar un papel en la protección de la letalidad del shock séptico inducido.

Las citocinas pro-inflamatorias pueden estimular la producción de otras sustancias como NO, el cual es uno de los mediadores de la sepsis. Nuestros

experimentos muestran que la inhibición de citocinas pro-inflamatorias por TEL se correlacionan con la disminución de la producción de NO. Un hallazgo similar con la administración de tetraciclinas ha podido observarse en otro modelo murino muy parecido a éste, aunque la participación de otros mecanismos en el control del shock séptico por estos antibióticos no han sido excluidos (Milano *et al.*, 1997).

En conclusión, nuestros datos proporcionan evidencias *in vivo* de las propiedades BRMs de la TEL, sugiriendo que la actividad antibacteriana de este agente está asociada a interesantes efectos anti-inflamatorios.



6. RESULTADOS Y DISCUSION III

Efecto anti-inflamatorio en un modelo *in vitro* de inflamación respiratoria

6.1. Estudios de viabilidad de células MLE-12 cultivadas con TEL

El modelo de inflamación respiratoria *in vitro* es una aproximación experimental sencilla basada en el estudio de las interacciones entre macrófagos, representados por la línea RAW 264.7, y células del epitelio alveolar, como la línea MLE-12. Previamente, fue necesario comprobar que la viabilidad de las células MLE-12, al igual que la de las RAW 264.7, no se afectaba por el antibiótico. Como muestra la **Tabla 6.1**, la actividad metabólica de la línea MLE-12 no disminuyó tras 24 h de incubación con las concentraciones de TEL utilizadas en los ensayos.

Tabla 6.1. Viabilidad de células epiteliales MLE-12 en presencia de TEL.

TEL ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad mitocondrial (Densidad óptica 570 - 630 nm)
No	0.658 ± 0.022
2.5	0.649 ± 0.025
5	0.638 ± 0.018
10	0.648 ± 0.019

Los resultados de cada grupo son las medias de 8 cultivos.

6.2. Efecto de TEL en la producción de citokinas de células RAW 264.7 estimuladas con LPS y de células MLE-12 estimuladas con sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7

Los macrófagos alveolares y las células epiteliales respiratorias son responsables de iniciar la respuesta inflamatoria en el pulmón. En estos ensayos *in vitro*, se recreó la interacción macrófago-epitelio proporcionando un modelo de inflamación pulmonar aguda. En primer lugar, se estimularon los macrófagos RAW 264.7 con LPS durante 24 h para medir la producción de MIP-2. El pre-tratamiento con TEL 1 h antes de estimular con LPS suprimió de una forma dosis-dependiente la producción de la quimiokina: los niveles de inhibición fueron de 17% ($P < 0.05$) a 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 19% ($P < 0.01$) a 5 $\mu\text{g/ml}$, y 26% ($P < 0.005$) a 10 $\mu\text{g/ml}$ de TEL al comparar con los cultivos a los que no se les añadió. (**Figura 6.1.A**).

La estimulación de MLE-12 con LPS a la concentración utilizada no induce la producción de MIP-2 (datos no mostrados), pero la incubación de la línea epitelial con sobrenadantes de células RAW 264.7 sin estimular o estimuladas con LPS dio lugar a la inducción de la producción de MIP-2 por las células epiteliales, debido a los mediadores inflamatorios procedentes de los macrófagos (**Figura 6.1.B**).

Como se refleja en la **Figura 6.1.B**, la producción de MIP-2 por MLE-12 incubadas durante 24 h con sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS fue también suprimida en un 14% ($P < 0.05$) a 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 30% ($P < 0.05$) a 5 $\mu\text{g/ml}$ y 36% ($P < 0.005$) a 10 μg of TEL.

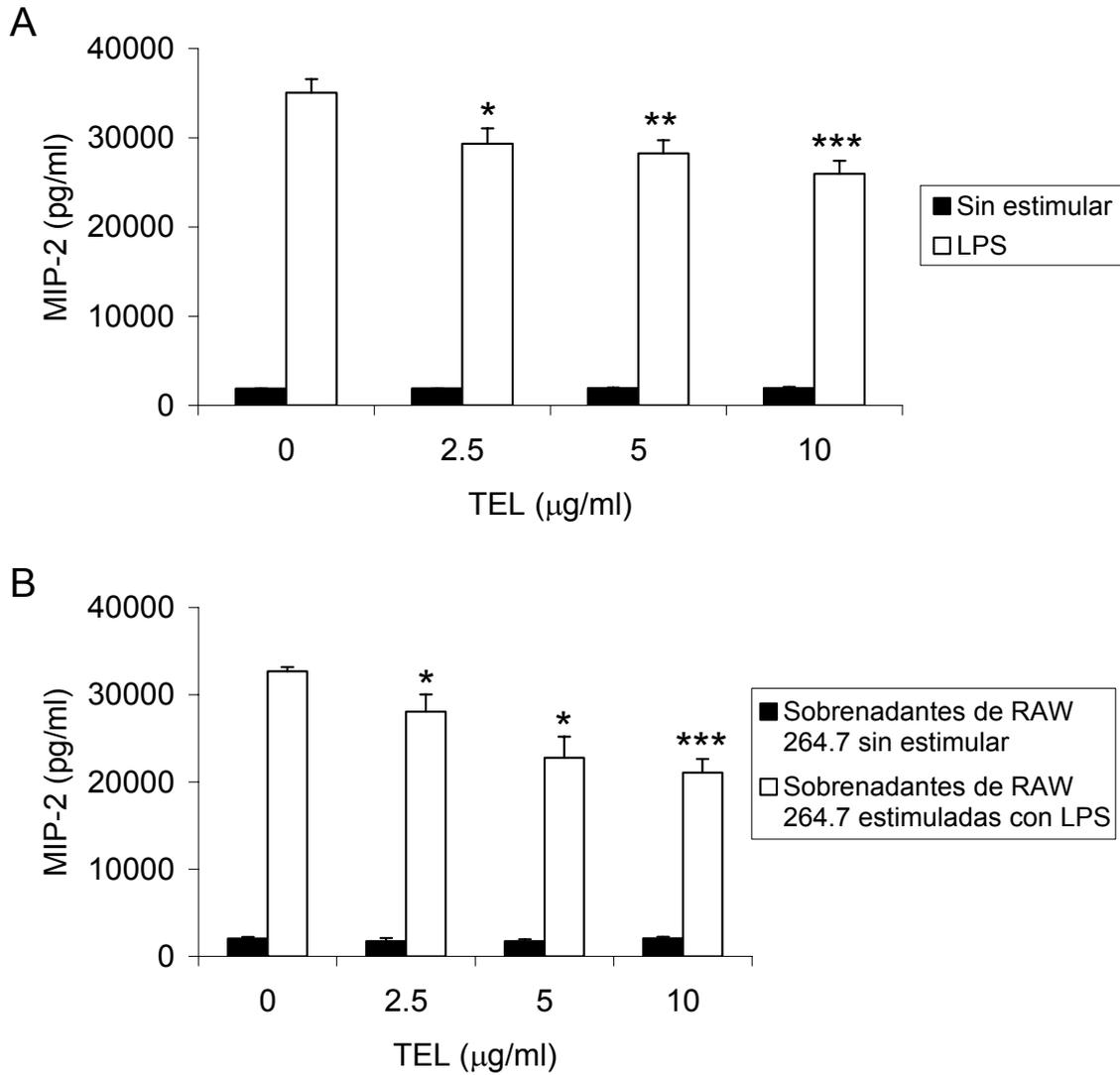


Figura 6.1. Efecto inhibitor de TEL en el modelo *in vitro* de inflamación respiratoria. Figura 6.1.A muestra la producción de MIP-2 por células RAW 264.7 sin estimular y estimuladas con LPS. **Figura 6.1.B** muestra la producción de MIP-2 por células MLE-12 incubadas con sobrenadantes de células RAW 264.7 sin estimular o estimuladas 24 h con LPS. Las concentraciones de MIP-2 presentes en los sobrenadantes de RAW 264.7 fueron sustraídas de los niveles de MIP-2 procedentes de los cultivos de MLE-12. Los resultados son las medias de los datos procedentes de tres cultivos. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos tratados con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$).

TNF- α es una monokina pro-inflamatoria que induce la respuesta de quimiokinas de las células epiteliales respiratorias (Barrett *et al.*, 1998; Standiford *et al.*, 1991). En nuestro modelo, los macrófagos RAW 264.7 produjeron TNF- α en respuesta a LPS, y esta producción fue inhibida de forma

significativa un 24% ($P < 0.05$), 36% ($P < 0.05$) y 54% ($P < 0.005$), 6 h después de la estimulación con LPS en cultivos pre-tratados con 2.5, 5, y 10 $\mu\text{g/ml}$ de TEL, respectivamente, 1 h antes de la estimulación (**Figura 6.2.A**). La inhibición persistió 24 h después de la estimulación, con unos niveles de supresión de 24% ($P < 0.05$), 35% ($P < 0.05$) y 46% ($P < 0.01$) obtenidos con 2.5, 5, y 10 $\mu\text{g/ml}$ de TEL, respectivamente (**Figura 6.2.B**).

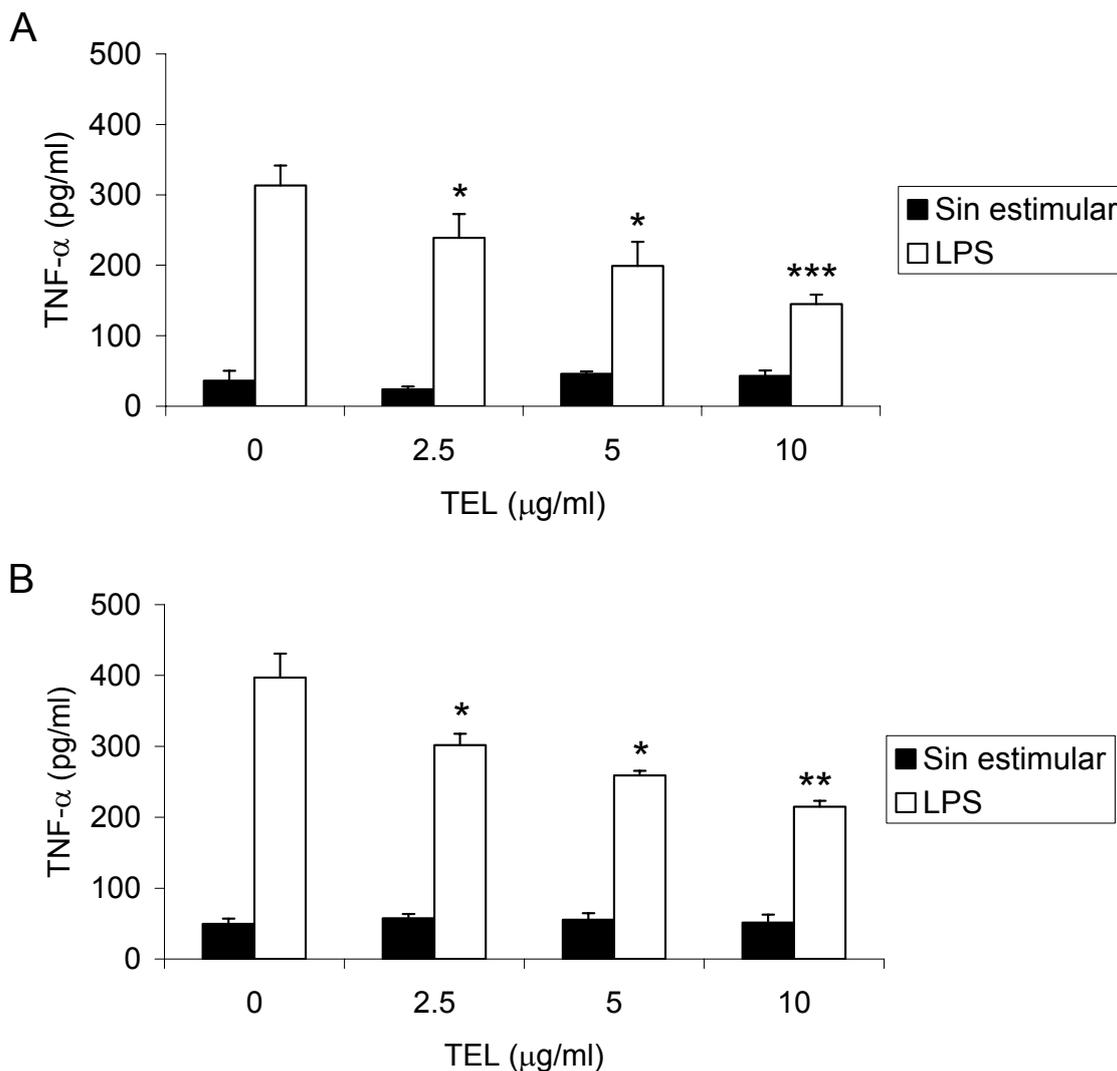


Figura 6.2. Inhibición por TEL de la producción de TNF- α por células RAW 264.7 sin estimular o estimuladas con LPS. Figura 6.2.A. representa los datos obtenido de células estimuladas 6 h. **Figura 6.2.B** representan a las células estimuladas con LPS 24 h. TEL se añadió a los cultivos celulares 1 h antes de la estimulación con LPS. Los resultados son las medias aritméticas de los datos procedentes de tres cultivos. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos con TEL fueron comparados con el respectivo cultivo sin TEL aplicando el test de la t de Student: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.005$.

6.3. Efecto de TEL en la activación de NF- κ B en macrófagos RAW 264.7 y células epitaliales MLE-12.

Dada la importancia del factor de transcripción NF- κ B en la regulación de la inflamación respiratoria (Poynter *et al.*, 2002), se estudió su papel en la actividad anti-inflamatoria de TEL. En primer lugar, se midió el efecto de TEL sobre la capacidad de unión de NF- κ B al DNA por ELISA en extractos nucleares de las células, 1 h después de su estimulación con LPS o sobrenadantes con TNF- α . El pre-tratamiento con TEL se llevó a cabo 12 h antes de la estimulación. Tras la exposición de los macrófagos RAW 264.7 a 2.5, 5, y 10 μ g/ml del ketólido, la capacidad de unión de NF- κ B al DNA se inhibió en un 26% ($P < 0.05$), 34% ($P < 0.01$) y 41% ($P < 0.005$), respectivamente (**Figura 6.3.A**). De forma similar, el pre-tratamiento con TEL redujo la capacidad de unión al DNA de NF- κ B en las células MLE-12 incubadas durante 1 h con sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Los niveles de inhibición en este caso fueron de 23% ($P < 0.05$) a 5 μ g/ml y 30% ($P < 0.05$) a 10 μ g de TEL (**Figura 6.3.B**).

La actividad inhibidora de TEL sobre la activación de NF- κ B fue confirmada con experimentos de transfección transitoria con pNF- κ B y western-blot. Los macrófagos RAW 264.7 transfectados fueron estimulados con LPS durante 24 h. TEL se adicionó 1 h antes de la estimulación. La activación de NF- κ B se inhibió en un 24% ($P < 0.05$) a 2.5 μ g/ml, 37% ($P < 0.01$) a 5 μ g/ml y 61% ($P < 0.005$) a 10 μ g de TEL (**Figura 6.4.A**).

Por otra parte, las células MLE-12 transfectadas fueron incubadas durante 24 h con los sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7 estimuladas con LPS. Aquellos cultivos que recibieron TEL 1 h de ser estimulados, mostraron poseer una inhibición en la activación de NF- κ B en un 25% ($P < 0.05$) a 2.5 μ g/ml, 49% ($P < 0.05$) a 5 μ g/ml y 61% ($P < 0.05$) a 10 μ g/ml de TEL (**Figura 6.4.B**). Esta inhibición también se observó mediante western-blot como muestra la **Figura 6.5**.

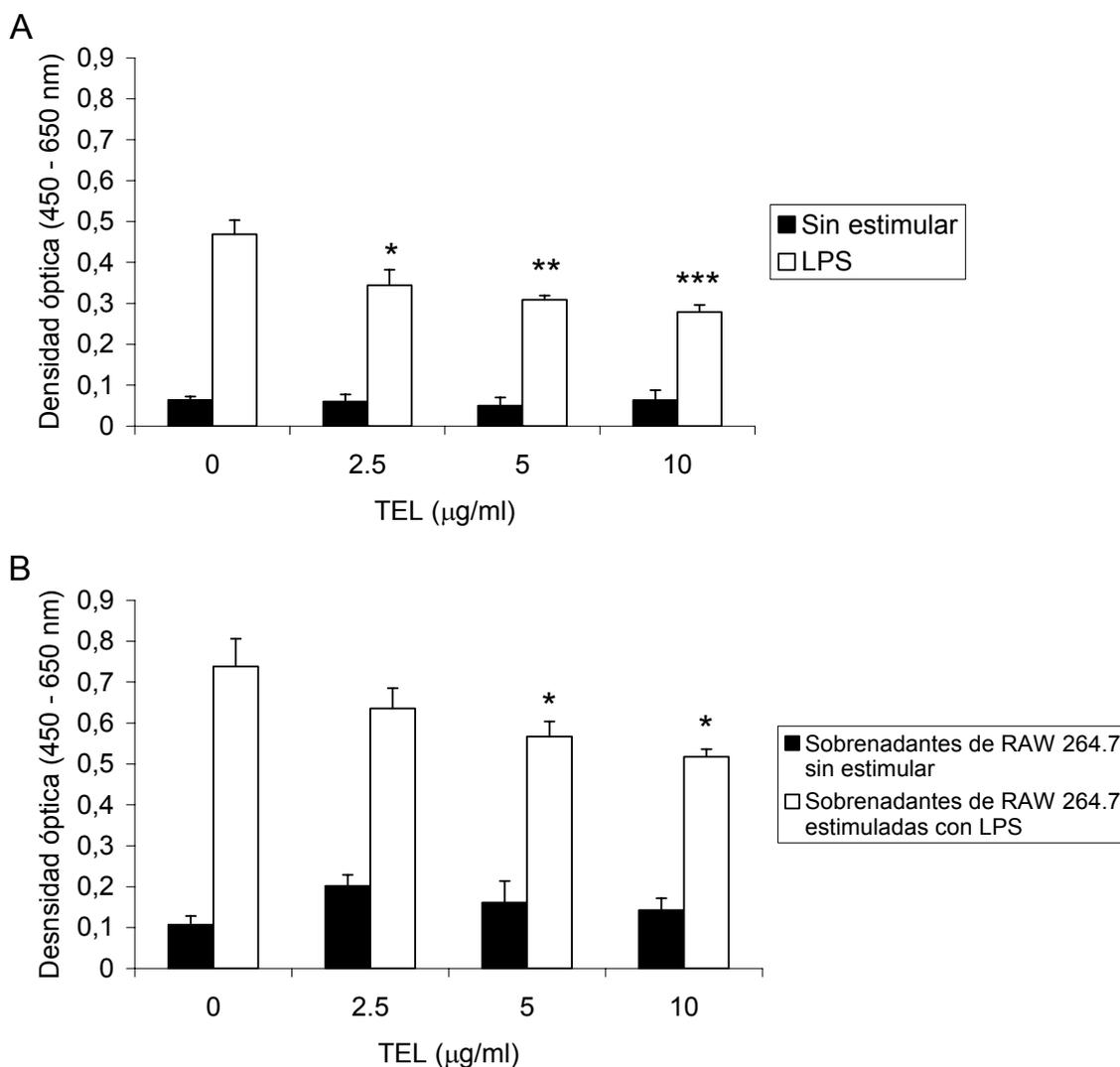


Figura 6.3. Efecto inhibitor de TEL en la capacidad de unión al DNA de NF-κB. La actividad de unión al DNA de NF-κB se determinó por ELISA en los extractos nucleares de células RAW 264.7 y células MLE-12. La unión de NF-κB (p65) al DNA fue examinada en los extractos nucleares con el inmunoensayo comercial descrito en el apartado 3.10.2 de Material y Métodos. **A** representa la actividad de NF-κB en células RAW 264.7 sin estimular y estimuladas con LPS. **B** representa la activación de NF-κB en la línea MLE-12 incubadas con sobrenadantes de cultivos de RAW 264.7 sin estimular o estimulados con LPS. Los resultados son las medias de los datos procedentes de tres cultivos. Se representan las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos tratados con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$).

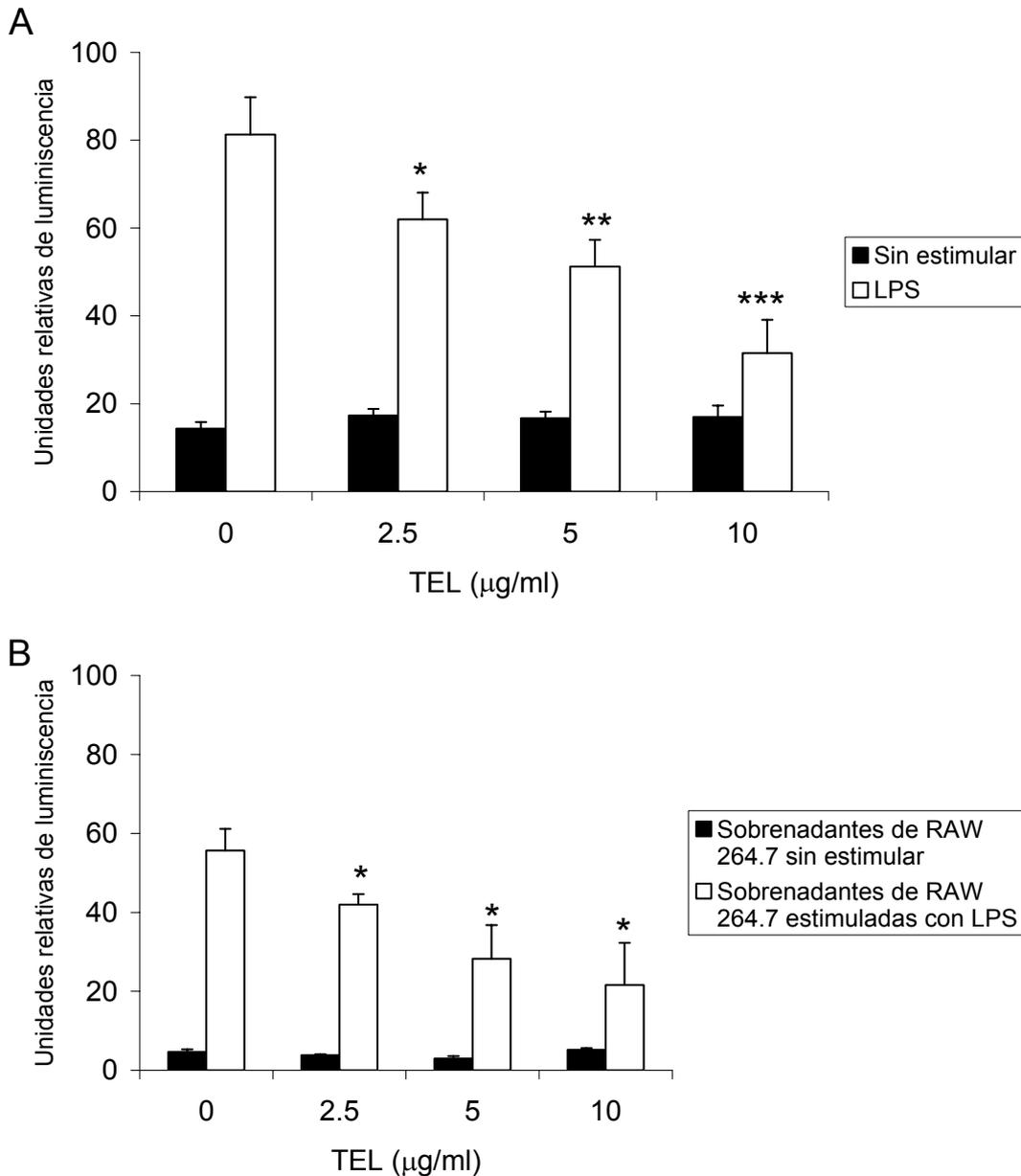


Figura 3.4. Efecto inhibitor de TEL en la activación de células RAW 264.7 y MLE-12 transfectadas transitoriamente con el vector reportero de luciferasa pNF-κB. A representa la activación de NF-κB en células RAW 264.7 sin estimular o estimuladas con LPS. **B** representa la activación de NF-κB en células MLE-12 incubadas con sobrenadantes de cultivos de RAW 264.7 sin estimular o estimulados con LPS. Los resultados son las medias de los datos procedentes de tres cultivos. Se representan las desviaciones estándar. Los cultivos tratados con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la t de Student (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$).

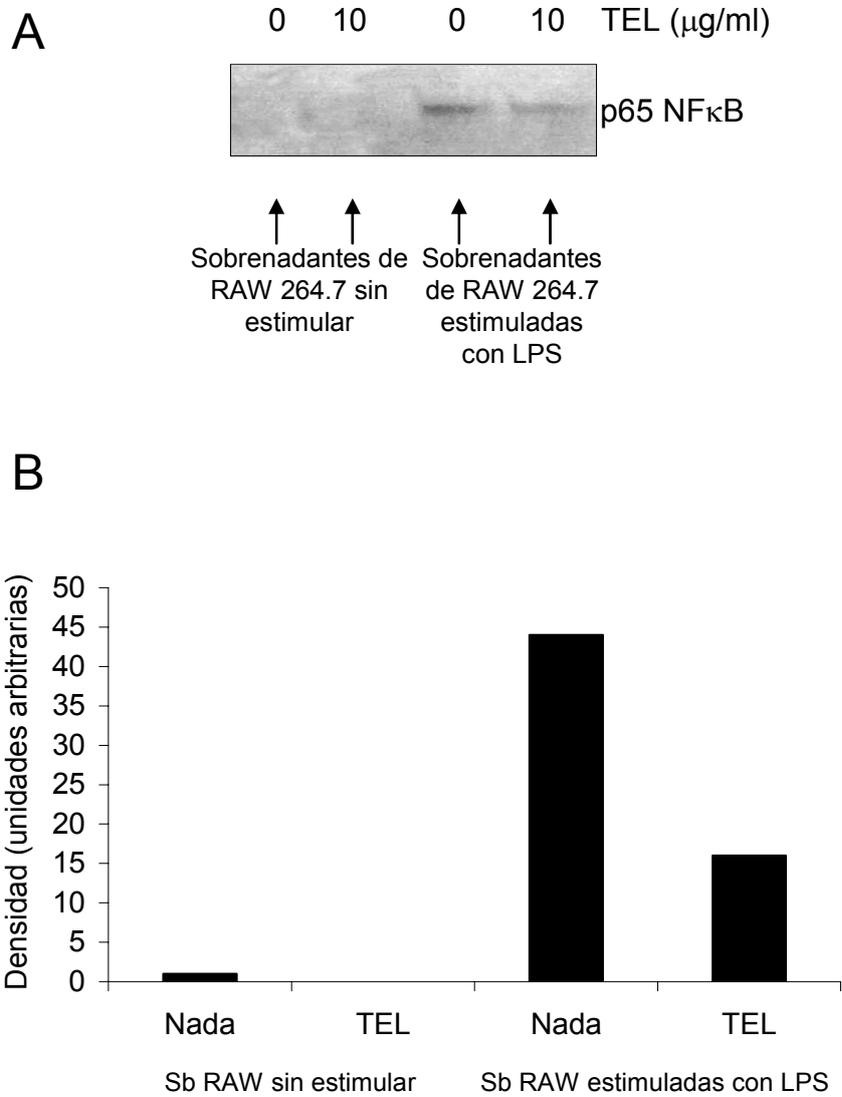


Figura 6.5. Efecto inhibitor de TEL en la activación de NF- κ B en células MLE-12. El Western-blot ilustra la activación de NF- κ B en células estimuladas durante 1 h con sobrenadantes de RAW 264.7 estimuladas o no con LPS, y pre-incubadas o no con TEL (10 $\mu\text{g/ml}$) (**A**). La densidad de las bandas inmunorreactivas se determinó con el programa Scion Image (**B**).

6.4. Efecto de TEL en la apoptosis de macrófagos RAW 264.7 y células epiteliales MLE-12

La apoptosis se considera como uno de los mecanismos que forma parte del proceso inflamatorio, en sus fases de resolución y remodelación tisular (Niinobu *et al.*, 2000). Para determinar si la modulación de la apoptosis jugaba un papel en la actividad anti-inflamatoria de TEL, se les indujo apoptosis a los macrófagos RAW 264.7 con LPS durante 24 h o con camptotecina (CAM) 5 h, y se cuantificó la fragmentación apoptótica de DNA. El pre-tratamiento con TEL (10 µg/ml) 1 h antes de la inducción de la apoptosis incrementó 1.23 veces la actividad apoptótica inducida por LPS ($P < 0.05$), y 1.34 veces la actividad apoptótica inducida por CAM ($P < 0.05$) (**Figura 6.6.**). De forma similar, se determinó el efecto de TEL en la apoptosis de las células epiteliales MLE-12 inducida con sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, durante 24 h, o con CAM, durante 5 h. En ambos casos, la actividad apoptótica se incrementó en los cultivos pre-tratados con TEL. Los incrementos fueron de 1.62 veces ($P < 0.005$) en la apoptosis inducida por sobrenadantes de los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, y de 1.29 ($P < 0.005$) en la apoptosis inducida por CAM ($P < 0.005$).

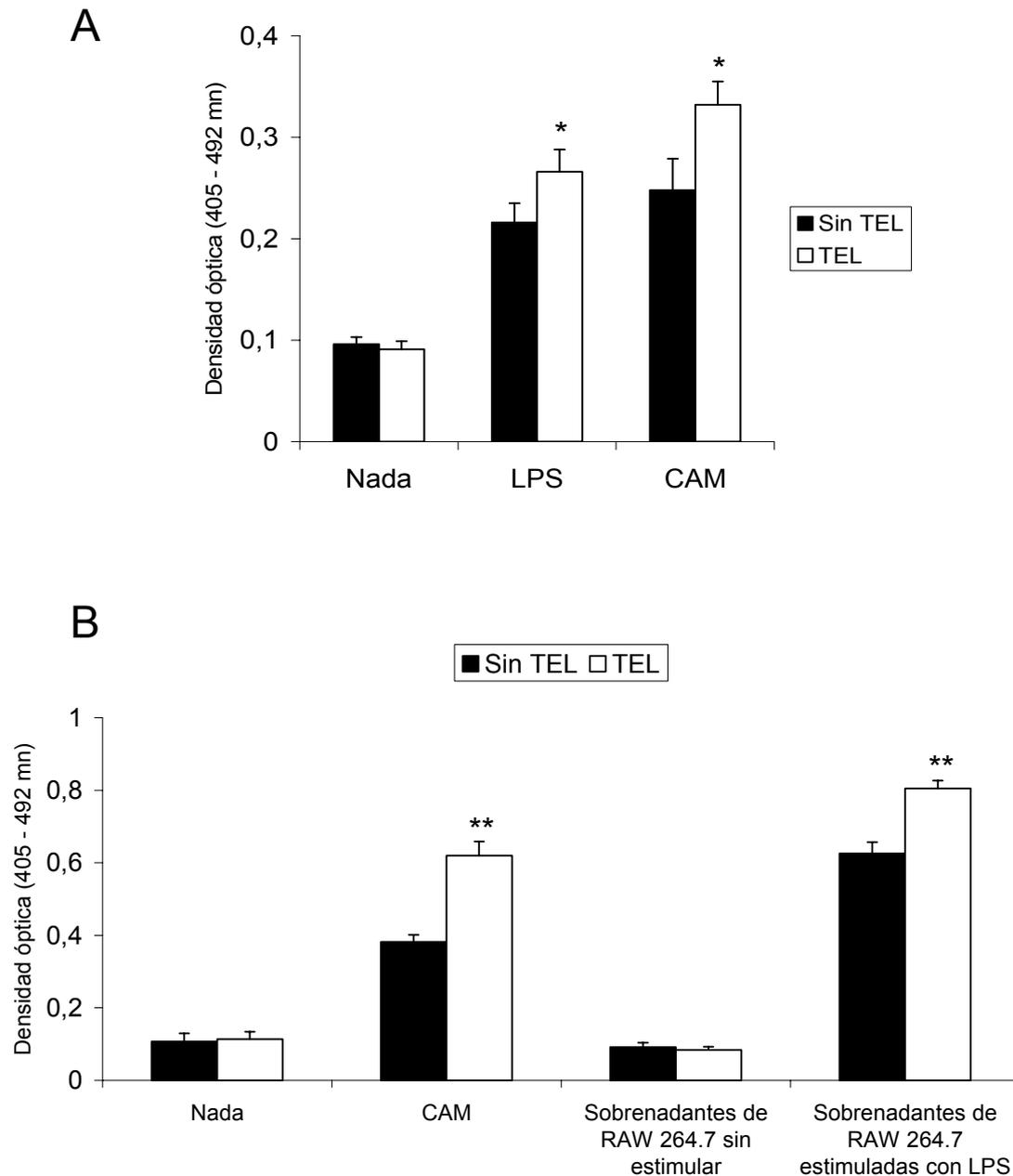


Figura 6.6. Efecto de TEL en la apoptosis en el modelo de inflamación respiratoria *in vitro*. Los mono- y oligonucleosomas generados durante la fragmentación apoptótica del DNA celular fueron cuantificados con un inmunoensayo comercial descrito en el apartado 3.11 de Material y Métodos. **A** muestra la inducción de apoptosis por LPS (24 h) o CAM (5 h) en células RAW 264.7 pre-tratadas 1 h antes con o sin TEL (10 µg/ml). **B** muestra la inducción de apoptosis por CAM (5 h) o sobrenadantes de células RAW 264.7 estimuladas con LPS (24 h), pre-tratadas 1 h antes con o sin TEL (10 µg/ml). Los resultados son las medias de los datos procedentes de tres cultivos. Se representan las desviaciones estándar de las medias. Los cultivos pre-tratados con TEL fueron comparados con los respectivos cultivos sin TEL aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$).

6.5. Discusión

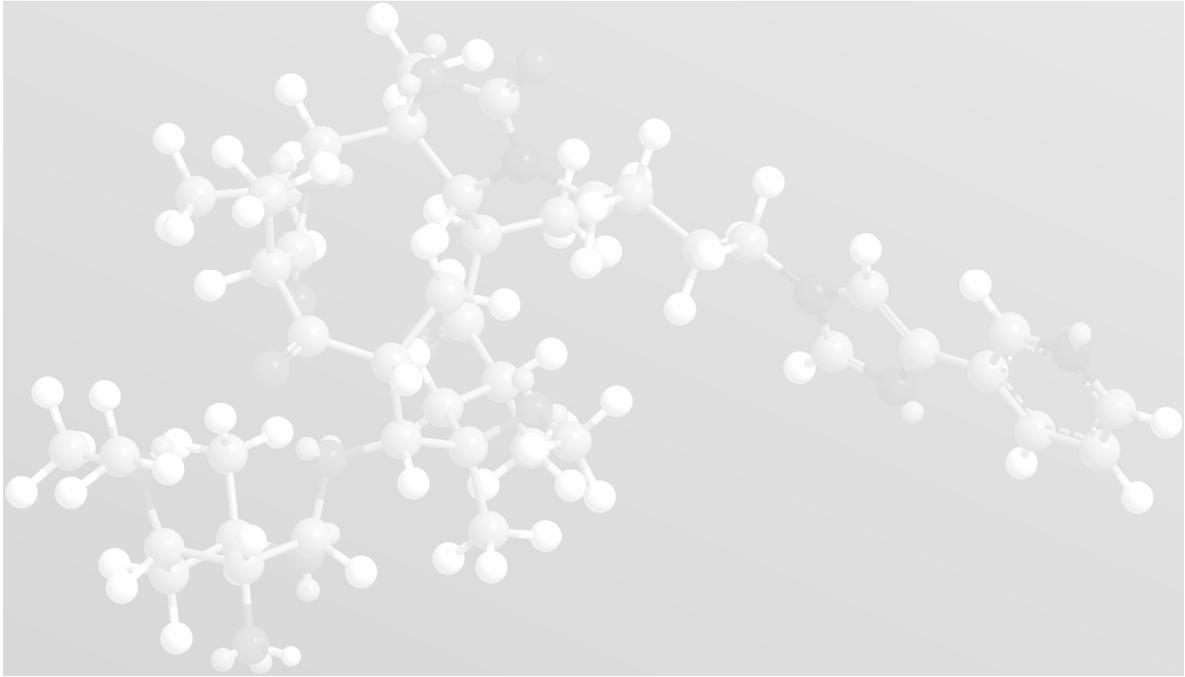
Tanto los macrófagos alveolares como las células epiteliales participan activamente en las reacciones inflamatorias que caracterizan a la mayoría de las enfermedades pulmonares. La recreación de la interacción *in vitro* macrófago-epitelio proporciona un modelo útil del inicio de la inflamación pulmonar (Standiford *et al.*, 1990; Tao y Kobzik, 2002). Aunque el papel de las células epiteliales alveolares en la orquestación de la inflamación respiratoria ha sido recientemente enfatizado (Poynter *et al.*, 2003; Skerrett *et al.*, 2004), nuestros resultados aportan evidencias de que los macrófagos responden directamente al LPS, mientras que las células epiteliales lo hacen a las monokinas inducidas por el LPS. Una secuencia similar ha sido descrita por otros autores (Standiford *et al.*, 1990). Una vez activados, los macrófagos y las células epiteliales producen numerosos mediadores pro-inflamatorios, incluyendo quimiokinas como MIP-2, una de las responsables del reclutamiento de neutrófilos. En el presente trabajo se encontró que TEL disminuye la producción de MIP-2 por los macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS y por la línea epitelial MLE-12 estimuladas por monokinas. TEL además, redujo la liberación de TNF- α por macrófagos estimulados con LPS. Este resultado tiene gran importancia debido a que el TNF- α es considerado un mediador principal en la estimulación de células epiteliales para producir MIP-2 (Barrett *et al.*, 1998; Standiford *et al.*, 1990).

El factor de transcripción NF- κ B juega un papel crucial en la respuesta inflamatoria, y su activación se vio inhibida por TEL tanto en los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, como en las células epiteliales MLE-12 estimuladas con monokinas. La activación de NF- κ B da lugar a la expresión de genes que codifican mediadores como TNF- α (Collart *et al.*, 1990) y MIP-2 (Driscoll *et al.*, 1995). Por ello, nuestros datos sugieren que TEL disminuyó la producción de ambas moléculas a través de la inhibición de la unión de NF- κ B al DNA.

TEL no es un inductor de la apoptosis, pero incrementó el proceso apoptótico en los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS y en las células epiteliales

MLE-12 estimuladas con monokinas. Tras su respectiva activación, los macrófagos y neutrófilos experimentan apoptosis como mecanismo que limita la capacidad de estas células inflamatorias a dañar los tejidos. La fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos suprimen la liberación de mediadores pro-inflamatorios e induce un estado anti-inflamatorio (Fadok *et al.*, 2001; Tassiulas *et al.*, 2007). Como consecuencia, la apoptosis de células inflamatorias y la eliminación de éstas por macrófagos constituyen uno de los mecanismos más importantes para la resolución de la inflamación (Savill y Fadok, 2000). Nuestros hallazgos sugieren que TEL podrían inhibir la producción de TNF- α y MIP-2 no únicamente a través de la inhibición de NF- κ B sino también incrementando la apoptosis. La inhibición de NF- κ B por TEL se observó una hora después de la estimulación con LPS o con sobrenadantes de macrófagos estimulados con LPS, y la disminución de la producción de TNF- α por los macrófagos RAW 264.7 fue significativa 6 h después de la estimulación con LPS. Por otra parte, se ha descrito que las células inflamatorias son eliminadas a través del proceso apoptótico al término de la respuesta inflamatoria (Savill, 1997). Parece entonces probable que TEL actúe en la fase temprana del proceso inflamatorio reduciendo la liberación de mediadores inflamatorios a través de la inhibición de NF- κ B, y en la fase tardía potenciando la apoptosis de células inflamatorias.

La estimulación de macrófagos con LPS induce apoptosis a través de vías NO-dependientes e independientes (Terenzi *et al.*, 1996; Boscá y Hortelano, 1999). La apoptosis de las células MLE-12 puede ser activada por TNF- α y por NO presente en los sobrenadantes de los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. TEL incrementa la apoptosis en ambos tipos celulares a pesar del hecho de que la liberación de mediadores inflamatorios como TNF- α se redujo a través de la inhibición de NF- κ B. Otros agentes que poseen actividad anti-inflamatoria también comparten la capacidad de inhibir la activación de NF- κ B y la de aumentar la apoptosis en células inflamatorias (Ward *et al.*, 1999; Hortelano *et al.*, 2000; Fitzpatrick *et al.*, 2001; Negrotto *et al.*, 2006).



7. RESULTADOS Y DISCUSION IV
Efecto anti-inflamatorio en un modelo *in vivo* de inflamación respiratoria

7.1. Efecto de TEL en la composición celular del BAL en el modelo *in vivo* de inflamación pulmonar aguda inducida por LPS

El modelo murino de inflamación respiratoria inducido por LPS es un modelo útil para evaluar el potencial anti-inflamatorio de numerosos agentes inmunomoduladores (Liaudet *et al.*, 2002). Se analizó el efecto de una única dosis de TEL (20 mg/kg de peso), administrada por vía intraperitoneal, en el reclutamiento de células a los pulmones tras la exposición al aerosol de LPS. Como se muestra en la **Figura 7.1.**, la inhalación de LPS provocó una acumulación masiva de leucocitos en BAL, y el análisis por citofluorimetría (**Figura 7.1 y Figura 7.2.**) reveló que las células acumuladas eran mayoritariamente neutrófilos (Gr-1 positivas). El pre-tratamiento con TEL 1 h antes de la nebulización de LPS indujo una reducción significativa en los recuentos de células totales y de neutrófilos 4 h después de la exposición a LPS ($P < 0.05$ en ambos casos) (**Figura 7.1.A y Figura 7.2**); la variación en el recuento de macrófagos (CD-14 positivas) fue insignificante. Efectos similares se observaron 24 h después de la nebulización con LPS ($P < 0.005$ en ambos casos) (**Figura 7.1.B**).

Paralelamente, se realizaron frotis de las muestras de BAL, para examinar las poblaciones celulares que fueron cuantificadas por citofluorimetría. Como era esperable, los resultados se correlacionaron con los obtenidos por citometría de flujo, aunque se prefirieron estos últimos por su mayor precisión. En la **Figura 7.3** se muestran algunas de las preparaciones realizadas, donde

pueden apreciarse los cambios poblacionales entre los ratones nebulizados con LPS y aquellos nebulizados con PBS.

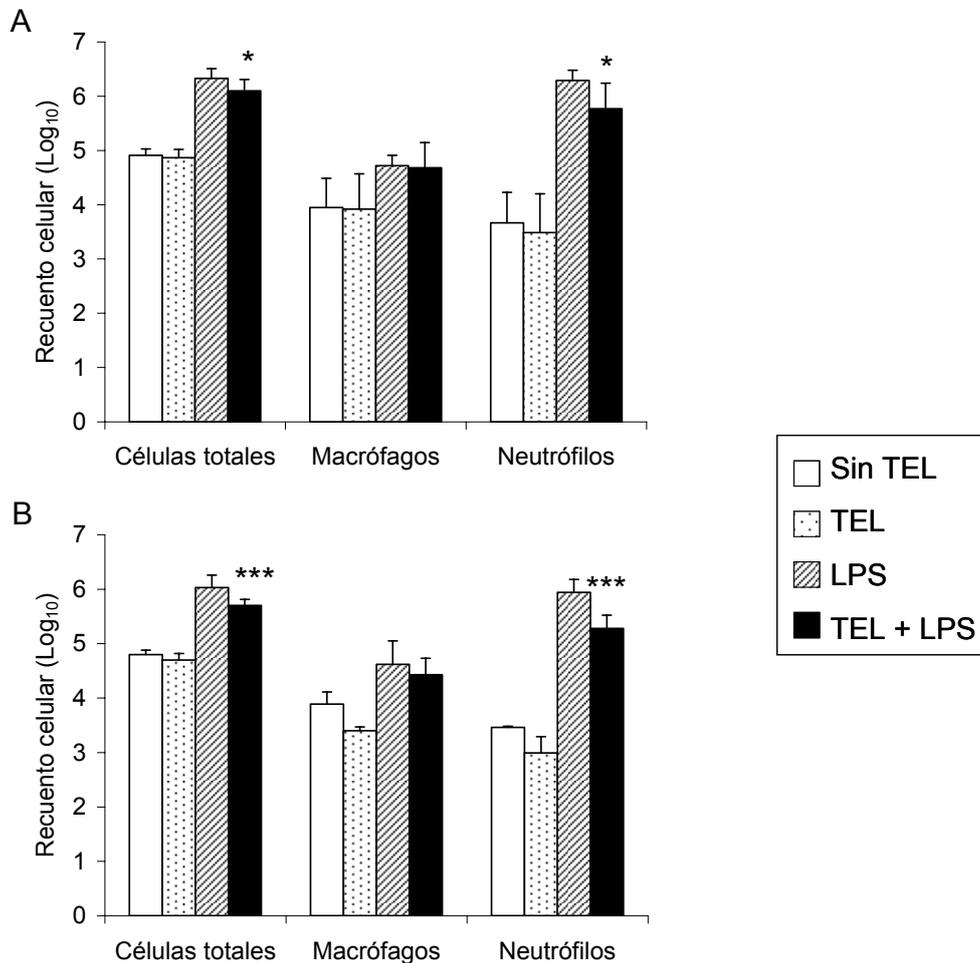


Figura 7.1. Efecto de TEL en la composición celular del BAL en el modelo *in vivo* de inflamación pulmonar aguda inducida por LPS. Figura 7.1.A representa los resultados en el BAL obtenido 4 h después de la inhalación de LPS. Figura 7.1.B representa los resultados 24 h después de la inhalación de LPS. Los controles sin tratar y los ratones tratados con TEL fueron expuestos a un aerosol de PBS; la concentración de LPS nebulizada para los ratones sin tratar y los tratados con TEL y LPS fue de 500 µg/ml. El pre-tratamiento con TEL (20 mg/kg) se administró por vía intraperitoneal 1 h antes de la nebulización. El número absoluto de macrófagos y neutrófilos se obtuvo como el producto del porcentaje de la citometría de flujo y los recuentos hemocitométricos de leucocitos totales. Los resultados son las medias de ocho animales. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los grupos pre-tratados con TEL fueron comparados con los respectivos grupos sin tratar aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$).

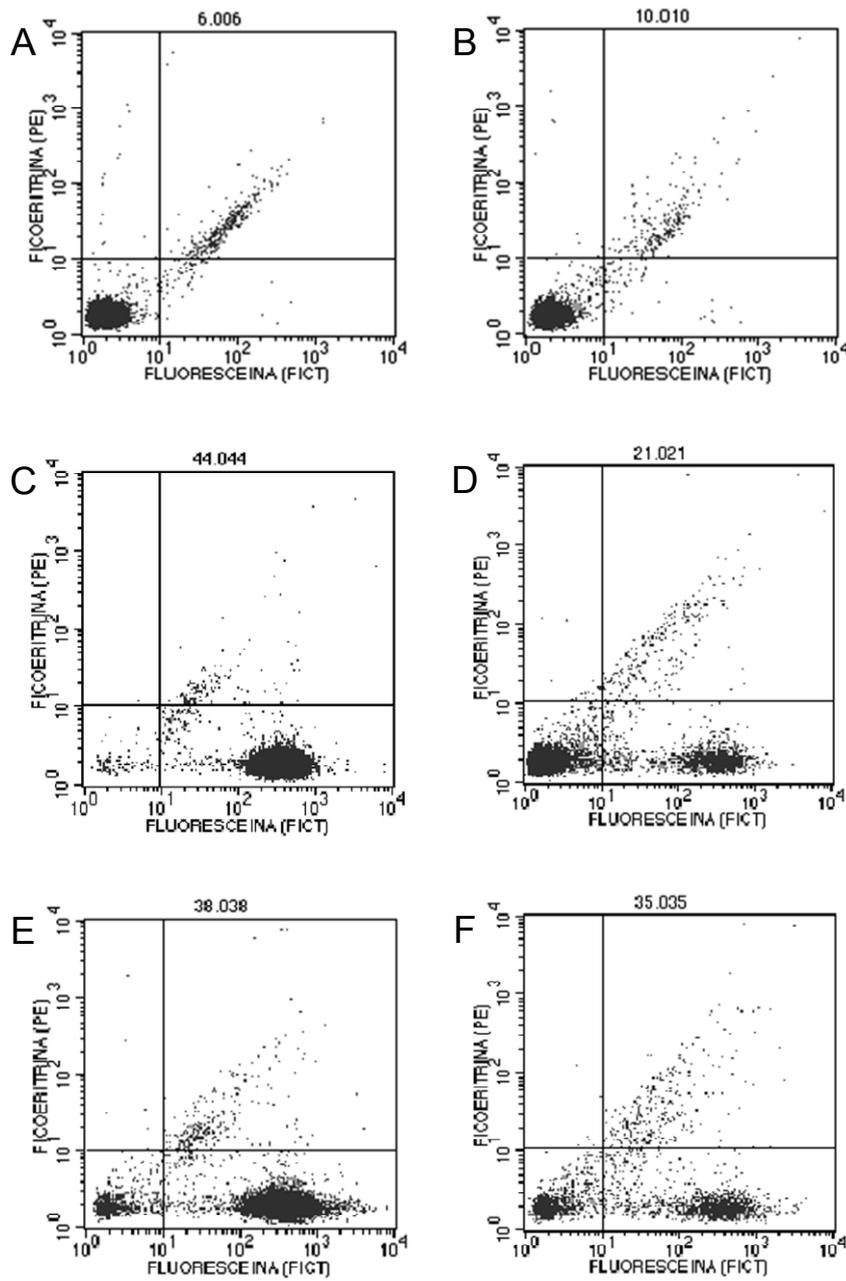


Figura 7.2. Citofluorimetría en BAL para células CD-14 positivas (PE) y Gr-1 (FICT) positivas. A representa el perfil de los ratones control. **B** representa el perfil de los tratados con TEL. **C** representa a los ratones 4 h después de la nebulización con LPS. **D** representa a los ratones 4 h después de la nebulización con LPS y pre-tratados con TEL. **E** representa a los ratones 24 h después de la nebulización con LPS. **F** representa a los ratones 24 h después de la nebulización con LPS y pre-tratados con TEL.

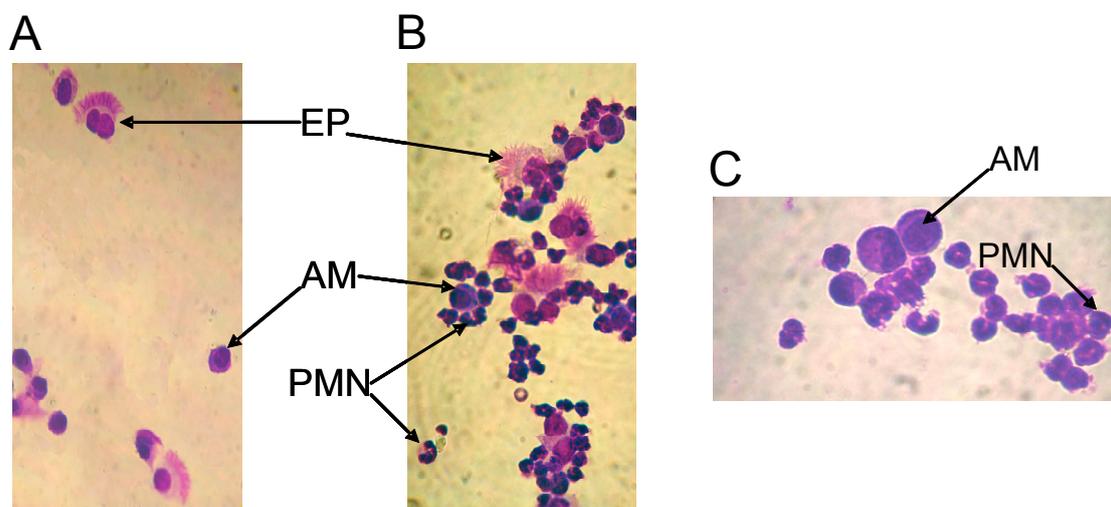


Figura 7.3. Extensiones de BAL teñidas para diferenciar las células nucleadas presentes. A corresponde a un frotis de ratones nebulizados con PBS. **B** y **C** son preparaciones de BAL de ratones nebulizados con LPS. **EP** corresponde a células o restos epiteliales. **AM** son los macrófagos alveolares. **PMN** corresponde a los polimorfonucleares neutrófilos.

7.2. Efectos de TEL en los niveles de proteínas, nitritos y citocinas en BAL de ratones nebulizados con LPS

El incremento de la concentración de proteínas en BAL indica el desarrollo de edema pulmonar, que caracteriza a la inflamación respiratoria aguda (Liaudet *et al.*, 2002). Los controles no tratados y los ratones que recibieron TEL, LPS o TEL mas LPS no difirieron de forma significativa en los niveles de proteínas en BAL en las primeras 4 h tras la exposición a LPS; sin embargo, 24 h después de la nebulización se produjo un fuerte incremento en la concentración de proteínas, la cual se redujo en un 25% ($P < 0.01$) en los ratones pre-tratados con TEL (**Figura 7.4.A**). De manera similar, en el BAL realizado 24 h después de la nebulización con LPS, otro marcador de la inflamación como los niveles de nitritos (metabolito estable del NO producido por la iNOS) se redujo en un 20% ($P < 0.05$) como consecuencia del pre-tratamiento con TEL (**Figura 7.4.B**).

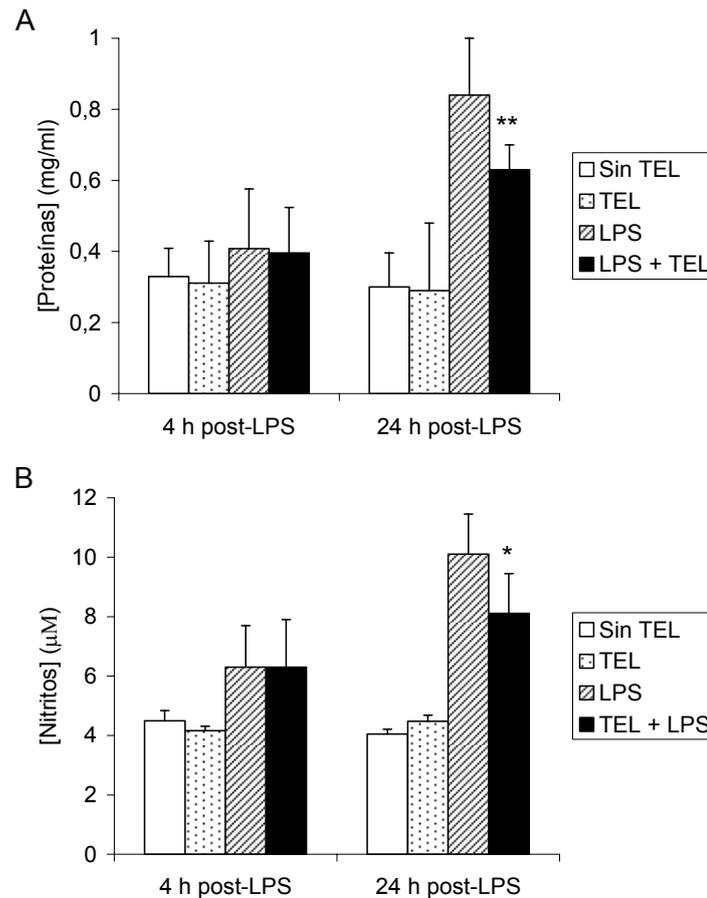


Figura 7.4. Efecto de TEL en las concentraciones de proteínas (A) y nitritos (B) en el modelo *in vivo* de inflamación pulmonar aguda inducida por LPS. Los controles sin tratar y los ratones tratados con TEL fueron expuestos a un aerosol de PBS; la concentración de LPS nebulizada para los ratones sin tratar y los tratados con TEL y LPS fue de 500 µg/ml. El pre-tratamiento con TEL (20 mg/kg) se administró por vía intraperitoneal 1 h antes de la nebulización. Los resultados son las medias de cinco animales. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los grupos pre-tratados con TEL fueron comparados con los respectivos grupos sin tratar aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Se determinaron también los niveles de dos citocinas relevantes en la inflamación respiratoria como son MIP-2 y TNF- α , en el BAL. Los niveles de MIP-2 se incrementaron de forma muy marcada a las 4 h y cayeron a las 24 h tras la exposición con LPS; en ambos casos, el pre-tratamiento con TEL redujo de forma significativa estos niveles (38%, $P < 0,05$, y 23%, $P < 0.05$, respectivamente) (**Figura 7.5.A**). Los niveles de TNF- α mostraron una cinética similar y fueron reducidos en un 49% ($P < 0.005$) y 60% ($P < 0.005$) en el BAL de los ratones pre-tratados con TEL sacrificados 4 y 24 h después de la nebulización con LPS, respectivamente (**Figura 7.5.B**).

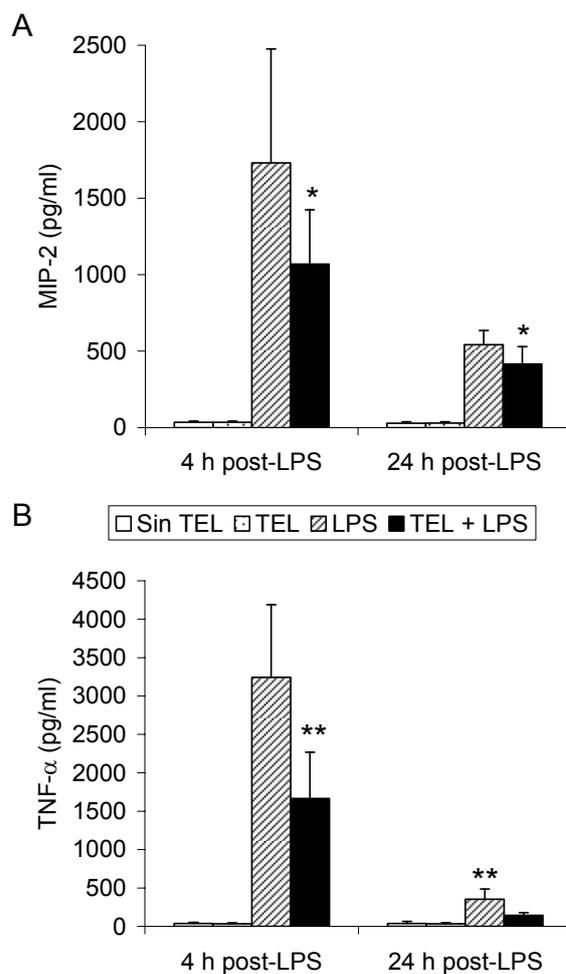


Figura 7.5. Efecto de TEL en la concentración de MIP-2 (A) y TNF- α (B) en el modelo *in vivo* de inflamación pulmonar aguda inducida por LPS. Los controles sin tratar y los ratones tratados con TEL fueron expuestos a un aerosol de PBS; la concentración de LPS nebulizada para los ratones sin tratar y los tratados con TEL y LPS fue de 500 μ g/ml. El pre-tratamiento con TEL (20 mg/kg) se administró por vía intraperitoneal 1 h antes de la nebulización. Los resultados son las medias de cinco animales. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los grupos pre-tratados con TEL fueron comparados con los respectivos grupos sin tratar aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$).

7.3. Efectos de TEL en los niveles plasmáticos de citocinas de ratones con inflamación pulmonar aguda inducida por LPS

MIP-2 y TNF- α se determinaron también en el plasma de ratones 4 y 24 h después de la exposición al aerosol de LPS. El pre-tratamiento con TEL redujo en un 40% ($P < 0.05$) los niveles de MIP-2 4 h después de la nebulización con LPS, pero el efecto 24 h post-LPS no fue significativo (**Figura 7.6.A**). De forma similar, TEL redujo en un 58% ($P < 0.01$) los niveles de TNF- α las 4 h de la exposición con LPS (**Figura 7.6.B**).

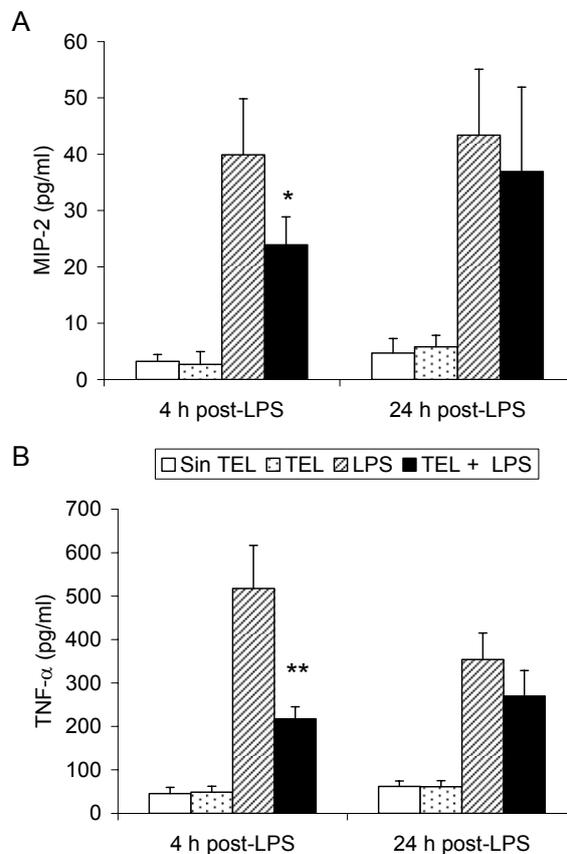


Figura 7.6. Efecto de TEL en las concentraciones plasmáticas de MIP-2 (A) y TNF- α (B) en el modelo *in vivo* de inflamación pulmonar aguda inducida por LPS. Los controles sin tratar y los ratones tratados con TEL fueron expuestos a un aerosol de PBS; la concentración de LPS nebulizada para los ratones sin tratar y los tratados con TEL y LPS fue de 500 $\mu\text{g/ml}$. El pre-tratamiento con TEL (20 mg/kg) se administró por vía intraperitoneal 1 h antes de la nebulización. Los resultados son las medias de cinco animales. Se muestran las desviaciones estándar de las medias. Los grupos pre-tratados con TEL fueron comparados con los respectivos grupos sin tratar aplicando el test de la *t* de Student (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

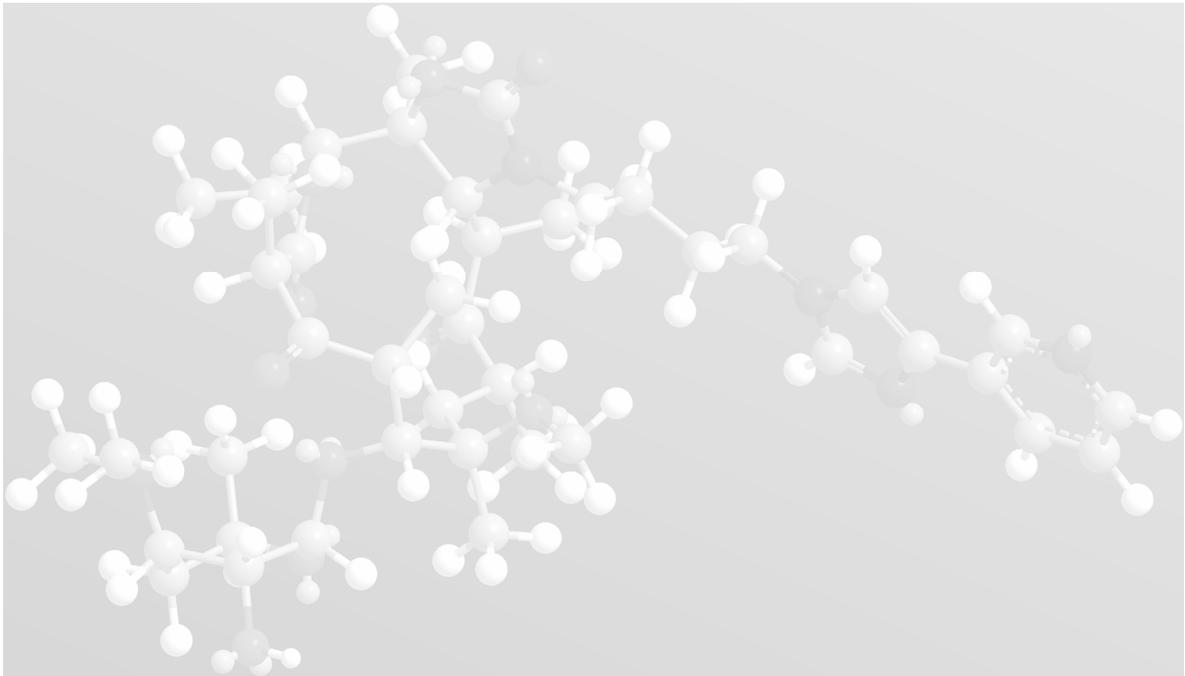
7.4. Discusión

La administración intratraqueal *in vivo* de LPS ha sido aceptada como un modelo clínicamente relevante de la inflamación pulmonar severa (Liaudet *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos *in vivo* se correlacionaron con los datos *in vitro* y demostraron que TEL ejerce potentes efectos anti-inflamatorios en la inflamación inducida por LPS. La exposición de los ratones al aerosol de LPS produjo una temprana oleada de la quimiokina MIP-2 en el BAL 4 h después de la exposición a LPS. Este hecho se correlacionó con un reclutamiento masivo de neutrófilos en las vías respiratorias, lo cual fue detectable a las 4 h y persistió 24 h después de la exposición a LPS. El pre-tratamiento de los ratones con TEL redujo de forma significativa los niveles de MIP-2 y la afluencia de neutrófilos en el BAL. Además, la producción de TNF- α inducida por LPS también fue inhibida por TEL. MIP-2 y TNF- α son dos citocinas de expresión temprana tras el desafío con LPS en el pulmón (Xing *et al.*, 1994), y los posibles efectos de TEL en los mediadores inflamatorios tardíos y en la inflamación crónica no nos son conocidos. Cabe mencionar al respecto que en un modelo murino de micoplasmosis pulmonar crónica, tanto los macrófagos como los neutrófilos, pero no los linfocitos, fueron reducidos en los infiltrados tras el tratamiento con TEL durante 10 días (Fonseca-Aten *et al.*, 2006). Esta selectividad de acción puede explicar por qué, en otro modelo murino de infección respiratoria crónica por *Pseudomonas aeruginosa*, TEL no tuvo ningún efecto en la proliferación de linfocitos (Yanagihara *et al.*, 2007).

Los ratones expuestos a LPS presentaron un alto contenido en proteínas en el BAL, indicando el desarrollo de edema pulmonar (Liaudet *et al.*, 2002). Una mejora significativa en el edema pulmonar se produjo en los ratones tratados con TEL 24 h después de la nebulización con LPS. Este efecto podría estar relacionado con la inhibición del reclutamiento de neutrófilos, debido a que los neutrófilos están considerados como efectores celulares primarios del daño alveolocapilar en el daño pulmonar agudo (Heflin y Brigham, 1981). Además, TEL suprimió de forma significativa la activación local de iNOS, como reveló la disminución de los niveles de nitritos en el BAL de los ratones pre-tratados con TEL.

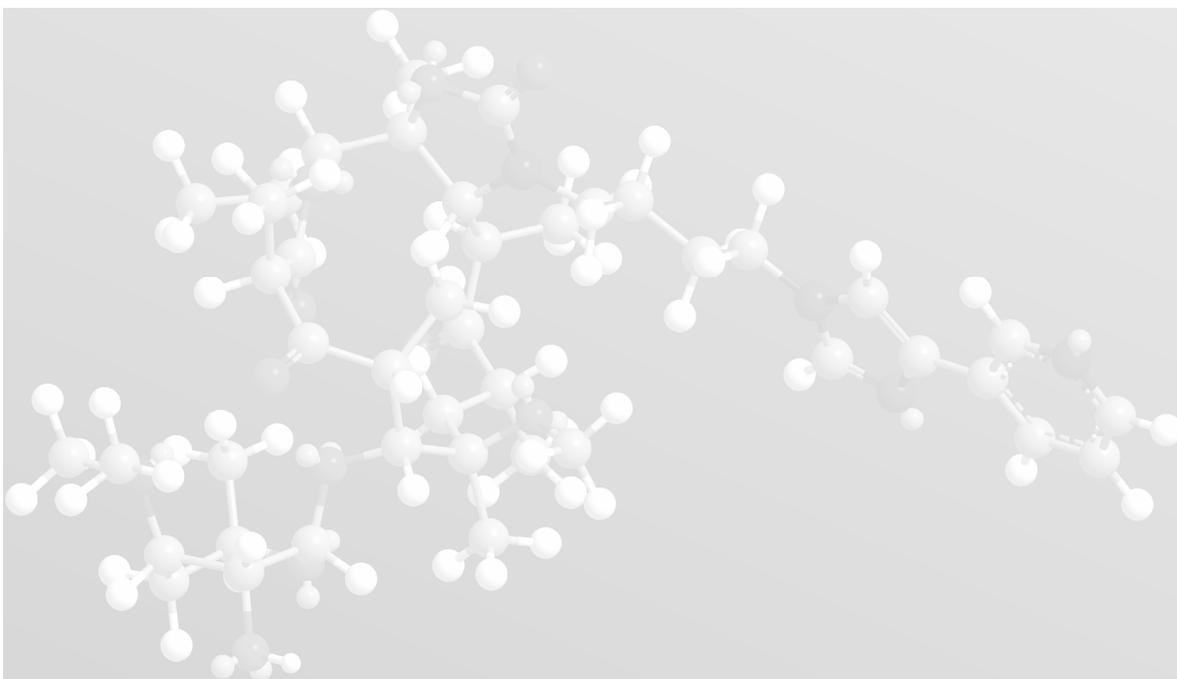
Los niveles plasmáticos de MIP-2 y TNF- α también se incrementaron después de la nebulización con LPS aunque fueron marcadamente menores que en el BAL. Probablemente, los niveles sistémicos de ambas moléculas fueron consecuencia de la producción local en los pulmones tras la exposición a LPS. TEL disminuyó significativamente los niveles plasmáticos de MIP-2 y TNF- α 4 h después de la exposición a LPS, pero el efecto inhibitor del ketólido perdió la significación estadística a las 24 h de la exposición.

Los resultados presentados en este y en el anterior capítulo demuestran que TEL ejerce marcados efectos anti-inflamatorios en la inflamación respiratoria inducida por LPS. Se proponen dos mecanismos: TEL disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias y de mediadores pro-inflamatorios por macrófagos y células epiteliales a través de la inhibición de NF- κ B, e incrementa la apoptosis en macrófagos activados y células epiteliales. Ambos mecanismos han sido descritos en macrólidos relacionados estructuralmente. La azitromicina reduce la producción *in vitro* de TNF- α a través de la inhibición de la unión NF- κ B al DNA (Cigana *et al.*, 2007). La claritromicina (Hardy *et al.*, 2003) y la roxitromicina (Urasaki *et al.*, 2005) reducen la producción *in vivo* de TNF- α y de otros mediadores inflamatorios. La apoptosis de linfocitos activados es aumentada por roxitromicina (Ogawa *et al.*, 2003), claritromicina y azitromicina (Kadota *et al.*, 2005), mientras que la eritromicina acelera la apoptosis de neutrófilos (Aoshiba *et al.*, 1995). En conclusión, TEL es un antibiótico ketólido que comparte con los macrólidos propiedades anti-inflamatorias, lo que añade nuevas perspectivas en el tratamiento de infecciones respiratorias.



8. CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados presentados en este estudio demuestran que TEL ejerce marcados efectos anti-inflamatorios en la inflamación respiratoria inducida por LPS. Se proponen dos mecanismos: TEL disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias y de mediadores pro-inflamatorios por macrófagos y células epiteliales a través de la inhibición de NF- κ B, e incrementa la apoptosis en macrófagos activados y células epiteliales. Ambos mecanismos han sido descritos en macrólidos relacionados estructuralmente. La azitromicina reduce la producción *in vitro* de TNF- α a través de la inhibición de la unión NF- κ B al DNA (Cigana *et al.*, 2007). La claritromicina (Hardy *et al.*, 2003) y la roxitromicina (Urasaki *et al.*, 2005) reducen la producción *in vivo* de TNF- α y de otros mediadores inflamatorios. La apoptosis de linfocitos activados es aumentada por roxitromicina (Ogawa *et al.*, 2003), claritromicina y azitromicina (Kadota *et al.*, 2005), mientras que la eritromicina acelera la apoptosis de neutrófilos (Aoshiba *et al.*, 1995). En conclusión, TEL es un antibiótico ketólido que comparte con los macrólidos propiedades anti-inflamatorias, lo que añade nuevas perspectivas en el tratamiento de infecciones respiratorias.



9. CONCLUSIONES

El trabajo realizado sustenta las siguientes conclusiones:

PRIMERA: La telitromicina modula la respuesta *in vitro* de los esplenocitos murinos en respuesta a mitógenos de células B y T, estimulando moderadamente la proliferación de ambas poblaciones de linfocitos, inhibiendo la producción de interferón gamma inducida por concanavalina A e incrementando la de interleukina 10 en respuesta a lipopolisacárido.

SEGUNDA: La telitromicina no induce apoptosis en esplenocitos activados por mitógenos, pero amplifica la apoptosis causada por un inductor estándar como la camptotecina.

TERCERA: Los macrófagos se presentan como una de las poblaciones celulares “dianas” de la inmunomodulación por telitromicina, que inhibe la producción de factor necrosante de tumores alfa en respuesta a lipopolisacárido, a través de la inhibición de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1.

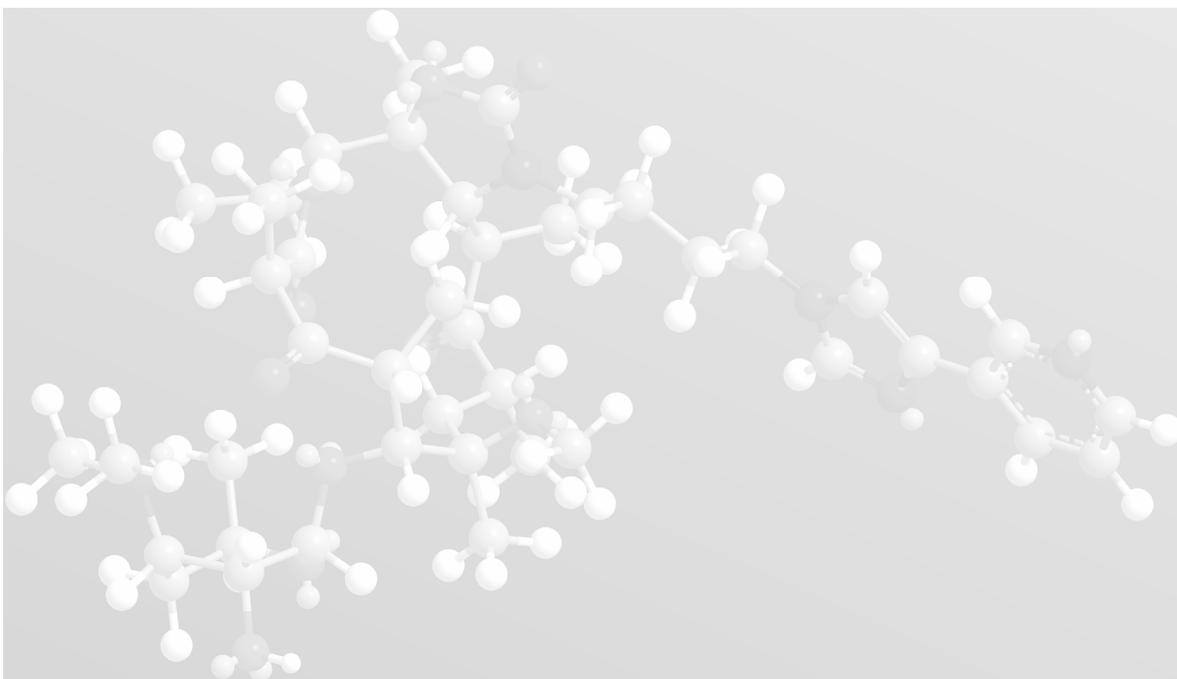
CUARTA: En un modelo de shock endotóxico en ratones BALB/c, la telitromicina ejerce un notable efecto protector frente a la letalidad causada por la administración de lipopolisacárido, protección que se asocia a una disminución de los niveles plasmáticos de mediadores de inflamación (citokinas pro-inflamatorias y óxido nítrico) y a un incremento de la citokina anti-inflamatoria interleukina 10.

QUINTA: En un modelo *in vitro* de inflamación respiratoria que reproduce la acción de macrófagos estimulados por lipopolisacárido sobre células epiteliales alveolares, la telitromicina ejerce un efecto anti-inflamatorio a tres niveles: (1º), inhibición de la producción de la quimiokina MIP-2 por los macrófagos estimulados por LPS; (2º), inhibición de la producción de factor necrosante tumoral alfa por los macrófagos estimulados, estando esta considerada como una de las principales monokinas responsables de la activación de células epiteliales por macrófagos; y (3º), inhibición de la producción de MIP-2 por células epiteliales en respuesta a citokinas pro-inflamatorias (principalmente factor necrosante de tumores alfa) liberadas por los macrófagos activados.

SEXTA: La acción inhibidora de la telitromicina sobre los dos tipos de células, macrófagos y células epiteliales, que constituyen el modelo de inflamación respiratoria *in vitro*, es atribuible, en una fase temprana, a la inhibición de la activación de NF-kappa B, y en una fase posterior, a la amplificación de la apoptosis en estas células.

SÉPTIMA: En un modelo *in vivo* de inflamación respiratoria aguda inducida por aspiración de un aerosol de lipopolisacárido, el pre-tratamiento de los animales con telitromicina tuvo claros efectos anti-inflamatorios: (1º) inhibió el reclutamiento de neutrófilos en el líquido de lavado pulmonar; (2º) disminuyó asimismo los niveles de mediadores pro-inflamatorios y de proteínas totales (reveladoras de edema) en dicho fluido. Paralelamente, disminuyeron también los niveles plasmáticos de las citokinas medidas (factor necrosante de tumores alfa y MIP-2).

OCTAVA: La conclusión final de este trabajo es que la actividad anti-inflamatoria, distinta de la actividad anti-microbiana, es un componente importante de los efectos terapéuticos del ketólido telitromicina.



10. BIBLIOGRAFÍA

Abe S., Nakamura H., Inoue S., Takeda H., Saito H., Kato S., Mukaida N., Matsushima K. y Tomoike H. 2000. Interleukin-8 gene repression by clarithromycin is mediated by the activator protein-1 binding site in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**:51-60.

Abeyama K., Kawahara K., Iino S., Hamada T., Arimura S., Matsushita K., Nakajima T. y Maruyama I. 2003. Antibiotic cyclic AMP signaling by “primed” leukocytes confers anti-inflammatory cytoprotection. *J. Leukoc. Biol.* **74**:908-915.

Ackermann G. y Rodloff A.C. 2003. Drugs of the 21st century: telithromycin (HMR 3647) – the first ketolide. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:497-511.

Akamatsu H., Yamawaki M. y Horio T. 2001. Effects of roxithromycin on adhesion molecules expressed on endothelial cells of the dermal microvasculature. *J. Int. Med. Res.* **29**:523-527.

Amayasu H., Yoshida S., Ebana S., Yamamoto Y., Nishikawa T., Shoji T., Nakagawa H., Hasegawa H., Nakabayashi M. y Ishizaki Y. 2000. Clarithromycin suppresses hyperresponsiveness associated with eosinophilic inflammation in patients with asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **84**:594-598.

Amsden G.W. 2005. Anti-inflammatory effects of macrolides-an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions?. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:10-21.

Anderson K.V., Jurgens G. y Nüsslein-Volhard C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell.* **42**:779-789.

Aoki Y. y Kao P.N. 1999. Erythromycin inhibits transcriptional activation of NF-kappaB, but not NFAT, through calcineurin-independent signaling in T cell. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2678-2684.

Aoshiba K., Nagai A. y Konno K. 1995. Erythromycin shortens neutrophil survival by accelerating apoptosis. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39**:872-877.

Araujo F.G., Slifer, T.L. y Remington J.S. 2002. Inhibition of secretion of interleukin-1alpha and tumor necrosis factor alpha by the ketolide antibiotic telithromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3327-3330.

Arnalich F., García-Palomero E., López J., Jiménez M., Madero R., Renart J., Vázquez J.J., Montiel C. 2000. Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect. Immun.* **68**:1942-1945.

Asano K., Kamakazu K., Hisamitsu T. y Suzaki H. 2001. Modulation of Th2 type cytokine production from human peripheral blood leukocytes by a macrolide antibiotic, roxithromycin, *in vitro*. *Int. Immunopharmacol.* **1**:1913-1921.

Baeuerle P.A. y Henkel T. 1994. Function and activation of NF-kappaB in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:141-179.

Baldwin A.S. Jr. 1996. The NF-kappaB and I kappaB proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:649-683.

Ban H.S., Suzuki K., Lim S.S., Jung S.H., Lee S., Ji J., Lee H.S., Lee Y.S., Shin K.H. y Ohuchi K. 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha by 2'-hydroxychalcone derivatives in RAW 264.7 cells. *Biochem. Pharmacol.* **67**:1549-1557.

Barrett E.G., Johnston C., Oberdörster G. y Finkelstein J.N. 1998. Silica-induced chemokine expression in alveolar type II cells is mediated by TNF-alpha. *Am. J. Physiol.* **275**:L1110-L1119.

Basygit I., Yildiz F., Ozkara S.K., Yildirim E., Boyaci H. y Ilgazli A. 2004. The effect of clarithromycin on inflammatory markers in chronic obstructive pulmonary disease: preliminary data. *Ann. Pharmacother.* **38**:1400-1405.

Bentley R. y Bennett J.W. 1999. Constructing polyketides: from Collie to combinatorial biosynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**:411-446.

Beuther D.A. y Martin R.J. 2004. Antibiotics in asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **4**:132-138.

Bin X.X., Wolf K., Schaffner T. y Malinverni R. 2000. Effect of azithromycin plus rifampin versus amoxicillin alone on eradication and inflammation in the chronic course of *Chlamydia pneumoniae* pneumonitis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1761-1764.

Boehm U., Klamp T., Groot M. y Howard J.C. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:749-795.

Bonizzi G. y Karin M. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**:280-288.

Borszcz P.D., Befus D., Moqbel R., Sin D.D., Adamko D.J., Man S.F. y Lacy P. 2005. Effects of clarithromycin on inflammatory cell mediator release and survival. *Chemotherapy*. **51**:206-210.

Boscá L. y Hortelano S. 1999. Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell. Signal*. **11**:239-244.

Bryskier A. 2000. Ketolides – telithromycin, an example of a new class of antibacterial agents. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**:661-669.

Bui K.Q., Banevicius M.A., Nightingale C.H., Quintiliani R. y Nicolau D.P. 2000. *In vitro* and *in vivo* influence of adjunct clarithromycin on the treatment of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:57-62.

Burns K., Clatworthy J., Martin L., Martinon F., Plumpton C., Maschera B., Lewis A., Ray K., Tschopp J. y Volpe F. 2000. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat. Cell Biol.* **2**:346-351.

Burns K., Martinon F., Esslinger C., Pahl H., Schneider P., Bodmer J.L., Di Marco F., French L. y Tschopp J. 1998. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* **273**:12203-12209.

Butler L.D., Layman N.K., Cain R.L., Riedl P.E., Mohler K.M., Bobbitt J.L., Belagajie R., Sharp J. y Bendele A.M. 1989. Interleukin 1-induced pathophysiology: induction of cytokines, development of histopathologic changes, and immunopharmacologic intervention. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **53**:400-21.

Cao S., Zhang X., Edwards J.P. y Mosser D.M. 2006. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* **281**:26041-26050.

Carrasco D., Ryseck R.P. y Bravo R. 1993. Expression of relB transcripts during lymphoid organ development: specific expression in dendritic antigen-presenting cells. *Development*. **118**:1221-1231.

Casaulta C., Schoni M.H., Weichel M., Cramer R., Jutel M., Daigle I., Akdis M., Blaser K y Akdis C.A. 2003. IL-10 controls *Aspergillus fumigatus*- and *Pseudomonas aeruginosa*-specific T-cell response in cystic fibrosis. *Pediatr. Res.* **53**:313-319.

Chang L. y Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature*. **410**:37-40.

Changhua L., Jindong Y., Defa L., Lidan Z., Shiyan Q. y Jianjun X. 2005. Conjugated linoleic acid attenuates the production and gene expression of proinflammatory cytokines in weaned pigs challenged with lipopolysaccharide. *J. Nutr.* **135**:239-244.

Chow L.W., Yuen K.Y., Woo P.C., y Wei W.I. 2000. Clarithromycin attenuates mastectomy-induced acute inflammatory response. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**:925-931.

Cigana C., Assael B.M. y Melotti P. 2007. Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:975-981.

Cigana C., Nicolis E., Pasetto M., Assael B.M. y Melotti P. 2006. Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**:977-982.

Clement A., Tamalet A., Leroux E., Ravilly S., Fauroux B. y Jais J.P. 2006. Long-term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis: a double blind, placebo controlled trial. *Thorax*. **61**:895-902.

Collart M.A., Baeuerle P. y Vassalli P. 1990. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* **10**:1498-1506.

Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* **284**:1318-1322.

Culić O., Eraković V. y Parnham M.J. 2001. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *Eur. J. Pharmacol.* **429**:209-229.

Culić O., Eraković V., Cepelak I., Barisić K., Brajsa K., Ferencić Z., Galović R., Glojnarić I., Manojlović Z., Munić V., Novak-Mircetić R., Pavicic-Beljak V., Sucić M., Veljaca M., Zanić-Grubisić T. y Parnham M.J. 2002. Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *Eur. J. Pharmacol.* **450**:277-289.

Donabedian H. 2003. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J. Infect.* **46**:207-214.

Douthwaite S. y Champney W.S. 2001. Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**:1-8.

Doyle G.A., Pierce R.A. y Parks W.C. 1997. Transcriptional induction of collagenase-1 in differentiated monocyte-like (U937) cells is regulated by AP-1 and upstream C/EBP-beta site. *J. Biol. Chem.* **272**:11840-11849.

Driscoll K.E., Hassenbein D.G., Howard B.W., Isfort R.J., Cody D., Tindal M.H., Suchanek M. y Carter J.M. 1995. Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. *J. Leukoc. Biol.* **58**:359-364.

Equi A.C., Davies J.C., Painter H., Hyde S., Bush A., Geddes D.M. y Alton E.W. 2006. Exploring the mechanism of macrolides in cystic fibrosis. *Respir. Med.* **100**:687-697.

Fadok V.A., Bratton D.L. y Henson P.M. 2001. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J. Clin. Invest.* **108**:957-962.

Fitzgerald K.A., McWhirter S.M., Faia K.L., Rowe D.C., Latz E., Golenbock D.T., Coyle A.J., Liao S.M. y Maniatis T. 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* **4**:491-496.

Fitzpatrick L.R., Wang J. y Le T. 2001. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**:915-920.

Fonseca-Aten M., Rios A.M., Mejias A., Chavez-Bueno S., Katz K., Gomez A.M., Ramilo O., McCracken G.H. y Hardy R.D. 2006. Treatment of experimental chronic pulmonary mycoplasmosis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **28**:253-258.

Fumimori T., Honda S., Migita K., Hamada M., Yoshimuta T., Honda J., Fukuda T., Suzuki R., Gotoh M., Eguchi K. y Aizawa H. 2004. Erythromycin suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in rheumatoid synovial cells. *J. Rheumatol.* **31**:436-441.

Gao Z., Chiao P., Zhang X., Zhang X., Lazar M.A., Seto E., Young H.A., y Ye J. 2005. Coactivators and corepressors of NF-kappaB in IkappaB-alpha gene promoter. *J. Biol. Chem.* **280**:21091-21098.

García Vázquez E., Mensa J., Martínez J.A., Marcos M.A., Puig J., Ortega M. y Torres A. 2005. Lower mortality among patients with community-acquired pneumonia treated with a macrolide plus beta-lactam agent versus a beta-lactam agent alone. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24**:190-195.

Garey K.W., Rubinstein I., Gotfried M.H., Khan I.J., Varma S. y Danziger L.H. 2000. Long-term clarithromycin decreases prednisone requirements in elderly patients with prednisone-dependent asthma. *Chest*. **118**:1826-1827.

Gay N.J. y Keith F.J. 1991. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*. **351**:355-356.

Gendrel D., Raymond J., Moulin F., Iniguez J.L., Ravilly S., Habib F., Lebon P. y Kalifa G. 1997. Etiology and response to antibiotic therapy of community-acquired pneumonia in French children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**:388-391.

Ghosh S. y Karin M. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. **109** (Supl.):S81-S96.

Giamarellos-Bourboulis E.J., Adamis T., Laoutaris G., Sabracos L., Koussoulas V., Mouktaroudi M., Perrea D., Karayannacos P.E. y Giamarellou H. 2004. Immunomodulatory clarithromycin treatment of experimental sepsis and acute pyelonephritis caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:93-99.

Giamarellos-Bourboulis E.J., Antonopoulou A., Raftogiannis M., Koutoukas P., Tsaganos T., Tziortzioti V., Panagou C., Adamis T. y Giamarellou H. 2006^a. Clarithromycin is an effective immunomodulator when administered late in experimental pyelonephritis by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BCM Infect. Dis.* **6**:31.

Giamarellos-Bourboulis E.J., Baziaka F., Antonopoulou A., Koutoukas P., Kousoulas V., Sabracos L., Panagou C., Perrea D. y Giamarellou H. 2005. Clarithromycin co-administered with amikamicin attenuates systemic inflammation in experimental sepsis by *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **25**:168-172.

Giamarellos-Bourboulis E.J., Tziortzioti V., Koutoukas P., Baziaka F., Raftogiannis M., Antonopoulou A., Adamis T., Sabracos L. y Giamarellou H. 2006^b. Clarithromycin is an effective immunomodulator in experimental pyelonephritis caused by pan-resistant *Klebsiella pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. **57**:937-944.

Gillis R.J. e Iglewski B.H. 2004. Azithromycin retards *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. J. Clin. Microbiol. **42**:5842-5845.

Gillis S. y Watson J. 1980. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. J. Exp. Med. **152**:1709-1719.

Gotfried M.H. 2004. Macrolides for the treatment of chronic sinusitis, asthma, and COPD. Chest. **125** (Supl. 2):52S-61S.

Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S. y Tannenbaum S.R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. **126**:131-8.

Grutz G. 2005. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. J. Leukoc. Biol. **77**:3-15.

Guha M. y Mackman N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell. Signal. **13**:85-94.

Hailman E., Lichenstein H.S., Wurfel M.M., Miller D.S., Johnson D.A., Kelley M., Busse L.A., Zukowski M.M. y Wright S.D. 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. J. Exp. Med. **179**:269-277.

Han S.J., Ko H.M., Choi J.H., Seo K.H., Lee H.S., Choi E.K., Choi I.W., Lee H.K. y Im, S.Y. 2002. Molecular mechanisms for lipopolysaccharide-induced biphasic activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *J. Biol. Chem.* **277**:44715-44721.

Hardy R.D., Rios A.M., Chavez-Bueno S., Jafri H.S., Hatfield J., Rogers B.B., McCracken G.H. y Ramilo O. 2003. Antimicrobial and immunologic activities of clarithromycin in a murine model of *Mycoplasma pneumoniae*-induced pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1614-1620.

Hatipoglu U. y Rubinstein I. 2004. Low-dose, long-term macrolide therapy in asthma: An overview. *Clin. Mol. Allergy.* **2**:4.

Hayden M.S. y Ghosh S. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* **18**:2195-2224.

Haziot A., Lin X.Y., Zhang F. y Goyert S.M. 1998. The induction of acute phase proteins by lipopolysaccharide uses a novel pathway that is CD14-independent. *J. Immunol.* **160**:2570-2572.

Heffelfinger J.D., Dowell S.F., Jorgensen J.H., Klugman K.P., Mabry L.R., Musher D.M., Plouffe J.F., Rakowsky A., Schuchat A. y Whitney C.G. 2000. Management of community-acquired pneumonia in the era of pneumococcal resistance: a report from the Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. *Arch. Intern. Med.* **160**:1399-1408.

Heflin A.C. y Brigham K.L. 1981. Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. *J. Clin. Invest.* **68**:1253-1260.

Hentzer M. y Givskov M. 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* **112**:1300-1307.

- Hill C.S., Wynne J. y Treisman R.** 1994. Serum-regulated transcription by serum response factor (SRF): a novel role for the DNA binding domain. *EMBO J.* **13**:5421-5432.
- Hirata N., Hiramatsu K., Kishi K., Yamasaki T., Ichimiya T. y Nasu M.** 2001. Pretreatment of mice with clindamycin improves survival of endotoxic shock by modulating the release of inflammatory cytokines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2638-2642.
- Hirota K., Matsui M., Iwata S., Nishiyama A., Mori K. y Yodoi J.** 1997. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:3633-3638.
- Hornig T., Barton G.M. y Medzhitov R.** 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* **2**:835-841.
- Hortelano S., Castrillo A., Alvarez A.M. y Boscá L.** 2000. Contribution of cyclopentenone prostraglandins to the resolution of inflammation through the potentiation of apoptosis in activated macrophages. *J. Immunol.* **165**:6525-6531.
- Inamura K., Ohta N., Fukase S., Kasajima N. y Aoyagi M.** 2000. The effects of erythromycin on human peripheral neutrophil apoptosis. *Rhinology.* **38**:124-129.
- Ives T.J., Schwab U.E., Ward E.S., Butts J.D. y Hall I.H.** 2001. Disposition and functions of clarithromycin in human THP-1 monocytes during stimulated and unstimulated conditions. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **110**:183-208.
- Ivetić Tkalcević V., Bosnjak B., Hrvacić B., Bosnar M., Marjanović N., Ferencić Z., Situm K., Culić O., Parnham M.J. y Eraković V.** 2006. Anti-inflammatory activity of azithromycin attenuates the effects of lipopolysaccharide administration in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **539**:131-138.

Iwata M., Eshima Y. y Kagechika H. 2003. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int. Immunol.* **15**:1017-1025.

Janaway C.A. y Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:197-216.

Jiménez-Valera M., Moreno E. y Ruiz-Bravo A. 1997. Immunomodulation by antimicrobial agents. En Pandalai S.G. (ed.), *Recent Research Developments in Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 2, pp. 83-94. Research Singpost, Trivandrum.

Johnston S.L., Blasi F., Black P.N., Martin R.J., Farrell D.J. y Nieman R.B. 2006. The effect of telithromycin in acute exacerbations of asthma. *N. Engl. J. Med.* **354**:1589-1600.

Jones B.W., Means T.K., Heldwein K.A., Keen M.A., Hill P.J., Belisle J.T. y Fenton M.J. 2001. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J. Leukoc. Biol.* **69**:1036-1044.

Kadota J., Mizunoe S., Kishi K., Tokimatsu I., Nagai H. y Nasu M. 2005. Antibiotic-induced apoptosis in human activated peripheral lymphocytes. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **25**:216-220.

Kadota J., Mukae H., Ishii H., Nagata T., Kaida H., Tomono K. y Kohno S. 2003. Long-term efficacy and safety of clarithromycin treatment in patients with diffuse panbronchiolitis. *Respir. Med.* **97**:844-850.

Kadota J., Sakito O., Kohno S., Sawa H., Mukae H., Oda H., Kawakami K., Fukushima K., Hiratani K. y Hara K. 1993. A mechanism of erythromycin treatment in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**:153-159.

Kaneko Y., Yanagihara K., Seki M., Kuroki M., Miyazaki Y., Hirakata Y., Mukae H., Tomono K., Kadota J. y Kohno S. 2003. Clarithromycin inhibits overproduction of muc5ac core protein in murine model of diffuse panbronchiolitis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **285**:L847-L853.

Kang B.Y., Song Y.J., Kim K.M., Choe Y.K., Hwang S.Y. y Kim T.S. 1999. Curcumin inhibits Th1 cytokine profile in CD4⁺ T cells by suppressing interleukin-12 production in macrophages. *Br. J. Pharmacol.* **128**:380-384.

Karin M. y Ben-Neriah Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:621-663.

Karin M., Liu Z. y Zandi E. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:240-246.

Karin M., Takahashi T., Kapahi P., Delhase M., Chen Y., Makris C., Rothwarf D., Baud V., Natoli G., Guido F. y Li N. 2001. Oxidative stress and gene expression: the AP-1 and NF- κ B connections. *Biofactors.* **15**:87-89.

Kawamura-Sato K., Iinuma Y., Hasegawa T., Horii T., Yamashino T. y Ohta M. 2000. Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2869-2872.

Khan A.A., Slifer T.R., Araujo F.G., Suzuki Y. y Remington J.S. 2000. Protection against lipopolysaccharide-induced death by fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3169-3173.

Kikuchi T., Hagiwara K., Honda Y., Gomi K., Kobayashi T., Takahashi H., Tokue Y., Watanabe A. y Nukiwa T. 2002. Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF- κ B transcription factors. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:745-744.

Kikuchi T., Hahn C.L., Tanaka S., Barbour S.E., Schenkein H.A. y Tew J.G. 2004. Dendritic cells stimulated with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* elicit rapid gamma interferon responses by natural killer cells. *Infect. Immun.* **72**:5089-5096.

Kim S., Iizuka K., Aguila H.L., Weissman I.L. y Yokoyama W.M. 2000. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:2731-2736.

Kim D.S., Han J.H. y Kwon H.J. 2003. Nf-kappaB and c-jun-dependent regulation of macrophage inflammatory protein-2 gene expression in response to lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells. *Mol. Immunol.* **40**:633-643.

Kobayashi H. 2001. Airway biofilm disease. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **17**:351-356.

Kobayashi M., Shimauchi T., Hino R. y Tokura Y. 2004. Roxithromycin downmodulates Th2 chemokine production by keratinocytes and chemokine receptor expression on Th2 cells: its dual inhibitory effects on ligands and the receptors. *Cell. Immunol.* **228**:27-33.

Kraft M., Cassell G.H., Pak J. y Martin R.J. 2002. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in asthma: effect of clarithromycin. *Chest.* **121**:1782-1788.

Labro M.T. 1996. Intracellular bioactivity of macrolides. *Clin. Microbiol. Infect.* **1**(Supl. 1):24-30.

Labro M.T. 2000. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:615-650.

Labro M.T., Abdelghaffar H. y Babin-Chevaye C. 2004. Interaction of the new ketolide ABT-773 (cethromycin) with human polymorphonuclear neutrophils and the phagocytic cell line PBL-985 *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1096-1104.

Labro M.T. 2004. Macrolide antibiotics: current and future uses. *Expert. Opin. Pharmacother.* **5**:541-550.

Lawrence T., Bebien M., Liu G.Y., Nizet V. y Karin M. 2005. IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature.* **434**:1138-1143.

Lee S.W., Han S.I., Kim H.H. y Lee Z.H. 2002. TAK1-dependent activation of AP-1 and c-Jun N-terminal kinase by receptor activator of NF- κ B. *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**:371-376.

Leiva M., Moreno E., Ruiz-Bravo A. y Jimenez-Valera M. 2005. Immunomodulation by non-absorbable antibiotics given by the intragastric route. *Int. J. Antimicrob. Agents* **25**:252-255.

Leiva M., Ruiz-Bravo A., Moreno E. y Jimenez-Valera M. 2007. The anti-inflammatory activity of telithromycin in a mouse model of septic shock. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **29**:364-365.

Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M. y Hoffmann J.A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* **86**:973-983.

Liaudet L., Mabley J.G., Pacher P., Virág L., Soriano F.G., Marton A., Haskó G., Deitch E.A. y Szabó C. 2002. Inosine exerts a broad range of antiinflammatory effects in a murine model of acute lung injury. *Ann. Surg.* **235**:568-578.

Lin H.C., Wang C.H., Liu C.Y., Yu C.T. y Kuo H.P. 2000. Erythromycin inhibits beta2-integrins (CD11b/CD18) expression, interleukin-8 release and intracellular oxidative metabolism in neutrophils. *Respir Med.* **94**:654-660.

Lotter K., Höcherl K., Bucher M. y Kees F. 2006. *In vivo* efficacy of telithromycin on cytokine and nitric oxide formation in lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:615-621.

Louis H., Le Moine O., Peny M.O., Gulbis B., Nisol F., Goldman M. y Devière J. 1997. Hepatoprotective role of interleukin 10 in galactosamine/lipopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterology* **112**:935-42.

Lucas M., Zhang X., Prasanna V. y Mosser D.M. 2005. ERK activation following macrophage FcγR ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus. *J. Immunol.* **175**:469-477.

Macfarlane J. 2001. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults. *Thorax.* **56**(Supl. 4):1-64.

Martínez J.A., Horcajada J.P., Almela M., Marco F., Soriano A., García E., Marco M.A., Torres A. y Mensa J. 2003. Addition of a macrolide to a beta-lactam-based empirical antibiotic regimen is associated with lower in-hospital mortality for patients with bacteriemic pneumococcal pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **36**:389-395.

McCracken S.A., Gallery E. y Morris J.M. 2004. Pregnancy-specific down-regulation of NF-κB expression in T cells in humans is essential for the maintenance of the cytokine profile required for pregnancy success. *J. Immunol.* **172**:4583-4591.

Medzhitov R., Preston-Hurlburt P. y Janeway C.A. Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. **388**:394-397.

Meisel C., Vogt K., Platzer C., Randow F., Liebenthal C. y Volk H.D. 1996. Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. *Eur. J. Immunol.* **26**:1580-1586.

Menge C., Wieler L.H., Schlapp T. y Baljer G. 1999. Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations *in vitro*. *Infect. Immun.* **67**:2209–2217.

Mensa J., García-Vazquez E. y Vila J. 2003. Macrólidos, estólidos y estreptograminas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **21**:200-208.

Miao B., Li J., Fu X., Ding J. y Geng M. 2005. T-cell receptor (TCR)/CD3 is involved in sulfated polymannuroguluronate (SPMG)-induced T lymphocyte activation. *Int. Immunopharmacol.* **5**:1171-1182.

Milano S., Arcoleo F., D'Agostino P. y Cillari E. 1997. Intraperitoneal injection of tetracyclines protects mice from lethal endotoxemia downregulating inducible nitric oxide synthase in various organs and cytokine and nitrate secretion in blood. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:117-21.

Mink M., Fogelgren B., Olszewski K., Maroy P. y Csiszar, K. 2001. A novel human gene (SARM) at chromosome 17q11 encodes a protein with a SAM motif and structural similarity to Armadillo/beta-catenin that is conserved in mouse, *Drosophila*, and *Caenorhabditis elegans*. *Genomics.* **74**:234-244.

Mitsuya Y., Kawai S., y Koyashi H. 2000. Influence of macrolides on guanosine diphospho-D-mannose dehydrogenase activity in *Pseudomonas* biofilm. *J. Infect. Chemother.* **6**:45-50.

Mitsuyama T., Tanaka T., Hidaka K., Abe M. y Hara N. 1995. Inhibition by erythromycin of superoxide anion production by human polymorphonuclear leukocytes through the action of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Respiration*. **62**:269-273.

Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L. y O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:683-765.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**:56-63.

Nagata T., Mukae H., Kadota J, Hayashi T., Fujii T., Kuroki M., Shirai R., Yanagihara K., Tomono K., Koji T. y Kohno S. 2004. Effect of erythromycin on chronic respiratory infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* with biofilm formation in an experimental murine model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2251-2259.

Nakagawa S., Kojio S., Taneike I., Iwakura N., Tamura Y., Kushiya K., Gondaira F. y Yamamoto T. 2003. Inhibitory action of telithromycin against Shiga toxin and endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **310**:1194-1199.

Nalca Y., Jänsch L., Bredenbruch F., Geffers R., Buer J. y Häussler S. 2006. Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1680-1688.

Namour F., Wessels D.H., Pascual M.H., Reynolds D., Sultan E. y Lenfant B. 2001. Pharmacokinetics of the new ketolide telithromycin (HMR 3647) administered in ascending single and multiple doses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:170-175.

Nava E., Palmer R.M. y Moncada S. 1991. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *Lancet.* **338**:1555-1557.

Negrotto S., Malaver E., Alvarez M.E., Pacienza N., D'Atri L.P., Pozner R.G., Gómez R.M. y Schattner M. 2006. Aspirin and salicylate suppress polymorphonuclear apoptosis delay mediated by proinflammatory stimuli. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**:972-979.

Nicoletti F., Di Marco R., Sacerdote P., Meroni P., Mangano K., Edwards C 3rd, Bartorelli A., Bendtzen K. y Panerai A. 2001. Prevention and treatment of lethal murine endotoxemia by the novel immunomodulatory agent MFP-14. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1591-1594.

Niinobu T., Fukuo K., Yasuda O., Tsubakimoto M., Mogi M., Nishimaki H., Morimoto S. y Ogihara T. 2000. Negative feedback regulation of activated macrophages via Fas-mediated apoptosis. *Am. J. Physiol.* **279**:C504-C509.

O'Neill L.A. 2006. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr. Opin. Immunol.* **18**:3-9.

O'Neill L.A. y Dinarello C.A. 2000. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol. Today.* **21**:206-209.

Ogawa N., Sugawara Y., Fujiwara Y. y Noma T. 2003. Roxithromycin promotes lymphocyte apoptosis in *Dermatophagoides*-sensitive asthma patients. *Eur. J. Pharmacol.* **474**:273-281.

Ortega E., Escobar M.A. y Gaforio J.J., Algarra I. y Alvarez de Cienfuegos G. 2004. Modification of phagocytosis and cytokine production in peritoneal and splenic murine cells by erythromycin A, azithromycin and josamycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**:367-370.

Oyama T., Matsushita K., Sakuta T., Tokuda M., Tatsuyama S., Nagaoka S. y Torii M. 2007. Roxithromycin inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced matrix metalloproteinase-1 expression through regulating mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Ets-1 expression. *J. Periodont. Res.* **42**:53-61.

Park J.S., Lee E.J., Lee J.C., Kim W.K. y Kim H.S. 2007. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-gamma-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF-kappaB and ERK signaling pathways. *Int. Immunopharmacol.* **7**:70-77.

Parnham M.J. 2004. Antibiotics, inflammation and its resolution: an overview. En Rubin B.K. y Tamaoki J. (eds.), *Antibiotics as anti-inflammatory and immunomodulatory agents*, pp. 27-48. Basel: Birkhäuser Verlag.

Parnham M.J., Culić O., Eracović V., Munić V., Popović-Grle S., Barisić K., Bosnar M., Brajsa K., Cepelak I., Cuzić S., Glojnarić I., Manojlović Z., Novak-Mircetić R., Oresković K, Pavčić-Beljak V., Radosević S. y Sucić M. 2005. Modulation of neutrophil and inflammation markers in chronic obstructive pulmonary disease by short-term azithromycin treatment. *Eur. J. Pharmacol.* **517**:132-143.

Piacentini G.L., Peroni D.G., Bodini A., Pigozzi R., Costella S., Loiacono A. y Boner A.L. 2007. Azithromycin reduces bronchial hyperresponsiveness and neutrophilic airway inflammation in asthmatic children: a preliminary report. *Allergy Asthma Proc.* **28**:194-8.

Pomerantz J.L. y Baltimore D. 2002. Two pathways to NF-kappaB. *Mol. Cell.* **10**:693-695

Porter C.M. y Clipstone N.A. 2002. Sustained NFAT signaling promotes a Th1-like pattern of gene expression in primary murine CD4⁺ cells. *J. Immunol.* **168**:4936-4945.

Poynter M.E., Irvin C.G. y Janssen-Heininger Y.M. 2002. Rapid activation of nuclear factor-kappaB in airway epithelium in a murine model of allergic airway inflammation. *Am. J. Pathol.* **160**: 1325-1334.

Poynter M.E., Irvin C.G. y Janssen-Heininger Y.M. 2003. A prominent role for airway epithelial NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation. *J. Immunol.* **170**:6257-6265.

Pukhalsky A.L., Shmarina G.V., Kapranov N.I., Kokarovtseva S.N., Pukhalskaya D. y Kashirskaja N.J. 2004. Anti-inflammatory and immunomodulating effects of clarithromycin in patients with cystic fibrosis lung disease. *Mediators Inflamm.* **13**:111-117.

Ransone L.J. y Verma I.M. 1990. Nuclear proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**:539-557.

Raschke W.C., Baird S., Ralph P. y Nakoinz I. 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell.* **15**:261-267.

Remick D.G., Kunkel R.G., Larrick J.W. y Kunkel S.L. 1987. Acute *in vivo* effects of human recombinant tumor necrosis factor. *Lab. Invest.* **56**:583-90.

Rennard S.I. 2004. Treatment of stable chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* **364**:791-802.

Ríos A.M., Mejías A.M., Chávez-Bueno S., Fonseca-Aten M., Katz K., Hatfield J., Gómez A.M., Jafri H.S., McCracken G.H. Jr., Ramilo O. y Hardy R.D. 2004. Impact of cethromycin (ABT-773) therapy on microbiological, histologic, immunologic, and respiratory indices in a murine model of *Mycoplasma pneumoniae* lower respiratory infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2897-2904.

Rock F.L., Hardiman G., Timans J.C., Kastelein R.A. y Bazan J.F. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**:588-593.

Rodriguez-Galan M.C., Bream J.H., Farr A. y Young H.A. 2005. Synergistic effect of IL-2, IL-12, and IL-18 on thymocyte apoptosis and Th1/Th2 cytokine expression. J. Immunol. **174**:2796-2804.

Roth J.A. 1988. Enhancement of nonspecific resistance to bacterial infection by biological response modifiers. En J.M. Roth (ed.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens, pp. 329-342. American Society for Microbiology, Washington.

Rubin B.K. y Henke M.O. 2004. Immunomodulatory activity and effectiveness of macrolides in chronic airway disease. Chest. **125**(Supl. 2):70S-78S.

Ruiz-Bravo A., Jimenez-Valera M., Moreno E., Guerra V., y Ramos-Cormenzana A. 2001. Biological response modifier activity of an exopolysaccharide from *Paenibacillus jamilae* CP-7. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **8**:706-710.

Saiman L. 2004. The use of macrolide antibiotics in patients with cystic fibrosis. Curr. Opin. Pulm. Med. **10**:515-523.

Sakito O., Kadota J., Kohno S., Abe K., Shirai R. y Hara K. 1996. Interleukin 1 beta, tumor necrosis factor alpha, and interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis: a potential mechanism of macrolide therapy. Respiration. **63**:42-48.

Samandari T., Kotloff K.L., Losonsky G.A., Picking W.D., Sansonetti P.J., Levine M.M. y Sztein M.B. 2000. Production of IFN-gamma and IL-10 to *Shigella* invasins by mononuclear cells from volunteers orally inoculated with a Shiga toxin-deleted *Shigella dysenteriae* type 1 strain. J. Immunol. **164**:2221-2232.

Sanazuka T., Omura S., Iwasaki S., Omura S. 2002. Chemical modification of macrolides. En: Omura S., (ed), Macrolide antibiotics; chemistry, biology, and practice, pp. 99-180. San Diego: Elsevier Science.

Sanz M.J., Nabah Y.N., Cerdá-Nicolás M., O'Connor J.E., Issekutz A.C., Cortijo J. y Morcillo E.J. 2005. Erythromycin exerts *in vivo* anti-inflammatory activity downregulating cell adhesion molecule expression. Br. J. Pharmacol. **144**:190-201.

Sato E., Nelson D.K., Koyama S., Hoyt J.C. y Robbins R.A. 2001. Erythromycin modulates eosinophil chemotactic cytokine production by human lung fibroblasts *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:401-406.

Sato Y., Kaneko K. y Inoue M. 2007. Macrolide antibiotics promote the LPS-induced upregulation of prostaglandin E receptor EP-2 and thus attenuate macrolide suppression of IL-6 production. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. **76**:181-188.

Savill J. 1997. Apoptosis in resolution of inflammation. J. Leukoc. Biol. **61**:375-380.

Savill J. y Fadok V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature. **407**:784-788.

Schromm A.B., Lien E., Henneke P., Chow J.C., Yoshimura A., Heine H., Latz E., Monks B.G., Schwartz D.A., Miyake K. y Golenbock D.T. 2001. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. J. Exp. Med. **194**:79-88.

Schultz M.J. 2004. Macrolide activity beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis. J. Antimicrob. Chemother. **54**:21-28.

Schultz M.J., Speelman P., Hack C.E., Buurman W.A., van Deventer S.J. y van Der Poll T. 2000. Intravenous infusion of erythromycin inhibits CXC chemokine production, but augments neutrophil degranulation in whole blood stimulated with *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:235-240.

Schwartz M.D., Moore E.E., Moore F.A., Shenkar R., Moine P., Haenel J.B. y Abraham E. 1996. Nuclear factor kappa B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* **24**:1285-1292.

Sen R. y Baltimore D. 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* **46**:705-716.

Shaulian E. y Karin M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* **4**:E131-136.

Shimane T., Asano K., Suzuki M., Hisamitsu T. y Suzuki H. 2001. Influence of a macrolide antibiotic, roxithromycin on mast cell growth and activation *in vitro*. *Mediators Inflamm.* **10**:323-332.

Shimizu T., Shimizu S., Hattori R., Gabazza E.C. y Majima Y. 2003. *In vivo* and *in vitro* effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**:581-587.

Shiomi S. y Omura S. 2002. Discovery of new macrolides. En Omura S. (ed.), *Macrolide antibiotics; chemistry, biology, and practice*, pp. 1-56. Elsevier Science, San Diego.

Siebenlist U., Brown K. y Claudio, E. 2005. Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat. Rev. Immunol.* **5**:435-445.

Siebenlist U., Franzoso G. y Brown K. 1996. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **10**:405-455.

- Sime P.J., Xing Z., Graham F.L., Csaky K.G. y Gauldie J.** 1997. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J. Clin. Invest.* **100**:768-776.
- Skerrett S.J., Liggitt H.D., Hajjar A.M., Ernst R.K., Miller S.I. y Wilson C.B.** 2004. Respiratory epithelial cells regulate lung inflammation in response to inhaled endotoxin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **287**:L143-L152.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. y Klenk D.C.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**:76-85.
- Southern K.W. y Barker P.M.** 2004. Azithromycin for cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* **24**:834-838.
- Standiford T.J., Kunkel S.L., Basha M.A., Chensue S.W., Lynch J.P. 3rd, Toews G.B., Westwick J. y Strieter R.M.** 1990. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J. Clin. Invest.* **86**:1945-1953.
- Standiford T.J., Kunkel S.L., Phan S.H., Rollins B.J. y Strieter R.M.** 1991. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **266**:9912-9918.
- Stein B., Baldwin A.S. Jr., Ballard D.W., Greene W.C., Angel P. y Herrlich P.** 1993. Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J.* **12**:3879-3891.
- Stevens D.L.** 1996. Immune modulatory effects of antibiotics. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **9**:165-169.

Sugiyama K., Shirai R., Mukae H., Ishimoto H., Nagata T., Sakamoto N., Ishii H., Nakayama S., Yanagihara K., Mizuta Y. y Kohno S. 2007. Differing effects of clarithromycin and azithromycin on cytokine production by murine dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* **147**:540-546.

Suzaki H., Asano K., Ohki S., Kanai K., Mizutani T. y Hisamitsu T. 1999. Suppressive activity of a macrolide antibiotic, roxithromycin, on pro-inflammatory cytokine production *in vitro* and *in vivo*. *Mediators Inflamm.* **8**:199-204.

Takeda K. y Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**:1-14.

Takeda K., Kaisho T. y Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**:335-376.

Takizawa H., Desaki M., Ohtoshi T., Kawasaki S., Kohyama T., Sato M., Tanaka M., Kasama T., Kobayashi K., Nakajima J. e Ito K. 1997. Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**:266-271.

Takizawa H., Desaki M., Ohtoshi T., Kawasaki S., Kohyama T., Sato M., Nakajima J., Yanagisawa M. e Ito K. 1998. Erythromycin and clarithromycin attenuate cytokine-induced endothelin-1 expression in human bronchial epithelial cells. *Eur. Respir. J.* **12**:57-63.

Tamaoki J., Kadota J. y Takizawa H. 2004. Clinical implications of the immunomodulatory effects of macrolides. *Am. J. Med.* **117**(Supl. 9A):5S-11S.

Tamaoki J., Kondo M., Kohri K., Aoshiba K., Tagaya E. y Nagai A. 1999. Macrolide antibiotics protect against immune complex-induced lung injury in rats: role of nitric oxide from alveolar macrophages. *J. Immunol.* **163**:2909-2915.

Tao F. y Kobzik L. 2002. Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **26**:499-505.

Tassioulas I., Park-Min K.H., Hu Y., Kellerman L., Mevorach D. e Ivashkiv L.B. 2007. Apoptotic cells inhibit LPS-induced cytokine and chemokine production and IFN responses in macrophages. *Human Immunol.* **68**:156-164.

Terenzi F., Diaz-Guerra M.J., Casado M., Hortelano S., Leoni S. y Boscá L. 1995. Bacterial lipopeptides induce nitric oxide synthase and promote apoptosis through nitric oxide-independent pathways in rat macrophages. *J. Biol. Chem.* **270**:6017-6021.

Thanos D. y Maniatis T. 1995. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell.* **80**:529-532.

Thiemermann C. 1997. Nitric oxide and septic shock. *Gen. Pharmacol.* **29**:159-66.

Tobias P.S., Soldau K., Gegner J.A., Mintz D. y Ulevitch R.J. 1995. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD-14. *J. Biol. Chem.* **270**:10482-10488.

Tsai W.C., Rodriguez M.L., Young K.S., Deng J.C., Thannickal V.J., Tateda K, Hershenson M.B. y Standiford T.J. 2004. Azithromycin blocks neutrophil recruitment in *Pseudomonas* endobronchial infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**:1331-1339.

Urasaki Y., Nori M., Iwata S., Sasaki T., Hosono O., Kawasaki H., Tanaka H., Dang N.H., Ikeda E. y Morimoto C. 2005. Roxithromycin specifically inhibits development of collagen induced arthritis and production of proinflammatory cytokines by human T cells and macrophages. *J. Rheumatol.* **32**:1765-1774.

Uriarte S.M., Molestina R.E., Miller R.D., Bernabo J., Farinati A., Eiguchi K., Ramirez J.A. y Summersgill J.T. 2002. Effect of macrolide antibiotics on human epithelial cells activated by *Chlamydia pneumoniae* infection and tumor necrosis factor-alpha. *J. Infect. Dis.* **185**:1631-1636.

Varma T.K., Lin C.Y., Toliver-Kinsky T.E. y Sherwood E.R. 2002. Endotoxin-induced gamma interferon production: contributing cell types and key regulatory factors. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**:530-543.

Vazifeh D., Preira A., Bryskier A. y Labro MT. 1998. Interactions between HMR 3647, a new ketolide, and human polymorphonuclear neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1944-1951.

Visintin A., Latz E., Monks B.G., Espevik T. y Golenbock D.T. 2003. Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor 4 aggregation and signal transduction. *J. Biol. Chem.* **278**:48313-48320.

Viveros-Paredes J.M., Puebla-Perez A.M., Gutierrez-Coronado O., Sandoval-Ramirez L. y Villasenor-Garcia M.M. 2006. Dysregulation of the Th1/Th2 cytokine profile is associated with immunosuppression induced by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in mice. *Int. Immunopharmacol.* **6**:774-781.

Vlastarakos P.V., Nikolopoulos T.P., Maragoudakis P., Tzagaroulakis A. y Ferekidis E. 2007. Biofilms in ear, nose, and throat infections: how important are they?. *Laryngoscope.* **117**:668-673.

von Knethen A., Callsen D. y Brüne B. 1999. NF-kappaB and AP-1 activation by nitric oxide attenuated apoptotic cell death in RAW 264.7 macrophages. *Mol. Biol. Cell.* **10**:361-372.

- Vranes J.** 2000. Effect of subminimal inhibitory concentrations of azithromycin on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to polystyrene. *J. Chemother.* **12**:280-285.
- Ward C., Chilvers E.R., Lawson M.F., Pryde J.G., Fujihara S., Farrow S.N., Haslett C. y Rossi A.G.** 1999. NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **274**:4309-4318.
- Wietek C., Miggin S.M., Jefferies C.A. y O'Neill L.A.** 2003. Interferon regulatory factor-3-mediated activation of the interferon-sensitive response element by Toll-like receptor (TLR) 4 but not TLR3 requires the p65 subunit of NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* **278**:50923-50931.
- Wikenheiser K.A., Vorbroker D.K., Rice W.R., Clark J.C., Bachurski C.J., Oie H.K. y Whitsett J.A.** 1993. Production of immortalized distal respiratory epithelial cell lines from surfactant protein C/simian virus 40 large tumor antigen transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:11029-11033.
- Williams A.C., Galley H.F., Watt A.M. y Webster N.R.** 2005. Differential effects of three antibiotics on T helper cell cytokine expression. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:502-506.
- Wozniak D.J. y Keyser R.** 2004. Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest.* **125** (Supl. 2):62S-69S.
- Wu L., Zhang W., Tian L., Bao K., Li P. y Lin J.** 2007. Immunomodulatory effects of erythromycin and its derivatives on human T-lymphocyte *in vitro*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **29**:587-596.
- Xanthoudakis S. y Curran T.** 1992. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J.* **11**:653-655.

Xanthoudakis S., Miao G., Wang F., Pan Y.C. y Curran T. 1992. Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.* **11**:3323-3335.

Xing Z., Jordana M., Kirpalani H., Driscoll K.E., Schall T.J. y Gauldie J. 1994. Cytokine expression by neutrophils and macrophages *in vivo*: endotoxin induces tumor necrosis factor-alpha, macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1beta, and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor-beta1 mRNA expression in acute lung inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **10**:148-153.

Xu G., Fujita J., Negayama K., Yuube K., Hojo S., Yamaji Y., Kawanishi K. y Takahara J. 1996. Effects of macrolide antibiotics on macrophage functions. *Microbiol. Immunol.* **40**:473-479.

Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O., Sugiyama M., Okabe M., Takeda K. y Akira S. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* **301**:640-643.

Yamasawa H., Oshikawa K., Ohno S. y Sugiyama Y. 2004. Macrolides inhibit epithelial cell-mediated neutrophil survival by modulating granulocyte macrophage colony-stimulating factor release. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **30**:569-575.

Yanagihara K., Kuroki M., Higuchi N., Ohno H., Higashiyama Y., Miyazaki Y., Hirakata Y., Mukae H., Tomono K., Mizuta Y., Kadota J., Tsukamoto K. y Kohno S. 2007. Telithromycin inhibits the number of viable bacteria but not lymphocyte accumulation in a murine model of chronic respiratory infection. *Chemotherapy.* **53**:10-13.

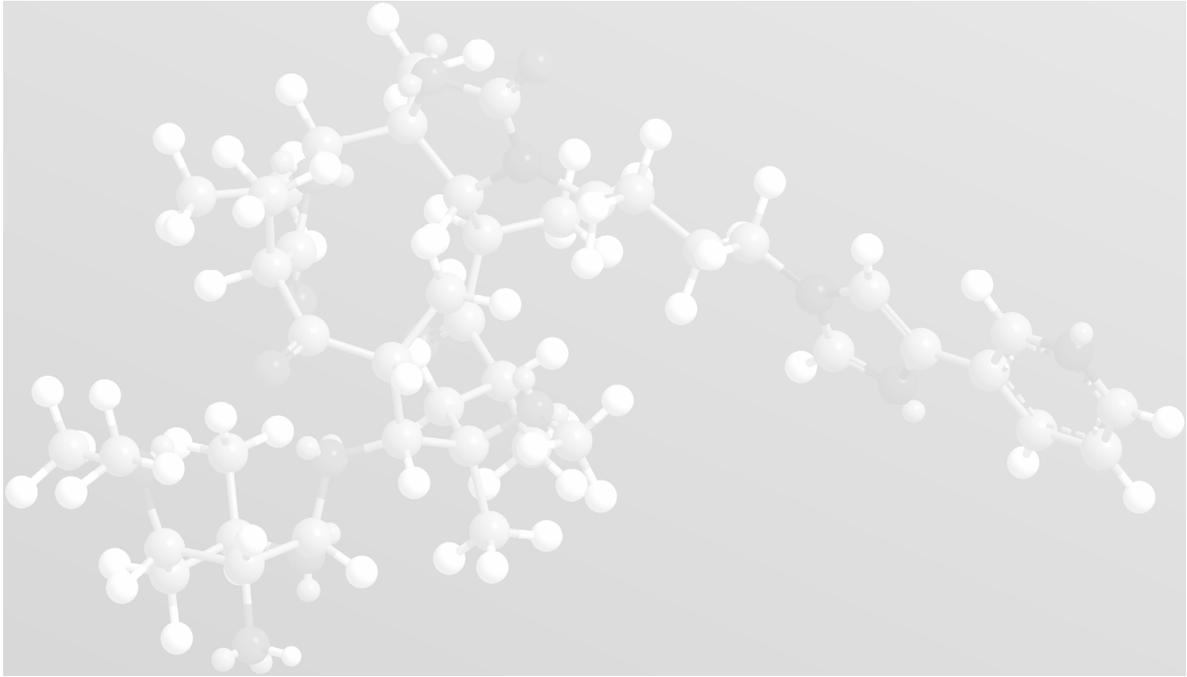
Yanagihara K., Tomono K., Sawai T., Kuroki M., Kaneko Y., Ohno H., Higashima Y., Miyazaki Y., Hirakata Y., Maesaki S., Kadota J., Tashiro T. y Kohno S. 2000. Combination therapy for chronic *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection associated with biofilm formation. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:69-72.

Yanagisawa K., Tago K., Hayakawa M., Ohki M., Iwahana H. y Tominaga S. 2003. A novel splice variant of mouse interleukin-1-receptor associated kinase-1 (IRAK-1) activates nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and c-Jun N-terminal kinase (JNK). *Biochem. J.* **370**:159-166.

Yang J., Lin Y., Guo Z., Cheng J., Huang J., Deng L., Liao W., Chen Z., Liu Z. y Su B. 2001. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat. Immunol.* **2**:620-624.

Zeyda M., Szekeres A.B., Säemann M.D., Geyeregger R., Stockinger H., Zlabinger G.J., Waldhäusl W. y Stulnig T.M. 2003. Suppression of T cell signaling by polyunsaturated fatty acids: selectivity in inhibition of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor activation. *J. Immunol.* **170**:6033-6039.

Zhong H., May M.J., Jimi E. y Ghosh S. 2002. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell.* **9**:625-636.



ANEXO

La normativa vigente para obtención del Doctorado Europeo exige que parte de la Tesis, al menos un resumen y las conclusiones, estén redactadas en una de las lenguas oficiales de la Unión Europea, distinta de las lenguas oficiales en España. Para cumplir este requisito, se incluye el presente Anexo, constituido por la mayor parte del trabajo experimental, su discusión y conclusiones, que fueron sometidos en su momento al informe de dos expertos pertenecientes a un Estado miembro de la Unión Europea, distinto de España. Se ha mantenido el formato inicial, que corresponde a tres artículos enviados para su publicación en revistas de difusión internacional.



UNIVERSITY OF GRANADA
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

The following documents:

- (1) “The biological response modifier activity of telithromycin in a mouse model of septic shock”;
- (2) “Telithromycin inhibits the production of proinflammatory mediators and the activation of NF- κ B in *in vitro* stimulated murine cells; and
- (3) “Effects of telithromycin in *in vitro* and *in vivo* models of endotoxin-induced airway inflammation”,

constitute the experimental part of the Doctoral Dissertation that has been presented by **M^a Magdalena Leiva Arjona** (identity card n^o 79016992-D) in the University of Granada.

Alfonso Ruiz-Bravo Lopez, Director

Maria Jimenez Valera, Director

M^a Magdalena Leiva Arjona, PhD Applicant

DOCUMENT 1

The biological response modifier activity of telithromycin in a mouse model of septic shock

Magdalena Leiva, Alfonso Ruiz-Bravo, Encarnación Moreno and Maria Jimenez-Valera

*Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Granada,
18071 Granada, Spain*

Abstract

Leukocytes activated by endotoxin release proinflammatory cytokines, thereby contributing to the cascade of events leading to septic shock. In the present study, we analyzed the effect of administration of telithromycin on a mouse model of induced toxic shock. Mice, injected with a single dose of telithromycin (20 mg/kg of body weight) were significantly protected from lethal doses of LPS. We observed that the pretreatment of mice with telithromycin reduced mortality from 62.5% to 12.5% and from 100% to 50% when mice were injected intraperitoneally with a dose of 500 µg or 1000 µg per mouse, respectively. Moreover, telithromycin reduced plasma levels of the inflammation mediators interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and nitrite (product of nitric oxide), and increased the production of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in LPS-injected mice. In conclusion, telithromycin had an interesting anti-inflammatory activity in the exigent model of mouse septic shock.

Keywords: ketolide, immunomodulation, lipopolysaccharide, interleukin-10

1. Introduction

Septic shock due to gram-negative bacterial infection is a life-threatening syndrome that results from a systemic inflammatory response characterized by hypotension, disseminated intravascular coagulation, and multiple organ failure [1, 2]. This toxicity is mainly due to the release of endotoxin, the lipopolysaccharide (LPS) component of the outer membrane in the cell wall of gram-negative bacteria [1]. The presence of LPS in the bloodstream leads to the activation of complement and blood coagulation systems, and to the stimulation of macrophages, that results in an overproduction of proinflammatory cytokines. The proinflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) are known to be important mediators in the pathogenesis of lethal septic shock [3, 4]. Conversely, IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that limits excessive inflammatory reactions in response to LPS [5].

The injection of mice with a lethal dose of LPS provides an experimental model of septic shock [6]. This mouse model has been used to assess the anti-inflammatory properties of a number of antimicrobial agents, such as tetracyclines [7], clindamycin [8], and fluoroquinolones [9]. Ketolides are a new group of macrolide-like antibiotics that accumulate within mammalian cells [10]. Telithromycin, a ketolide antibiotic, is able to inhibit in vitro secretion of inflammatory cytokines by LPS- or Shiga toxin-stimulated human monocytes [11, 12]. In this paper, we have tested the ability of telithromycin to reduce mortality and to modulate cytokine production in a murine model of LPS-induced shock.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Ten- to 12-week-old female BALB/c mice were obtained from the Technical Services of the University of Granada (Granada, Spain) and maintained under pathogen-free conditions. The experiments were approved and supervised by the local ethic committee at the University of Granada.

2.2. Septic shock

LPS from Escherichia coli O26:B6 was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). Mice were injected intraperitoneally with a single dose of 25 mg or 50 mg of LPS per kg of body weight. Mice were observed daily for 1 week after the injection of LPS to document the survival rate. In preliminary experiments, doses of 50 mg/kg always resulted in 100% mortality.

2.3. Antibiotic treatment

Telithromycin was gift from Aventis Pharma (Neuville-sur-Saonc, France). To investigate the effectiveness of telithromycin on lethal endotoxemia, mice received a single dose of 20 mg of antibiotic per kg of body weight by intraperitoneal injection, 1 h prior to the injection of LPS. This dose is comparable to those used in human therapy. Control mice received LPS alone or telithromycin alone.

2.4. Measurement of cytokine levels in plasma

Blood samples were obtained by retro-orbital puncture with heparinized capillary tubes in ether-anesthetized mice. Blood was immediately centrifuged, and plasma was stored at -20°C until cytokine determination. The TNF- α , IL-1 β and IL-10 levels were measured with commercial enzyme immunoassay kits (Pierce Endogen, Rockford, IL); the cytokine concentrations were interpolated from the appropriate recombinant cytokine standard curves, according to specifications of the manufacturer.

2.5. Nitric oxide (NO) assay

Nitrite concentrations were determined by a standard Griess reaction adapted to microplates [13]. The absorbance at 550 nm was determined, with reference to a sodium nitrite standard curve, as described previously [14].

2.6. Statistical analysis

The Kaplan-Meier rank test was used to compare the mortality records of telithromycin-treated and untreated groups. Differences in cytokine and NO levels were analyzed by using Student's *t* test. A P value of less than 0.05 was considered significant.

3. Results

The results of representative experiments are presented in Fig. 1. When mice were challenged with a lethal dose of 50 mg of LPS per kg of body weight, telithromycin protected 50% of animals (Fig. 1A). 37.5% of mice survived the low dose of LPS, but telithromycin increased the survival rate to 87.5% (Fig. 1B).

(Location for Fig. 1)

In separate experiments, we investigated whether telithromycin-mediated protection was associated with a modulation of in vivo cytokine secretion. The experimental design included untreated controls, LPS-challenged mice, telithromycin-treated mice, and mice that received telithromycin 1 h prior to LPS. Both high and low LPS doses were used. Results are provided in Fig. 2. The IL-1 β concentrations in plasma at 8 h after the administration of 50 mg of LPS per kg of body weight were significantly decreased ($P < 0.05$) by pretreatment with telithromycin (Fig. 2A). Moreover, mice pretreated with telithromycin had significantly lower levels of TNF- α ($P < 0.05$) than non-pretreated mice at 2 h after the administration of 50 mg of LPS per kg of body weight (Fig. 2B). On the contrary, pretreatment with telithromycin resulted in significant increases in the levels of IL-10 ($P < 0.05$) at 2 h and at 8 h after LPS injection (50 mg/kg) (Fig. 2C). When mice were injected with 25 mg of LPS per Kg of body weight, pretreatment with telithromycin always exerted some inhibitory effect on the plasma concentrations of both proinflammatory

cytokines, but differences with non-pretreated mice did not reach statistical significance.

(Location for Fig. 2)

Since the increased expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) isoform and the excessive production of nitric oxide (NO) are associated with the pathologic mechanisms of septic shock [2, 15], we measured the plasma levels of nitrite, a stable metabolite of NO, in untreated mice, LPS-challenged mice, telithromycin-treated mice, and mice that received telithromycin 1 h prior to LPS. The results are presented in Fig. 3. Both low and high LPS doses induced nitrite levels greater than seven-fold the basal concentrations (untreated controls), but pretreatment with telithromycin significantly inhibited this LPS effect (values of P were < 0.01 for measures at 8 h after 25 mg/kg of LPS, and < 0.05 for the rest of determinations).

(Location for Fig. 3)

4. Discussion

Our data shown for the first time that telithromycin is a biological response modifier (BRM) with capacity to prevent LPS-induced lethality in mice, and to modulate cytokine plasma levels in LPS-injected mice. The experimental LPS-induced shock is a well known and exigent model to assess the anti-inflammatory potential of a putative BRM. Proinflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α has been described as mediators in the pathogenesis of septic shock [3, 4]. Thus, telithromycin could protect mice in our model through downregulation of both cytokines, as it has been suggested in the case of other immunomodulatory antimicrobial agents [8, 9].

The anti-inflammatory cytokine IL-10 seems to play a role in the protective effect of telithromycin against the high dose of LPS. Anti-inflammatory activity of IL-10 is thought to be mediated by the inhibition of the production of proinflammatory cytokines [5, 16]. In our model, increases in IL-10 plasma levels correlated with significant decreases in both IL-1 β at 8 h after LPS injection, and TNF- α at 2 h after LPS injection. A linkage between increased production of IL-10 and decreased levels of proinflammatory cytokines has been also observed in a similar model of prevention of LPS-induced shock by fluoroquinolones [9]. However, other studies did not found this correlation, showing that immunomodulatory agents can inhibit production of proinflammatory cytokines without affecting IL-10 blood levels [17]. These studies indicate that although the lack of an appropriate balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is considered central to the pathophysiology of

the septic shock, mediators other than IL-10 may play a role in the protection against LPS-induced lethality.

Proinflammatory cytokines may stimulate the production of other substances such as nitric oxide, which ultimately mediate sepsis. Our experiments show that the inhibition of proinflammatory cytokines by telithromycin correlated with significant decreases in nitric oxide production. A similar finding has been observed in LPS-treated mice after treatment with tetracyclines, although the participation of other mechanisms in the control of septic shock by these antibiotics has been not excluded [7].

In conclusion, our data provide in vivo evidence for the BRM properties of telithromycin, suggesting that the antibacterial activity of this agent is associated with interesting anti-inflammatory effects.

Acknowledgements

This work was supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología and the European Regional Development Fund (SAF 2002-01606), and by the Junta de Andalucía (Research Group CVI201). M. Leiva was supported by a FPU grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (pre-doctoral grant).

References

- [1] Stenger S, Modlin R. Pathology and pathogenesis of bacterial infections. In: Kaufmann SHE, Sher A, Ahmed R, eds. Immunology of infectious diseases. Washington: ASM Press, 2002.
- [2] Thiernemann C. Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol* 1997; 29: 159-66.
- [3] Butler LD, Layman NK, Cain RL et al. Interleukin 1-induced pathophysiology: induction of cytokines, development of histopathologic changes, and immunopharmacologic intervention. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 53: 400-21.
- [4] Remick DG, Kunkel RG, Larrick JW et al. Acute in vivo effects of human recombinant tumor necrosis factor. *Lab Invest* 1987; 56: 583-90.
- [5] Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 3-15.
- [6] Netea MG, Kullberg BJ, Joosten LA et al. Lethal Escherichia coli and Salmonella typhimurium endotoxemia is mediated through different pathways. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2529-38.
- [7] Milano S, Arcoleo F, D'Agostino P et al. Intraperitoneal injection of tetracyclines protects mice from lethal endotoxemia downregulating inducible

nitric oxide synthase in various organs and cytokine and nitrate secretion in blood. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 117-21.

[8] Hirata N, Hiramatsu K, Kishi K et al. Pretreatment of mice with clindamycin improves survival of endotoxic shock by modulating the release of inflammatory cytokines. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2638-42.

[9] Khan AA, Slifer TR, Araujo FG et al. Protection against lipopolysaccharide-induced death by fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3169-73.

[10] Zhanel GG, Walters M, Noreddin A et al. The ketolides: a critical review. *Drug* 2002; 62: 1771-804.

[11] Araujo FG, Slifer TL, Remington, J. Inhibition of secretion of interleukin-1 β and tumor necrosis factor alpha by the ketolide antibiotic telithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3327-30.

[12] Nakagawa S, Kojio S, Taneike I et al. Inhibitory action of telithromycin against Shiga toxin and endotoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 1194-9.

[13] Green LC, Wagner DA, Glogowski J et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-8.

[14] Ruiz-Bravo A, Moreno E, Jimenez-Valera M. Intestinal infection of BALB/c mice with *Yersinia enterocolitica* O9 causes major modifications in phenotype and functions of spleen cells. *Microbiology* 2001; 147: 3165-9.

[15] Nava E, Palmer RMJ, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *Lancet* 1991; 338: 1555-7.

[16] Louis H, Le Moine O, Peny MO et al. Hepatoprotective role of interleukin 10 in galactosamine/lipopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterology* 1997; 112: 935-42.

[17] Nicoletti F, Di Marco R, Sacerdote P et al. Prevention and treatment of lethal murine endotoxemia by the novel immunomodulatory agent MFP-14. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1591-4.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Effect of pretreatment with telithromycin on survival of mice after administration of LPS at either 50 mg per kg (A) or 25 mg per kg (B). Mice (16 per group) received 20 mg of telithromycin per kg (broken line) or saline (solid line) 1 h before LPS by i.p. route. $\underline{P} < 0.05$ for each comparison (Kaplan-Meier test).

FIG. 2. Effects of telithromycin and LPS on plasma levels of IL-1 (A), TNF-alpha (B) and IL-10 (C). Mice were treated by i.p. route with saline (□), 20 mg of telithromycin per kg (■), 25 mg of LPS per kg (▨), telithromycin 1 h before 25 mg of LPS per kg (▩), 50 mg of LPS per kg (□) and telithromycin 1 h before 50 mg of LPS per kg (▤). Results are mean ± standard deviation of three mice. *, $\underline{P} < 0.05$ versus LPS alone (Student's *t* test).

FIG. 3. Effects of telithromycin and LPS on nitrite concentrations in plasma samples from mice treated by i.p. route with saline (□), 20 mg of telithromycin per kg (■), 25 mg of LPS per kg (▨), telithromycin 1 h before 25 mg of LPS per kg (▩), 50 mg of LPS per kg (□) and telithromycin 1 h before 50 mg of LPS per kg (▤). Results are mean ± standard deviation of three mice. *, $\underline{P} < 0.05$; **, $\underline{P} < 0.01$ versus LPS alone (Student's *t* test).

Fig. 1

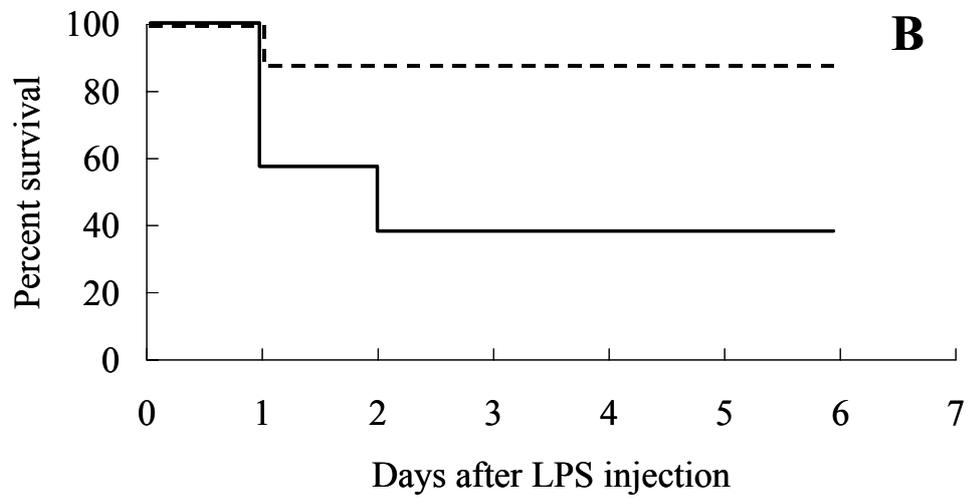
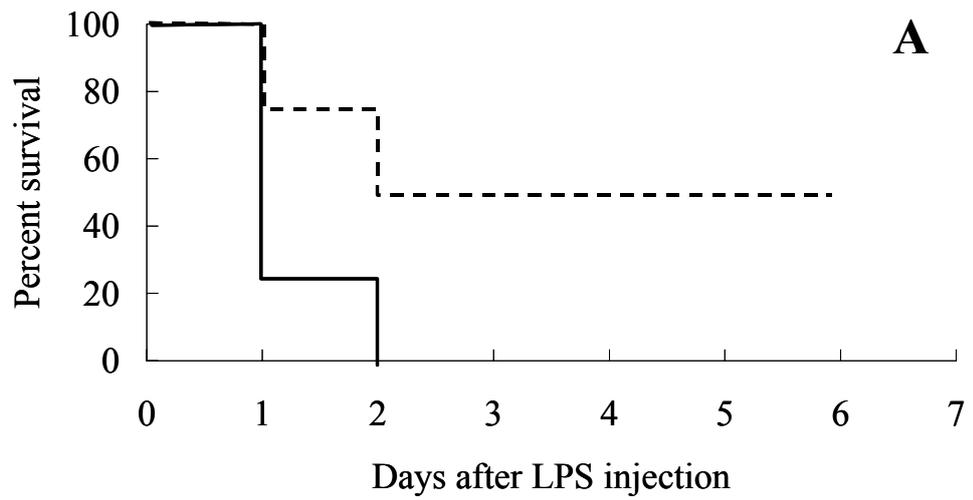


Fig. 2

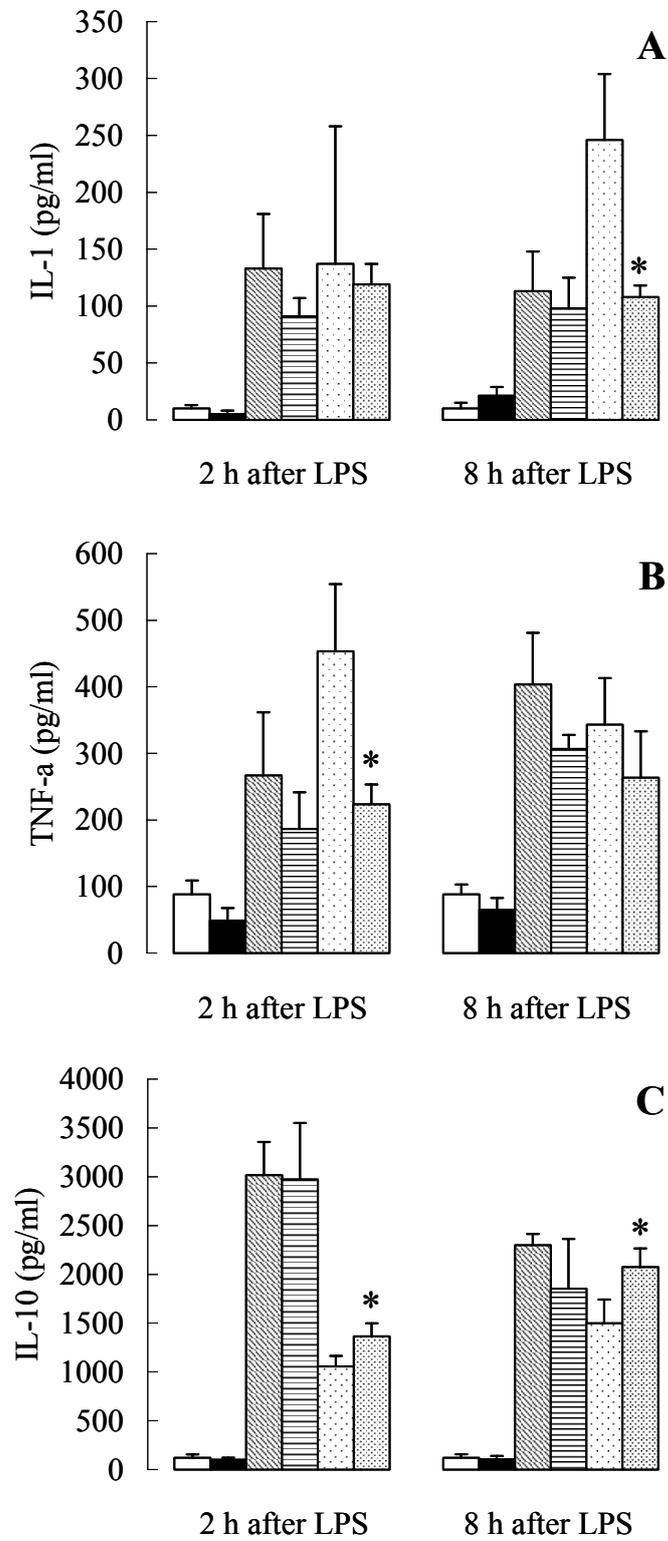
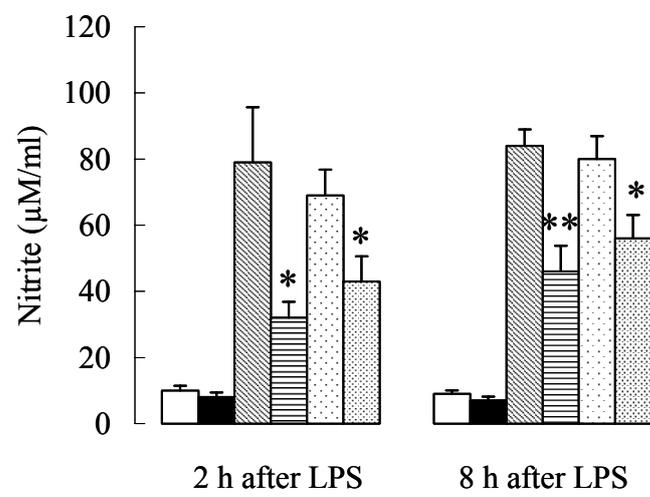


Fig. 3



DOCUMENT 2

TELITHROMYCIN INHIBITS THE PRODUCTION OF PROINFLAMMATORY MEDIATORS AND THE ACTIVATION OF NF-kappaB IN *IN VITRO* STIMULATED MURINE CELLS

Magdalena Leiva, Alfonso Ruiz-Bravo, Encarnación Moreno, Maria Jiménez-
Valera

**Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Granada,
Granada 18071, Spain**

Address correspondence to Prof Maria Jimenez-Valera, Departamento de
Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada 18071,
Spain. Tel: 34-958-243872; fax: 34-958-246235. E-mail: mjvalera@ugr.es

Running head:

Anti-Inflammatory Activity of Telithromycin

ABSTRACT- Telithromycin is a ketolide antibiotic that exerts anti-inflammatory effects. To investigate the molecular mechanisms of these effects, we examined the in vitro immunomodulatory activity of telithromycin on murine splenocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7. Spleen cells from BALB/c untreated mice and RAW 264.7 macrophages were cultured in presence of telithromycin (2.5, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$). Proliferation (colorimetric assay) and cytokine production (enzyme immunoassay) of spleen cells in response to lipopolysaccharide (LPS) and concanavalin A (Con A), and nitric oxide (colorimetric assay) and cytokine production by LPS-stimulated RAW 264.7 cells were determined. Telithromycin moderately enhanced lymphocyte proliferation in response to LPS and Con A. Con A-induced interferon gamma production was suppressed and LPS-induced interleukin-10 production was increased in spleen cell cultures with telithromycin. LPS-induced secretion of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) was suppressed by telithromycin in RAW 264.7 cultures. LPS-induced activation of NF- κ B transcription factor and TNF- α promoter in RAW 264.7 macrophages transiently transfected with the respective luciferase reporter constructs was also inhibited by the ketolide in a dose-dependent manner. The suppressive effect of telithromycin on LPS-induced NF- κ B activation was confirmed by western blot. These results suggest that telithromycin is an immunomodulating agent with anti-inflammatory activity mediated by the inhibition of activation of NF- κ B.

KEYWORDS – Telithromycin, interferon gamma, tumor necrosis factor alpha, interleukin-10, NF-kappaB, anti-inflammatory activity

INTRODUCTION

Many antibiotics have immunomodulatory activity beyond their antibacterial properties. Inflammatory reactions, phagocytosis, natural cytotoxicity, cytokine production, antibody responses and cellular immunity are defensive mechanisms that may be modulated by therapeutic doses of antimicrobial agents (1,2). Macrolides display immunomodulatory effects, including the inhibition of inflammatory reactions (3-5). This anti-inflammatory activity may contribute to its efficacy in the therapy of respiratory tract infections.

Telithromycin (TEL) is the first antibiotic belonging to the ketolide group, constituted by semisynthetic derivatives of 14-membered macrolides by replacement of the cladinose at position C3 with a keto group (6). Recently, TEL was shown to inhibit the secretion of interleukin-1 α and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human monocytes (7), and to exert anti-inflammatory effects in a mouse model of LPS-induced shock (8,9), and in a model of neutropenic mice experimentally infected with *Streptococcus pneumoniae* (10). Thus, TEL seems to possess interesting anti-inflammatory effects that need to be investigated at the cellular and intracellular levels. In the present work the effects of TEL on murine splenocyte ability to proliferate and produce cytokines in response to mitogenic stimuli were studied. Also, we described the TEL capacity to modulate the activation of the transcription factor nuclear factor kappa B (NF- κ B), and to modify the cytokine and nitric oxide production in stimulated RAW 264.7 cells (a murine macrophage line).

MATERIAL AND METHODS

Cells and antibiotic treatment

Spleen cells were obtained from untreated BALB/c female mice (10- to 12-week-old) that were maintained in pathogen-free conditions in the facilities of the Service for Animal Production and Experimentation of the University of Granada (Granada, Spain). National laws on the protection of animals were observed. Spleens were removed aseptically and homogenized in Hanks' balanced salt solution (all reagents and media, unless otherwise stated, were obtained from Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). Splenocytes from five mice were pooled, sedimented by centrifugation, resuspended in red blood cell lysing buffer for 10 min, washed, and resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate, and 2 mM L-glutamine, and viable cells were counted. RAW 264.7 cells were kindly provided by F. Gamarro (Lopez Neyra Institute of Parasitology and Biomedicine, CSIC, Granada, Spain) and cultured in DMEM medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, and 2 mM L-glutamine. Both splenocytes and RAW 264.7 macrophages were cultured at 37°C in 5% CO₂.

TEL was a gift from Aventis Pharma, Neuville-sur-Saonc (France). Untreated and TEL-treated cells were compared in each assay. The drug was diluted in the culture medium and added to cultures at final concentrations of 2.5, 5 and 10 μ g/ml, 1 h before mitogens.

Lymphocyte proliferation assay

Spleen cell suspensions were distributed (5×10^5 viable cells per well) into 96-well tissue culture clusters with flat-bottom wells (Costar, Corning Incorporated, NY, USA). *Escherichia coli* O:55B5 LPS was used at 2.5 $\mu\text{g/ml}$ as B-cell mitogen, and concanavalin A (Con A) was used at 1 $\mu\text{g/ml}$ as T-cell mitogen. Unstimulated and mitogen-stimulated cultures were incubated for three days, and lymphocyte proliferation was measured by colorimetric reading of MTT reduction as described by Mosmann (11).

Cytokine assay

Cells were cultured in 24-well tissue culture cluster. Spleen cells (5×10^6 viable cells per well) were stimulated with LPS (2.5 $\mu\text{g/ml}$) and Con A (1 $\mu\text{g/ml}$). RAW 264.7 cells (5×10^5 viable cells per well) were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$). The incubation times were indicated in the experiments. Cell-free supernatants were collected and stored at -20°C until assayed. Cytokines were quantified by commercially available enzyme immunoassays; the cytokine concentrations were interpolated from the recombinant cytokine standard curves.

Nitrite assay

Nitrite accumulation was used as an indicator of nitric oxide (NO) production by RAW 264.7 cells. Cultures were performed in in 96-well culture plates (5×10^4

cells per well) and cells were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$). After incubation for 24 h, supernatants were removed and frozen until assayed. Nitrite concentrations were quantified by a standard Griess reaction adapted to microplates (12). The absorbance at 550 nm was determined, with reference to a sodium nitrite standard curve, as described previously (13).

DNA transfection and luciferase assay

The NF- κ B, and TNF- α luciferase reporter constructs were kindly supplied by Dr. S. Roman-Roman (Prostrakan Pharmaceuticals, Romainville, France). RAW 264.7 cells were plated at a cell density of 1.5×10^5 cells/ml (60% confluency) in 24-multiwell plates, and transfected on the following day with the indicated plasmids. To normalize for transfection efficiency, plasmid pRL-TK containing the *Renilla* luciferase coding sequence under the control of herpes simplex virus thymidine kinase promoter was cotransfected as an internal control.

Transfections were performed using Transfectine. After 12 h, the cells were exposed to telithromycin, and 1 h later LPS was added (1 $\mu\text{g/ml}$). After 24 h of incubation, cells were lysed and assayed with a commercial kit. The luciferase activity was normalized by the *Renilla* luciferase activity to calculate the relative luciferase activity.

Western blot analysis

RAW 264.7 cells (10^6 cells/ml) were plated onto 60 mm Petri dishes. Culture medium was removed after 24 h and replaced with fresh medium containing 2%

heat-inactivated fetal calf serum, and incubation was extended for 18 h. At the end of incubation, cells were pretreated with TEL, and stimulated with LPS for 60 min. Then, cells were lysed with M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent with Halt Protease Inhibitor Cocktail (Pierce). Extracts (40 μ g of protein) were boiled in an equal volume of sample buffer (200 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% sodium dodecyl sulfate, 20% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue), and proteins were separated by electrophoresis in a 12% polyacrylamide gel and electro-transferred to nitrocellulose membranes (Pierce). Membranes were blocked in Tris-buffered saline (pH 7.6) containing 0.1% Tween-20 and 5% bovine serum albumin for 1 h at room temperature, and incubated overnight at 4°C with the same buffer containing a rabbit monoclonal antibody to phospho NF- κ B p65 (Ser536) (Cell Signaling Technology, MA). After washing 3 times with the blocking buffer, membranes were incubated with the same buffer containing alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G for 1 h at room temperature. Washings were repeated, and immunoreactive bands were developed with nitroblue tetrazolium-5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate. The density profile of each band was displayed by Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, MD).

Statistical analysis

The significance of the differences between the means was tested by Student's *t* test. A *P* value of < 0.05 was considered statistically significant. All experiments were repeated at least three times.

RESULTS

Effects of TEL on the capacity of spleen cells to respond to mitogenic stimuli

TEL exerted moderate but significant stimulation of LPS-induced mitogenesis at the concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$, and of Con A-induced mitogenesis at concentrations of 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 1). This effect was associated with a modulation of cytokine production. The concentration of interferon gamma (IFN- γ) in supernatants of spleen cell cultures after 3 days of incubation with Con A was reduced by 42% ($P < 0.01$), 42.5% ($P < 0.01$), and 39% ($P < 0.005$) with 2.5, 5, and 10 $\mu\text{g/ml}$ of TEL, respectively, whereas in LPS-stimulated cultures the antibiotic addition was without effect (Fig. 2A). The production of interleukin 2 (IL-2) in response to Con A was measured after 24 h of incubation, and was unaffected by TEL (data not shown). Interleukin 10 (IL-10) was measured in supernatants from 3-day cultures. The LPS-driven production of IL-10 was increased by 58% ($P < 0.02$), 75% ($P < 0.01$), and 62.5% ($P < 0.01$) in the presence of 2.5, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ of TEL, respectively, but the Con A-induced production of this cytokine was unaffected by the antibiotic (Fig. 2B).

Effects of TEL on the cytokine and nitric oxide production by LPS-stimulated RAW 264.7 cells

Previously to activation assays, cellular metabolic activity of the RAW 264.7 cells was assayed by measuring the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-

2,5-diphenyltetrazolium bromide by mitochondrial enzymes in viable cells (14). The cellular metabolic activity was not affected by TEL in a concentration range from 2.5 to 10 $\mu\text{g/ml}$ even when the cells were incubated with the ketolide for 24 h (data not shown). Next the effects of TEL on the LPS-induced production of TNF- α , IL-10, and NO in 24-h cultures were examined. The production of TNF- α was inhibited by 19% ($P < 0.05$), 30% ($P < 0.05$), and 40% ($P < 0.01$) with 2.5, 5, and 10 $\mu\text{g/ml}$ of TEL, respectively (Fig. 3A). The production of IL-10 was unaffected by the ketolide (data not shown). The concentration of nitrite in supernatants of LPS-stimulated cultures was inhibited by 17% ($P < 0.001$), 22% ($P < 0.005$), and 33% ($P < 0.001$) with 2.5, 5, and 10 $\mu\text{g/ml}$ of TEL, respectively (Fig. 3B).

Inhibition of the activation of NF- κ B and TNF- α promoter by TEL in RAW 264.7 cells

TEL suppressed in a dose-dependent manner the LPS-induced transcriptional activation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages transiently transfected with a plasmid containing the luciferase coding sequence under the control of this transcription factor (Fig. 4A). When the background of unstimulated cultures was subtracted from relative luciferase activity of LPS-stimulated cultures, the levels of inhibition of NF- κ B were 68% ($P < 0.005$) at 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 80% ($P < 0.005$) at 5 $\mu\text{g/ml}$, and 95% ($P < 0.001$) at 10 $\mu\text{g/ml}$ of TEL. The activation of TNF- α promoter was also inhibited by 50% ($P < 0.02$) with 5 $\mu\text{g/ml}$, and by 80% ($P < 0.005$) with 10 μg of TEL (Fig. 4B).

Western blot analysis confirmed the inhibition of NF- κ B by TEL. The inhibition was detected as soon as 1 h after stimulation with LPS in cultures pretreated with 2.5, 5 and 10 μ g/ml of TEL (Fig. 5A). Although a basal NF- κ B activation could be detected in these cells, Scion Image quantification of immunoreactive bands showed that the LPS-induced formation of phospho NF- κ B p65 was inhibited by 47 % with 5 μ g/ml, and by 80% with 10 μ g of TEL (Fig. 5B).

DISCUSSION

The present study demonstrates that TEL is an immunomodulating agent with anti-inflammatory activity. Modulation of the splenocyte functions was reflected on the cytokine production: Con A-induced production of IFN-gamma was suppressed, whereas LPS-induced secretion of IL-10 was increased. Con A binds TCR/CD3 complex inducing cross-linking and activating T cells largely via phospholipase C-mediated events and the effects of Con A on activation of mature T cells mimics the effects of high avidity TCR ligation (15). In consequence, in vitro stimulation with Con A has been widely used to assess effects of immunomodulatory agents on the Th1/Th2 cytokine profile (16). IFN-gamma is a type 1 cytokine that activates macrophages and regulates mechanisms of both innate and specific immunity (17), whereas IL-10 is a type 2 cytokine with anti-inflammatory activity (18). Some immunomodulating agents are able to inhibit Th1 and enhance Th2 development (19,20). However, the immunomodulation by TEL seems to be more complex. The Con A-induced production of IL-2 was unaffected by the ketolide. This was unexpected since genes coding for IFN-gamma and IL-2 belong to the Th1 pattern of genes, the expression of which is linked to the activation of NF-AT family of transcription factors (21). However, such a differential modulation of IFN-gamma and IL-2 production by Th1 cells is not unprecedented (22). Besides NF-AT, the NF-kappaB transcriptional factor pathway is also involved in regulation of IFN-gamma gene expression (23) and, in some instances, NF-kappaB but not NF-AT is required for IFN-gamma production (24); therefore, it is reasonable to correlate the inhibitory activity of TEL on NF-kappaB activation and the downregulation of IFN-gamma expression.

Con A-induced secretion of IL-10 was not modified by TEL. This suggests that the Th2 function was not potentiated by TEL. Besides Con A-stimulated Th2 cells, LPS-treated macrophages are a cellular source of IL-10 (25). Since LPS-induced production of IL-10 was enhanced by TEL, it is reasonable to hypothesize that the splenic macrophage functions were modulated by the antibiotic. This raises two questions. First, IL-10 is an anti-inflammatory cytokine (18), that inhibits the LPS-induced IFN-gamma production (26); however, IFN-gamma levels in LPS-stimulated spleen cell cultures were not modified by TEL. In this respect, it is important to consider that NK and NKT cells are the major source of IFN-gamma in the mouse spleen after LPS challenge (26,27), and some investigators have reported that IL-10 and IFN-gamma may be simultaneously produced by accessory cells and NK cells, respectively, when cocultured in the presence of LPS (28), or *Shigella* invasions (29). Second, TEL augmented LPS-induced IL-10 production by splenic macrophages, which agrees with data from in vivo models (8), but this drug failed to affect IL-10 production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. To explain similar discrepancies some authors have argued that the RAW 264.7 cells may not represent the macrophage population that is responsible for the in vivo enhancement of IL-10 production in LPS-treated mice (30), which obviously includes the splenic macrophage population.

Another apparent discrepancy is that TEL increased the production of IL-10 in spleen cells and suppressed the production of TNF- α in RAW 264.7 cells, but the expression of both cytokines is under the control of NF- κ B. However, NF- κ B

different regulates the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines (31), and there are alternative transcription factors which can induce IL-10 production in the absence of NF- κ B (32). Thus, the same immunomodulatory agent that up-regulates IL-10 production can simultaneously exert an inhibitory effect on the secretion of proinflammatory cytokines as TNF- α and on the activation of NF- κ B, as it has been documented by several authors (33,34).

In the present study, the anti-inflammatory activity of TEL, revealed by the suppression of the LPS-induced release of TNF- α and NO, has been confirmed at the gene transcription level. NF- κ B is involved in the expression of inducible nitric oxide synthasa and proinflammatory cytokines such as TNF- α in LPS-stimulated macrophages (35), and agents inhibiting the activation of this transcription factor possess potent anti-inflammatory properties (36). Our results suggest that suppressive activity of TEL on inflammatory response may, in part, account for its clinical efficacy on the therapy of respiratory tract infections.

Acknowledgments

We are grateful for financial support from Junta de Andalucía (Research Group CVI201). M. Leiva was recipient of a FPU grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

References

1. Labro MT: Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clin Microbiol Rev* 13:615-650, 2000.
2. Stevens DL: Immune modulatory effects of antibiotics. *Curr Opin Infect Dis* 9:165-169, 1996.
3. Amsden GW: Anti-inflammatory effects of macrolides - an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? *J Antimicrob Chemother* 55:10-21, 2005.
4. Labro MT, Abdelghaffar H: Immunomodulation by macrolide antibiotics. *J Chemother* 13:3-8, 2001.
5. Tamaoki J: The effects of macrolide on inflammatory cells. *Chest* 125(Suppl 2):41-51, 2004.
6. Ackermann G, Rodloff AC: Drugs of the 21st century: telithromycin (HMR 3647), the first ketolide. *J Antimicrob Chemother* 51:497-511, 2003.

7. Araujo FG, Slifer TL, Remington JS: Inhibition of secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor α by the ketolide antibiotic telithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3327-3330, 2002.
8. Leiva M, Ruiz-Bravo A, Moreno E, Jimenez-Valera M: The anti-inflammatory activity of telithromycin in a mouse model of septic shock. *Int J Antimicrob Agents* 29:364-365, 2007.
9. Lotter K, Höcherl K, Bucher M, Kees F: In vivo efficacy of telithromycin on cytokine and nitric oxide formation in lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation in mice. *J Antimicrob Chemother* 58:615-621, 2006.
10. Niclau DP, Tessier R, Rubinstein I, Nightingale CH : In vivo immunomodulatory profile of telithromycin in a murine pneumococcal infection model. *Pharmazie* 61:343-347, 2006.
11. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65:56-63, 1983.
12. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138, 1982.

13. Ruiz-Bravo A, Moreno E, Jimenez-Valera M: Intestinal infection of BALB/c mice with *Yersinia enterocolitica* O9 causes major modifications in phenotype and functions of spleen cells. *Microbiology* 147:3165-3169, 2001.
14. Menge C, Wieler LH, Schlapp T, Baljer G: Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations in vitro. *Infect Immun* 67:2209–2217, 1999.
15. Miao B, Li J, Fu X, Ding J, Geng M: T-cell receptor (TCR)/CD3 is involved in sulfated polymannuroguronate (SPMG)-induced T lymphocyte activation. *Int Immunopharmacol* 5:1171-1182, 2005.
16. Viveros-Paredes JM, Puebla-Perez AM, Gutierrez-Coronado O, Sandoval-Ramirez L, Villasenor-Garcia MM: Dysregulation of the Th1/Th2 cytokine profile is associated with immunosuppression induced by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in mice. *Int Immunopharmacol* 6:774-781, 2006.
17. Bohem U, Kiamp T, Groof M, Howard JC: Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15:749-795, 1997.
18. Moore KW, De Waal R, Coffman RL, O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765, 2001.

19. Iwata M, Eshima, Y, Kagechika H: Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol* 15:1017-1025, 2003.
20. Kang BY, Song YJ, Kim KM, Choe YK, Hwang SY, Kim TS: Curcumin inhibits Th1 cytokine profile in CD4⁺ T cells by suppressing interleukin-12 production in macrophages. *Brit J Pharmacol* 128:380-384, 1999.
21. Porter CM, Clipstone NA: Sustained NFAT signaling promotes a Th1-like pattern of gene expression in primary murine CD4⁺ cells. *J Immunol* 168:4936-4945, 2002.
22. Zeyda M, Szekeres AB, Säemann MD, Geyeregger R, Stockinger H, Zlabinger GJ, Waldhaus W, Stulnig TM: Suppression of T cell signaling by polyunsaturated fatty acids: selectivity in inhibition of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor activation. *J Immunol* 170:6033-6039, 2003.
23. McCracken SA, Gallery E, Morris JM: Pregnancy-specific down-regulation of NF- κ B expression in T cells in humans is essential for the maintenance of the cytokine profile required for pregnancy success. *J Immunol* 172:4583-4591, 2004.
24. Rodriguez-Galan MC, Bream JH, Farr A, Young HA: Synergistic effect of IL-2, IL-12, and IL-18 on thymocyte apoptosis and Th1/Th2 cytokine expression. *J Immunol* 174:2796-2804, 2005.

25. Meisel C, Vogt K, Platzer C, Randow F, Liebenthal C, Volk HD: Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. *Eur J Immunol* 26:1580-1586, 1996.
26. Varma TK, Lin CY, Toliver-Kinsky TE, Sherwood ER: Endotoxin-induced gamma interferon production: contributing cell types and key regulatory factors. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:530-543, 2002.
27. Kim S, Izuka K, Aguila HL, Weissman IL, Yokoyama WM: In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2731-2736, 2000.
28. Kikuchi T, Hahn CL, Tanaka S, Barbour SE, Schenkein HA, Tew JG: Dendritic cells stimulated with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* elicit rapid gamma interferon responses by natural killer cells. *Infect Immun* 72:5089-5096, 2004.
29. Samandari T, Kotloff KL, Losonsky GA, Picking WD, Sansonetti PJ, Levine MM, Sztein MB: Production of IFN- γ and IL-10 to *Shigella* invasins by mononuclear cells from volunteers orally inoculated with a Shiga toxin-deleted *Shigella dysenteriae* type 1 strain. *J Immunol* 164:2221-2232, 2000.

30. Hasko G, Nemeth ZH, Szabo C, Zsilla G, Salzman AL, Vizi ES:
Isoproterenol inhibits IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7
macrophages. *Brain Res Bull* 45:183-187, 1998.
31. Cao S, Zhang X, Edwards JP, Mosser DM: NF- κ B1 (p50) homodimers
differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J
Biol Chem* 281:26041-26050, 2006.
32. Lucas M, Zhang X, Prasanna V, Mosser DM: ERK activation following
macrophage Fc γ R ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus. *J
Immunol* 175:469-477, 2005.
33. Changhua L, Jindong Y, Defa L, Lidan Z, Shiyan Q, Jianjun X: Conjugated
linoleic acid attenuates the production and gene expression of proinflammatory
cytokines in weaned pigs challenged with lipopolysaccharide. *J Nutr* 135:239-244,
2005.
34. Park JS, Lee EJ, Lee JC, Kim WK, Kim HS: Anti-inflammatory effects of
short chain fatty acids in IFN- γ -stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells:
involvement of NF- κ B and ERK signalling pathways. *Int Immunopharmacol*
7:70-77, 2007.
35. Jones BW, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, Fenton
MJ: Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses.
J Leukoc Biol 69:1036-1044, 2001.

36. Ban HS, Suzuki K, Lim SS, Jung SH, Lee S, Ji J, Lee HS, Lee YS, Shin KH, Ohuchi K: Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α by 2'-hydroxychalcone derivatives in RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol* 67:1549-1557, 2004.

Figure legends

Fig. 1 - Effects of TEL on the proliferation of murine splenocytes in response to LPS and Con A. Splenocytes were incubated without TEL and with 2.5, 5 and 10 μg of TEL per ml 1 h before the addition of mitogens. Results are the means of data from eight cultures. Lines represent the standard deviation of the means. Each TEL-containing group was compared with the respective TEL-free group by Student's t test ($*P < 0.01$, $**P < 0.001$).

Fig. 2 - Effects of TEL on the production of IFN-gamma (A), and IL-10 (B) by murine splenocytes in response to LPS and Con A. Splenocytes were incubated without TEL and with 2.5, 5 and 10 μg of TEL per ml 1 h before mitogenic stimulation. Results are the means of data from three cultures. Lines represent the standard deviation of the means. Each TEL-containing group was compared with the respective TEL-free group by Student's t test ($*P < 0.02$, $**P < 0.01$, $***P < 0.005$).

Fig. 3 - Effects of TEL on the production of TNF-alpha (A) and NO (B) by RAW 264.7 monocytes stimulated with LPS. Cells were incubated without TEL and with 2.5, 5 and 10 μg of TEL per ml 1 h before stimulation. Results are the means of data from three cultures. Lines represent the standard deviation of the means. Each TEL-containing group was compared with the respective TEL-free group by Student's t test ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.005$, $****P < 0.001$).

Fig. 4 - Effects of TEL on activation of NF-kappaB (A), and TNF-alpha promoter (B) in RAW 264.7 monocytes stimulated with LPS. RAW 264.7 cells transitorily transfected with NF-kappaB, and TNF-alpha luciferase reporter constructs were incubated without TEL and with 2.5, 5 and 10 µg of TEL per ml 1 h before stimulation. Results are the means of data from four cultures. Lines represent the standard deviation of the means. Each TEL-containing group was compared with the respective TEL-free group by Student's t test (* $P < 0.02$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$).

Fig. 5 - Inhibitory effect of TEL on NF-kappaB activation in RAW 264.7 monocytes. The Western-blot illustrates the activation of NF-κB in cells exposed 1 hour to LPS and preincubated 1 hour in presence of different concentrations of TEL (A). The density profile of immunoreactive bands was displayed by Scion Image software (B).

Fig. 1.

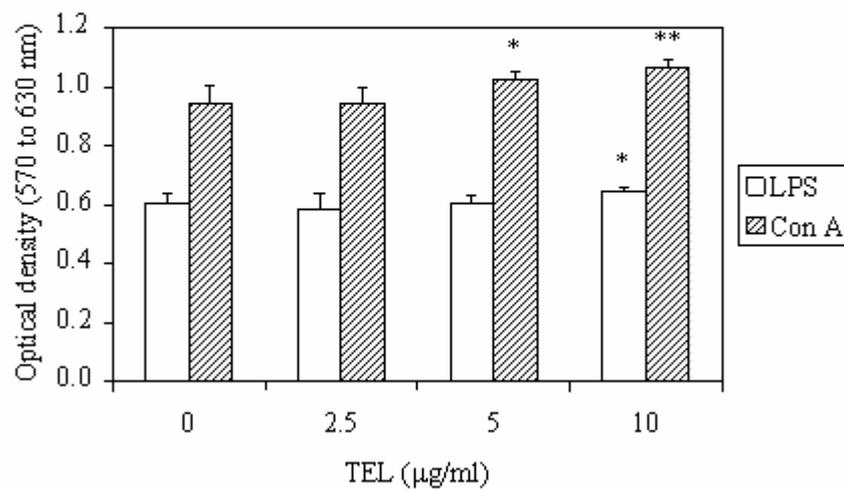


Fig. 2

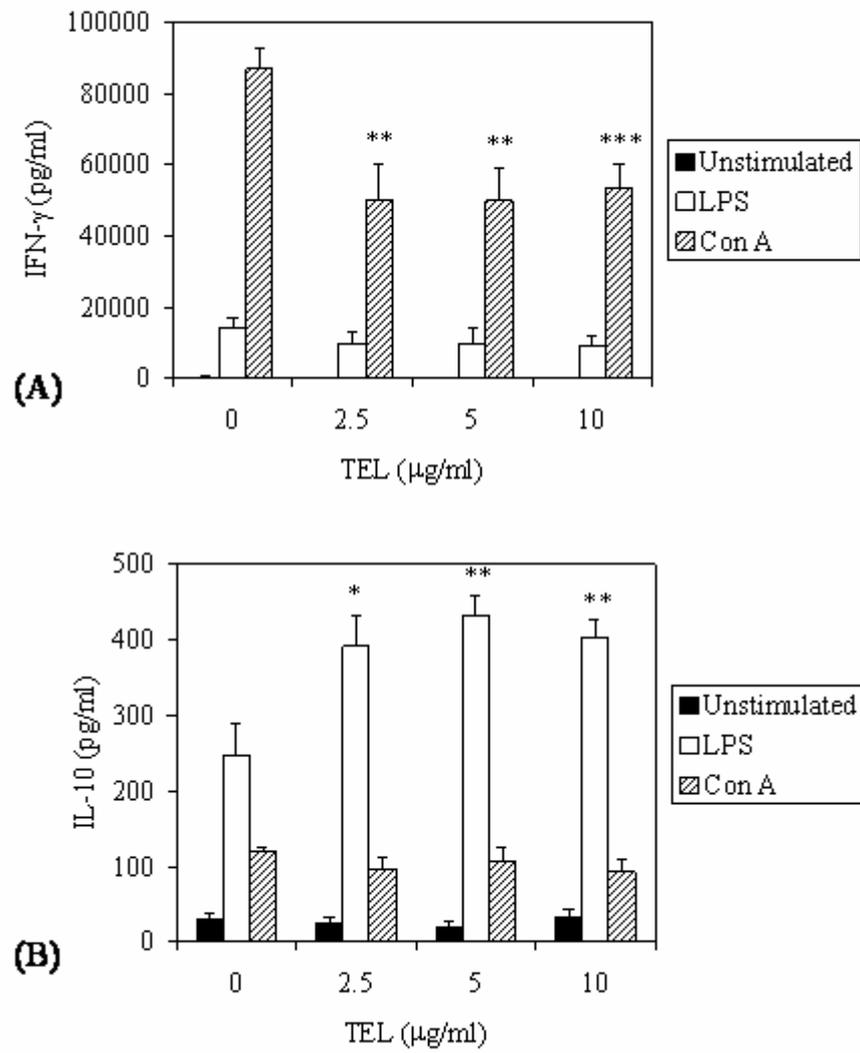


Fig. 3

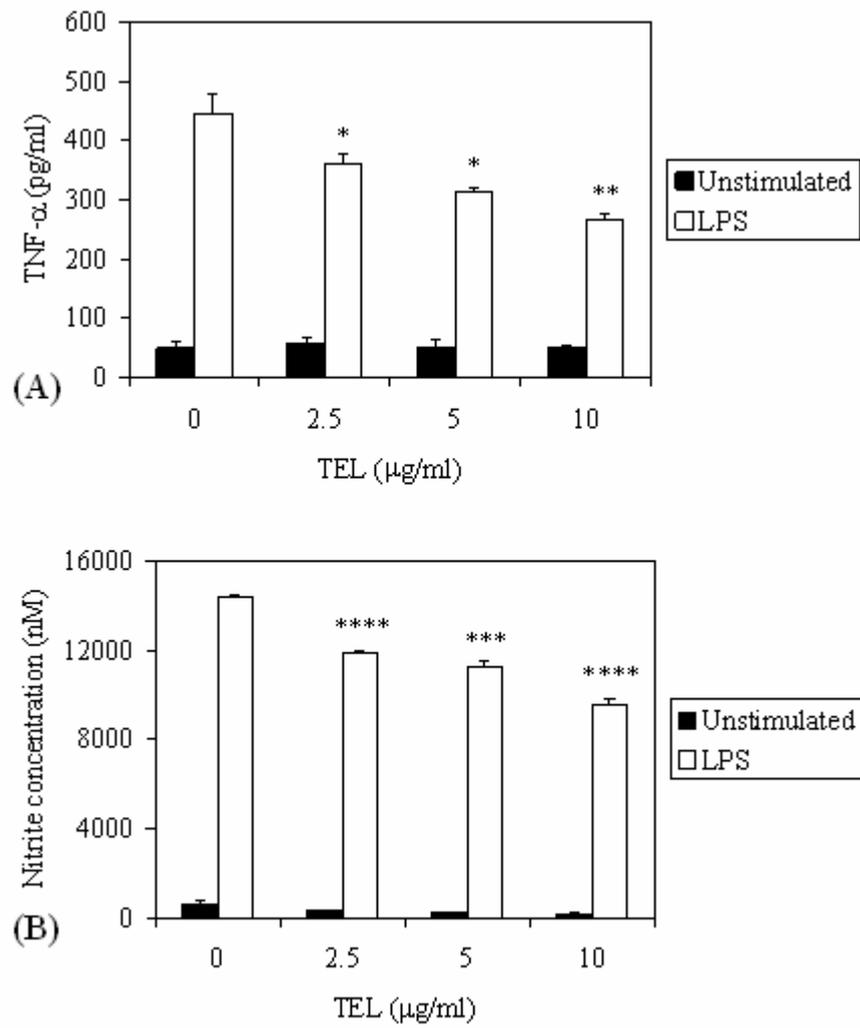


Fig. 4

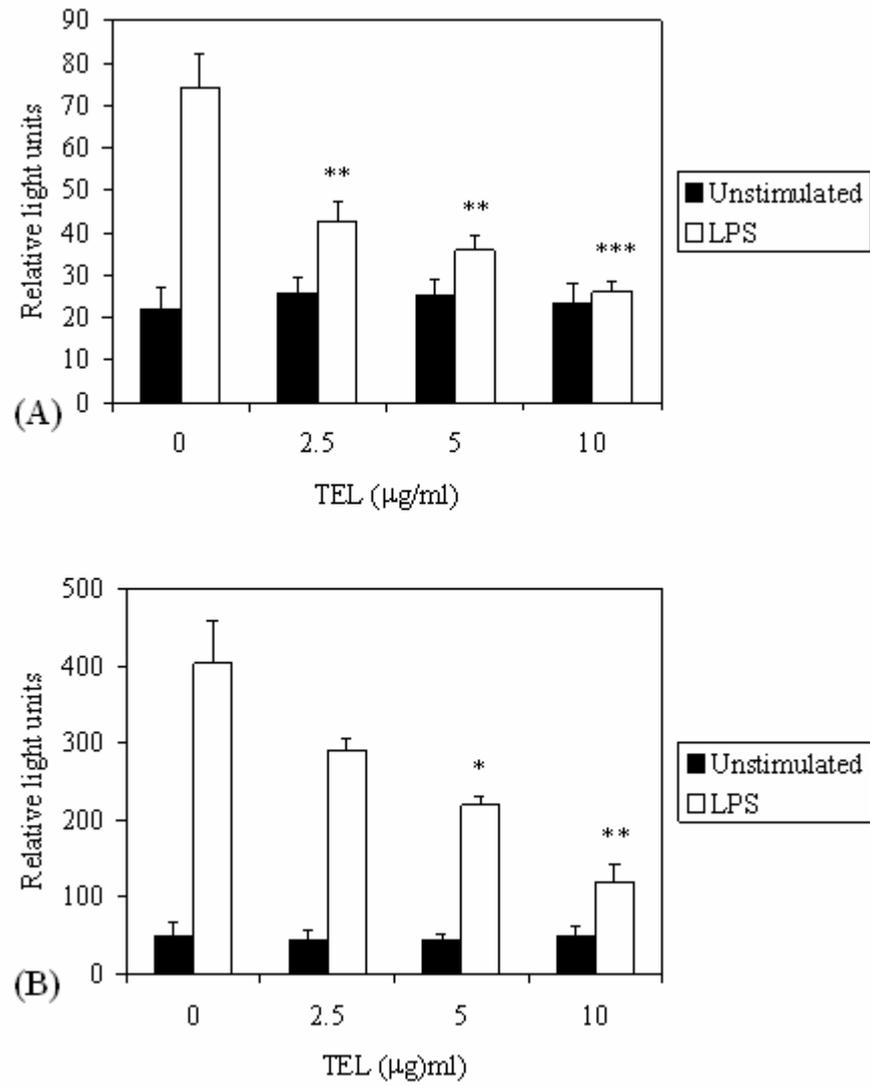
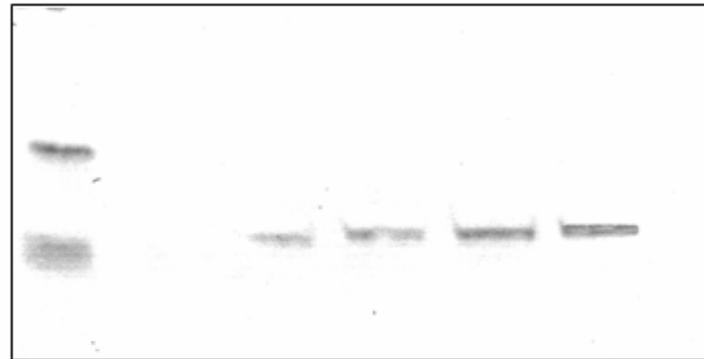
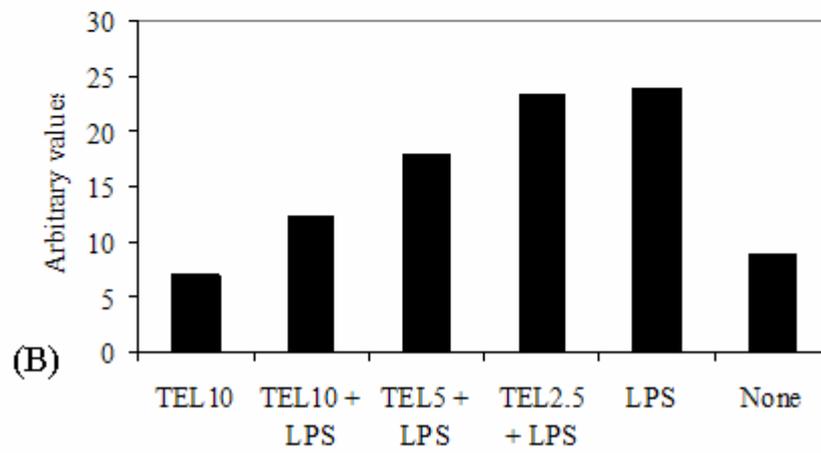


Fig. 5

LPS	-	+	+	+	+	-
TEL	10	10	5	2.5	0	0
($\mu\text{g/ml}$)						



(A)



(B)

DOCUMENT 3

Effects of Telithromycin in *In Vitro* and *In Vivo* Models of Endotoxin-Induced Airway Inflammation

Magdalena Leiva; Alfonso Ruiz-Bravo, PhD; and Maria Jimenez-Valera, PhD

From the Microbial Immunology Research Group, Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Spain.

Support for this research was provided by Junta de Andalucía (Research Group CVI201). M. Leiva was recipient of a FPU grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Correspondence to: Maria Jimenez-Valera, PhD, Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada 18071, Spain; e-mail: aruizbr@ugr.es

Background: The ketolide antibiotic telithromycin (TEL) exerts immunomodulatory and anti-inflammatory effects *in vitro*, and in a mouse model of septic shock. We studied the anti-inflammatory activity of TEL in *in vitro* and *in vivo* models of airway inflammation induced with lipopolysaccharide (LPS).

Methods: We measured the effects of TEL on the response of RAW 264.7 macrophages to LPS and of MLE-12 epithelial cells to supernatants of LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Cytokine (MIP-2 and TNF- α) production, NF- κ B activation, and apoptosis were determined. Acute airway inflammation was induced in untreated and TEL-treated BALB/c mice by nebulization with LPS. Total leukocyte number, macrophages, neutrophils, protein concentration, and nitrite and cytokine levels were determined in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid.

Results: TEL inhibited in a dose-dependent manner the production of MIP-2 and TNF- α by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, and the production of MIP-2 by MLE-12 epithelial cells to supernatants of LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. NF- κ B activation was inhibited and apoptosis was increased in both cell lines by TEL. The LPS-induced influx of neutrophils in BAL was decreased by TEL pre-treatment. TEL also decreased the protein, nitrite, MIP-2 and TNF- α levels in BAL, and MIP-2 and TNF- α levels in plasma of LPS-nebulized animals.

Conclusions: We have provided evidence that TEL exerts potent anti-inflammatory effects in LPS-induced airways injury. We propose that TEL acts in the early phase of inflammation by reducing release of inflammatory mediators through NF- κ B inhibition, and in the later phase through enhancement of inflammatory cell apoptosis.

Key words: Telithromycin; anti-inflammatory activity; airways inflammation; NF-kappaB inhibition; apoptosis

Abbreviations: FCS = fetal calf serum; iNOS = inducible inducible nitric oxide syntase; LPS = lipopolysaccharide; MIP-2 = macrophage inflammatory protein-2; NF-kappaB = nuclear factor kappa B; TEL = telithromycin; TNF-alpha = tumor necrosis factor alpha

Airway inflammation is a common feature of infectious pulmonary diseases. Although the inflammatory response contributes to clear pathogens from the site of infection, a prolonged inflammatory response might worsen lung injury. The initial phase of the innate response to infection includes macrophage stimulation and release of signals that trigger an inflammatory response.¹ Alveolar macrophages are the first line of innate cell-mediated immunity in the lower respiratory tract.² The early inflammatory response is mediated by Toll-like receptors (TLRs) on macrophages.^{1,3} The lipopolysaccharide (LPS) from Gram-negative bacteria is an important inducer of lung injury. LPS causes the release by macrophages of proinflammatory cytokines such as tumour necrosis factor alpha (TNF- α), and chemokines, and the expression of inducible nitric oxide syntase (iNOS).^{4,5} LPS and the LPS-binding protein constitute a complex that interacts with the cell surface molecules CD14 and the TLR-4 to activate intracellular signal transduction pathways involved in activation of the transcription factors such as nuclear factor kappa B (NF- κ B).^{6,7} Regulation of proinflammatory cytokines is largely dependent upon the activation of NF- κ B, because the promoter regions of many of these genes are known to contain

binding sites for this transcription factor.⁸ Although resident alveolar macrophages have long been considered to be the major cell type in the lung responsible of initiating the inflammatory cascade, it has been demonstrated that airway epithelial NF- κ B activation is sufficient to promote neutrophilic airway inflammation, implying that epithelial cells are capable of inducing the expression of genes to initiate an inflammatory signaling cascade.^{9,10} The extravasation of chemotactically attracted and activated neutrophil polymorphonuclear leukocytes is a key event in the development of acute lung injury.^{3,11} Activated neutrophils constitute a source of numerous inflammatory mediators, which may contribute to basement membrane destruction and airway remodeling, two processes occurring in most inflammatory pulmonary diseases. The chemokine macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2), which has been considered a functional analogue of human IL-8, is an important mediator of recruitment of neutrophils into lung, bacterial clearance, and mortality in murine models of pneumonia and severe sepsis.¹²⁻¹⁵ Moreover, mediators secreted by airway epithelial cells and infiltrating leukocytes affect apoptotic process, which are involved in the control of inflammation and the restoration of homeostasis.¹⁶

Telithromycin (TEL) belongs to the ketolide family, a new class of 14-membered ring macrolide agents characterized by a keto group at position 3 of the macrolide ring.¹⁷ TEL is active against bacteria associated with community-acquired pneumonia, acute exacerbation of chronic bronchitis, and acute sinusitis.^{18,19} TEL has shown to exert immunomodulatory and anti-inflammatory effects *in vitro*,²⁰⁻²² and in a mouse model of septic shock.^{23,24} Although there

are some evidences of the immunomodulatory activity of TEL in some respiratory infection models,^{25,26} there are no *in vivo* studies evaluating the activity and the immunological impact of TEL in lipopolysaccharide-induced airway inflammation in mice. We hypothesized that the anti-inflammatory activity would be an important component of the therapeutic effect of TEL on respiratory infections. Thus, we designed the present study to test the anti-inflammatory activity of TEL in an *in vitro* model of LPS-induced airway inflammation, and to determine if this anti-inflammatory activity occurs *in vivo*, in a mouse model of acute, LPS-induced lung injury.

Material and Methods

Cells and culture conditions

Murine lung epithelial cells (MLE-12) were kindly provided by Dr. S. Roman-Roman (Prostrakan Pharmaceuticals, Romainville, France). MLE-12 cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 1 mM sodium pyruvate, and 2 mM L-glutamine, all purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Macrophage cell line RAW 264.7 cells were kindly provided by Dr. F. Gamarro (Lopez Neyra Institute of Parasitology and Biomedicine, CSIC, Granada, Spain). RAW 264.7 cells were cultured in DMEM medium (Sigma) supplemented with 10% FCS, 1 mM sodium pyruvate, and 2 mM L-glutamine. Both MLE-12 and RAW 264.7 cells were cultured at 37°C in 5% CO₂.

Measurement of cell viability

Cell viability was assessed by measuring the mitochondrial-dependent reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)²⁷. Cells grown in 96-well plates were cultured with or without 2.5, 5 and 10 µg/ml of TEL (Aventis Pharma, Neuville-sur-Saonc, France) for 24, 48 and 72 h, after which the medium was replaced by MTT at 0.5 mg/ml, and cultures were incubated for 60 min. Cells were harvested, solubilized in dimethyl sulfoxide, and the amount of formazan formed was quantified by measuring the absorbance of the solution at 540 nm.

In vitro model of LPS-induced inflammation

RAW 264.7 cells were grown to confluence in 24-well plates (Costar, Corning Incorporated, NY, USA), and stimulated with 1 µg/ml of LPS. TEL was diluted in the culture medium and added to cultures at final concentrations of 2.5, 5 and 10 µg/ml, 1 h before stimulation. After incubation for 6 h or 24 h, cell-free supernatants were collected and stored at -20°C until assayed.

MLE-12 cells were grown to confluence in 24-well plates and incubated with 2.5, 5 and 10 µg/ml of TEL for 1 h. Culture medium was replaced by supernatant from 24-h cultures of RAW 264.7 cells unstimulated and stimulated with LPS. Supernatants were previously diluted 1:2 in fresh medium. After incubation for 24 h, supernatants from MLE-12 cells were removed and frozen until assayed.

DNA transfection and luciferase assay

The plasmid pNF-κB containing the luciferase coding sequence under the control of NF-κB was kindly supplied by Dr. S. Roman Roman. Cells were seeded at a cell density of 10^4 cells/well in 96-well plates and transfected on the following day with pNF-κB using Lipofectamine 2000 (Invitrogen S.A., BioSource Products, Izasa Barcelona, Spain). To normalize for transfection efficiency, plasmid pRL-TK containing the Renilla luciferase coding sequence under the control of herpes virus thymidine kinase promoter (Promega,

Madison, WI, USA) was cotransfected as an internal control. At 12 hours post-transfection the medium was replaced by DMEM with 0.2 % FCS. Cells were exposed to telithromycin, and 1 h later LPS was added (1 µg/ml). After 24 h of incubation, cells were lysed and assayed with a commercial kit (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega). The luciferase activity was normalized by the *Renilla* luciferase activity to calculate the relative luciferase activity.

Apoptosis assay

The effect of TEL in the rate of apoptosis in RAW 264.7 and MLE-12 cells was assessed using the Cell Death Detection ELISA PLUS System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The test principle is based on the determination of the amount of mono- and oligonucleosomes generated during the apoptotic fragmentation of cellular DNA. Cells were cultured for 24 h at a density of 5×10^3 cells per well in 96-wells plates. Culture media were replaced by DMEM supplemented with 1% FCS and some cultures received 10 µg/ml of TEL 1 h before induction of apoptosis. RAW 264.7 cells were induced with LPS for 24 h, or with camptothecin (2 µg/ml) (Sigma) for 5 h. MLE-12 cells were induced for 24 h with supernatants from unstimulated and LPS-stimulated RAW 264.7 cells, or with camptothecin. Cells were washed with PBS and incubated in lysis buffer (200 µl) for 30 minutes. After centrifugation for 10 minutes at 1500 rpm and 4°C, 20 µl of each sample was incubated with a mixture of anti-histone-biotin and anti-DNA-peroxidase-linked antibody for 2 h. After 3 washing steps, 100 µl of ABTS substrate solution was added, and the rate of apoptosis was determined by photometric measurement at 405 nm.

Mouse model of LPS-induced lung injury

Ten- to 12-week-old female BALB/c mice were obtained from the Technical Services of the University of Granada (Granada, Spain) and maintained under pathogen-free conditions. The experiments were approved and supervised by the local ethic committee at the University of Granada. Animals were exposed for 20 minutes to an aerosol of LPS (500 µg/ml) using a custom-built cylindrical chamber (22 cm in length, 12 cm in diameter) directly connected to an air nebulizer (Miko, CA-MI s.n.c. Italy) that produces particles in the range of 1 to 5 µm at an airflow of 7 liters/min. These experimental conditions were fixed in preliminary experiments. At 4 and 24 h after LPS exposure, blood samples were obtained by retro-orbital puncture with heparinized capillary tubes in anesthetized mice. Blood was immediately centrifuged, and plasma was stored at –20°C until determination of inflammatory mediators. Mice were killed by cervical dislocation, the trachea was exposed by a midline incision and cannulated with a sterile polyethylene tube attached to a 1-ml syringe. Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed twice in a total volume of 1 ml of PBS.

Analysis of leukocytes in BAL

BAL was centrifuged at 4°C at 1000 rpm, and supernatants stored at -20 °C for cytokine, nitrite and proteins assays. Cell pellets were resuspended in PBS containing 1% (w/v) BSA (Sigma) for total cell counting in a hemacytometer,

and macrophage and granulocytes populations were counted by flow cytometry using rat monoclonal antibodies (MoAbs) purchased to BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). The MoAbs used were an R-phycoerythrin-conjugated anti CD14 to stain macrophages, and a fluorescein isothiocyanate-conjugated GR-1 (Ly-6G) to stain neutrophils. Cells (10^5) were incubated simultaneously with 2 μg of each one of the two MoAbs at 4°C for 1 h. Cells were washed, suspended in PBS containing 2% paraformaldehyde and kept in the dark until analyzed by flow cytometry. Cell samples were analyzed by using a FACS-Vantage flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), with CELL Quest (Becton Dickinson) software for data acquisition. Data for 10000 cells were acquired.

Cytokine assay

Cell-free supernatants, BAL samples, and plasma samples were collected and stored at -20°C until assayed. Cytokines were quantified by commercially available enzyme immunoassays (Pierce, Rockford, IL, for TNF- α , and R&D Systems, Minneapolis, MN, for MIP-2). The cytokine concentrations were interpolated from the recombinant cytokine standard curves.

Nitrite assay

Nitrite accumulation was used as an indicator of iNOS expression in inflammatory cells. Nitrite concentrations were quantified by a standard Griess

reaction adapted to microplates.²⁸ The absorbance at 550 nm was determined, with reference to a sodium nitrite standard curve.

Statistical analysis

The significance of the differences between the means was tested by Student's t test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Effect of TEL on cytokine production by LPS-stimulated RAW 264.7 cells and by MLE-12 cells stimulated with supernatants from RAW 264.7 cultures

Resident alveolar macrophages and airway epithelial cells are responsible of initiating the inflammatory response in the lung. In these in vitro experiments, the macrophage-epithelial interaction was recreated to provide a model of the pulmonary acute inflammation. Previously, cellular metabolic activity of the RAW 264.7 and MLE-12 cells was assayed by measuring the reduction of MTT by mitochondrial enzymes in viable cells²⁷. The cellular metabolic activity was not affected by TEL in a concentration range from 2.5 to 10 µg/ml (data not shown). Next, RAW 264.7 macrophages were stimulated with LPS for 24 h to measure the production of MIP-2. Pre-treatment with TEL 1 h before LPS suppressed in a dose-dependent manner the production of the chemokine: the levels of inhibition were 17% ($p < 0.05$) at 2.5 µg/ml, 19% ($p < 0.01$) at 5 µg/ml, and 26% ($p < 0.005$) at 10 µg/ml of TEL when compared with the TEL-free cultures (Fig 1 *top, A*). Direct stimulation with LPS did not induce the production of MIP-2 by MLE-12 cells (data not shown), but incubation of MLE-12 cells with unstimulated or LPS-stimulated RAW 264.7 supernatants demonstrated that macrophage-derived inflammatory mediators induced the production of MIP-2 by the epithelial cells (Fig 1 *bottom, B*). As depicted in Fig. 1 *bottom, B*, MIP-2 production by MLE-12 cells incubated for 24 h with supernatants from LPS-treated RAW 264.7 macrophages was also suppressed by 14% ($p < 0.05$) at 2.5 µg/ml, 30% ($p < 0.05$) at 5 µg/ml and 36% ($p < 0.005$) at 10 µg of TEL.

TNF- α is a pro-inflammatory monokine that plays a major role in mediating the chemokine response of airway epithelial cells.^{29,30} In our model, RAW 264.7 macrophages produced TNF- α in response to LPS, and this production was significantly inhibited by 24% ($p < 0.05$), 36% ($p < 0.05$) and 54% ($p < 0.005$) 6 h after stimulation with LPS in cultures pre-treated with 2.5, 5, and 10 μ g/ml of TEL, respectively, 1 h before stimulation (Fig 2, *top, A*). The inhibition was also observed 24 h after stimulation, with suppression levels of 24% ($p < 0.05$), 35% ($p < 0.05$) and 46% ($p < 0.01$) obtained with 2.5, 5, and 10 μ g/ml of TEL, respectively (Fig 2, *bottom, B*).

Effect of TEL on the activation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages and MLE-12 epithelial cells

Since NF- κ B is an important transcription factor that regulates airway inflammation,³¹ we assessed its role in the anti-inflammatory activity of TEL. First, we measured the effect of TEL on NF- κ B DNA binding activity by ELISA in nuclear extracts from cells 1 h after stimulation with LPS or TNF- α containing supernatants. Pre-treatment with TEL was performed 12 h before stimulation. Following exposure of RAW 264.7 macrophages to 2.5, 5, and 10 μ g/ml of the ketolide, NF- κ B DNA binding activity was inhibited by 26% ($p < 0.05$), 34% ($p < 0.01$) and 41% ($p < 0.005$), respectively (Fig 3, *top, A*). Similarly, pre-treatment with TEL significantly reduced NF-kappaB DNA binding activity in MLE-12 epithelial cells incubated for 1 h with supernatants from LPS-treated RAW 264.7

macrophages. The inhibition levels were 23% ($p < 0.05$) at 5 $\mu\text{g/ml}$ and 30% ($p < 0.05$) at 10 μg of TEL (Fig 3, *bottom, B*).

The inhibitory activity of TEL on NF- κ B was confirmed in experiments with cells transiently transfected with a plasmid containing the luciferase coding sequence under the control of this transcription factor. Transfected RAW 264.7 macrophages were stimulated with LPS for 24 h. TEL was added 1 h before stimulation. NF- κ B activation was inhibited by 24% ($p < 0.05$) at 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 37% ($p < 0.01$) at 5 $\mu\text{g/ml}$ and 61% ($p < 0.005$) at 10 μg of TEL (Fig 4, *top, A*). On the other hand, transfected MLE-12 epithelial cells were incubated for 24 h with supernatants from LPS-treated RAW 264.7 macrophages, and some cultures received TEL 1 h before stimulation. NF- κ B activation was inhibited by 25% ($p < 0.05$) at 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 49% ($p < 0.05$) at 5 $\mu\text{g/ml}$ and 61% ($p < 0.05$) at 10 μg of TEL (Fig 4, *bottom, B*).

Effect of TEL on apoptosis of RAW 264.7 macrophages and MLE-12 epithelial cells

Apoptosis is considered as a mechanism to contain inflammation.³² To determine whether modulation of apoptosis played a role in the anti-inflammatory activity of TEL, RAW 264.7 macrophages were induced with LPS for 24 h or with camptothecin for 5 h and apoptotic fragmentation of DNA was quantified. Pre-treatment with TEL (10 $\mu\text{g/ml}$) 1 h before induction increased 1.23-fold the apoptotic activity induced by LPS ($p < 0.05$), and 1.34-fold the apoptotic activity induced by camptothecin ($p < 0.05$) (Fig 5, *top, A*). Similarly,

apoptotic activity was determined in MLE-12 epithelial cells induced with supernatants from LPS-treated RAW 264.7 macrophages for 24 h or with camptothecin for 5 h. In both cases, the apoptotic activity was increased in TEL-pre-treated cultures. The increases were 1.62-fold ($p < 0.005$) in cells induced with supernatants from LPS-treated RAW 264.7 macrophages, and 1.29 fold ($p < 0.005$) in LPS-induced cells (Fig 5, *bottom, B*).

Effects of TEL on the cellular composition of BAL in LPS-nebulized mice

We analyzed the effect of a single intraperitoneal (i.p.) dose of TEL (20 mg/Kg) on the recruitment of cells in lungs after LPS aerosol exposure. As shown in Fig 6, inhalation of LPS elicited a massive accumulation of leukocytes in BAL, and flow cytometry analysis revealed a major contribution of neutrophils among the accumulated cells. TEL pre-treatment (1 h before LPS) induced a significant reduction in both total cell counts and neutrophil counts at 4 h after LPS exposure ($p < 0.05$ in both cases) (Fig 6, *top, A*); macrophage variations were negligible. A similar picture was observed at 24 h after nebulization ($p < 0.005$ in both cases) (Fig 6, *bottom, B*).

Effect of TEL on protein, nitrite and cytokine levels in BAL from mice with LPS-induced acute lung inflammation

An increased protein content in BAL reveals the development of a high-permeability edema that is characteristic of acute airway inflammation.³³

Untreated controls and mice that received TEL, LPS or TEL plus LPS did not differ significantly in protein levels in BAL during the first 4 h after LPS

exposure; however, at 24 h after LPS, there was a dramatic increase in protein concentration, which was reduced by 25% ($p < 0.01$) in TEL pre-treated mice (Fig 7, *top, A*). Similarly, when BAL fluids were collected at 24 h after LPS exposure, the concentration of nitrite (a stable metabolite of the nitric oxide produced by the iNOS) was reduced by 20% ($p < 0.05$) as a consequence of the pre-treatment with TEL (Fig 7, *bottom, B*).

We also measured the levels of two relevant cytokines, MIP-2 and TNF- α , in BAL fluids. The levels of MIP-2 markedly rose at 4 h and dropped at 24 h after LPS exposure; in both cases, pre-treatment with TEL induced significant reductions (38%, $p < 0.05$, and 23%, $p < 0.05$, respectively) (Fig 8, *top, A*). The levels of TNF- α showed a similar kinetic and were reduced by 49% ($p < 0.005$) and 60% ($p < 0.005$) in BAL fluids from TEL-pre-treated mice sacrificed at 4 and 24 h after LPS exposure, respectively (Fig 8, *bottom, B*).

Effect of TEL on cytokine levels in plasma from mice with LPS-induced acute lung inflammation

MIP-2 and TNF- α were also measured in plasma from mice a 4 and 24 h h after LPS aerosol exposure. TEL pre-treatment reduced by 40% ($p < 0.05$) the MIP-2 level at 4 h after LPS challenge, but the effect at 24 h post-LPS did not reach significance (Fig 9, *top, A*). Similarly, TEL reduced by 58% ($p < 0.01$) the TNF- α level at 4 h after LPS exposure (Fig 9, *bottom, B*).

Discussion

We have provided evidence that TEL exerts potent anti-inflammatory effects in experimental in vitro and in vivo models of LPS-induced airways injury. Alveolar macrophages and epithelial cells participate actively in the inflammatory reactions that characterize most of pulmonary diseases. Recreating macrophage-epithelial interaction in vitro provides an useful model of the start of lung inflammation.³⁴⁻³⁵ Although the role of alveolar epithelial cells in the orchestration of airway inflammation has been recently emphasized,^{9,37} our results provide evidence that macrophages respond directly to LPS whereas epithelial cells respond to LPS-induced monokines. A similar sequence has been described by other authors.³⁴ When activated, both macrophages and epithelial cells produce a number of pro-inflammatory mediators, including neutrophil-recruiting chemokines such as MIP-2. In the present study we found that TEL downregulated the production of MIP-2 by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and by monokine-stimulated MLE-12 epithelial cells. TEL also reduced the release of TNF- α by LPS-stimulated macrophages. This result is relevant since TNF- α is considered a pivotal mediator that triggers epithelial cells to produce MIP-2.^{30,34}

The transcription factor NF- κ B plays a crucial role in the inflammatory response, and the activation of NF- κ B was inhibited by TEL in both LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and monokine-stimulated MLE-12 epithelial cells. The activation of NF- κ B results in the expression of genes encoding inflammation mediators such as TNF- α ³⁸ and MIP-2.³⁹ Therefore, our data suggest that TEL

inhibited the production of both molecules through inhibition of NF- κ B DNA binding.

TEL was not an apoptosis inducer, but enhanced apoptosis in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and monokine-stimulated MLE-12 epithelial cells. Following their activation, macrophages and neutrophils undergo apoptosis as a mechanism to limit the ability of these inflammatory cells to damage tissue. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages actively suppresses release of pro-inflammatory mediators and induces an anti-inflammatory state.^{40,41} In consequence, the inflammatory cell apoptosis and the apoptotic cell clearance by macrophages are the major mechanisms for promoting resolution of inflammation.⁴² Our findings suggest that TEL could inhibit the production of TNF- α and MIP-2 not only via NF- κ B inhibition but also through induction of apoptosis. NF- κ B inhibition by TEL was observed as soon as 1 h after cell stimulation with LPS or with supernatants from LPS-stimulated macrophages, and the decrease in TNF- α production by RAW 264.7 macrophages was significant at 6 h after stimulation with LPS. On the other hand, it has been described that inflammatory cells are removed by apoptosis at the end of the inflammatory response.⁴³ It appears, then, likely that TEL acts in the early phase of the inflammatory process by reducing release of inflammatory mediators through NF- κ B inhibition, and in the later phase through enhancement of inflammatory cell apoptosis.

Stimulation of macrophages with LPS promotes apoptosis through both NO-dependent and -independent pathways.^{44,45} Apoptosis in MLE-12 epithelial

cells may be triggered by TNF- α and by nitric-oxide present in supernatants from LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. TEL enhanced apoptosis in both cell types in spite of the fact that the release of inflammatory mediators such as TNF- α was reduced through NF- κ B inhibition. Other agents which possess anti-inflammatory activity and share the capacity to inhibit NF- κ B are also able to promote apoptosis in inflammatory cells.⁴⁶⁻⁴⁹

The in vivo intratracheal administration of LPS has been accepted as a clinically relevant model of severe lung inflammation.³³ Our in vivo findings were consistent with the in vitro data and demonstrated that TEL exerts potent anti-inflammatory effects on the LPS-induced airway inflammation. Aerosol exposure of mice to LPS produced an early wave of the MIP-2 chemokine in BAL at 4 h after LPS exposure. This correlated with a massive recruitment of neutrophils in the airways, which was detectable at 4 h and persisted for 24 h following LPS exposure. Pre-treatment of mice with TEL significantly reduced MIP-2 level and neutrophil influx in BAL. In addition, the LPS-induced wave of TNF- α was also inhibited by TEL. MIP-2 and TNF- α are two cytokines of earliest induction upon LPS challenge in the lung,⁵⁰ and the possible effects of TEL on later inflammatory mediators and on chronic inflammation remain to be determined. In a mouse model of chronic pulmonary mycoplasmosis, macrophages and neutrophils but not lymphocytes were depleted from infiltrates after a 10-day treatment with TEL.⁵¹ Also, in a mouse model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*, TEL was without effect on the proliferation of lymphocytes.⁵²

Mice exposed to LPS presented high protein content in BAL, attesting to the development of pulmonary edema.³³ A significant improvement in lung edema was produced by TEL at 24 h post-LPS challenge. This effect might be related to the inhibition of neutrophil recruitment, because neutrophils are considered as the primary cellular effectors of alveocapillary damage in acute lung injury.⁵³ Moreover, TEL significantly suppressed the local activation of iNOS, as revealed by the decreased levels of nitrite in BAL from TEL-pre-treated mice.

The plasma levels of MIP-2 and TNF- α also rose after LPS nebulization but they were markedly lower than those in BAL. Probably, the systemic levels of both molecules were the consequence of their local production after the lung exposure to LPS. TEL significantly decreased the plasma levels of MIP-2 and TNF- α at 4 h following LPS exposure, but the inhibitory effect of ketolide lost statistical significance when 24 h were passed.

The data presented in this study demonstrate that TEL exerts marked anti-inflammatory effects on LPS-induced airways inflammation. Two mechanisms are proposed: TEL decreases production of pro-inflammatory cytokines and inflammatory mediators from macrophages and epithelial cells by inhibiting NF- κ B, and increases apoptosis in activated macrophages and epithelial cells. Both mechanisms have been described in structurally related macrolides.

Azithromycin reduces the in vitro production of TNF- α through inhibition of NF- κ B DNA binding.⁵⁴ Clarithromycin⁵⁵ and roxithromycin⁵⁶ reduce the in vivo production of TNF- α and other inflammatory mediators. Apoptosis of activated lymphocytes is augmented by roxithromycin,⁵⁷ clarithromycin and

azithromycin,⁵⁸ whereas erythromycin accelerates apoptosis in neutrophils.⁵⁹ In conclusion, TEL is a ketolide antibiotic that shares with macrolides anti-inflammatory properties which add new perspectives regarding the treatment of respiratory infections.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful for financial support from Junta de Andalucía (Research Group CVI201). M. Leiva was recipient of a FPU grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

References

- 1 Noble PW, Jiang D. Matrix regulation of lung injury, inflammation, and repair. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:404-404
- 2 Berg JT, Lee ST, Thepen T, et al. Depletion of alveolar macrophages by liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphate. *J. Appl Physiol.* 1993, 74:2812-2819
- 3 Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 2002; 109:699-705
- 4 Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:411-452
- 5 Haddad IY, Pataki G, Hu P, et al. Quantitation of niytotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 1994; 94:2407-2413
- 6 Palsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Signal transduction by lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 2004; 113:153-162
- 7 Verstak B, Hertzog P, Mansell A. Toll-like receptor signalling and the clinical benefits that lie within. *Inflamm Res* 2007; 56:1-10
- 8 Blackwell TS, Christman JW. The role of Nf-kappaB in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Physiol* 1997; 17:3-9
- 9 Poynter ME, Irvin CG, Janssen-Heininger YMW. A prominent role for airway epithelial NF-κB activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation. *J Immunol* 2003; 170:6257-6265

- 10 Park GY, Christman JW. Nuclear factor kappa B is a promising therapeutic target in inflammatory lung disease. *Curr Drug Targets* 2006; 7:661-668
- 11 Reutershan J, Basit A, Galkina EV et al. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289:L807-L815
- 12 Wolpe SD, Sherry B, Juers D, et al. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:612-616
- 13 Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, et al. Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues. *J Exp Med* 1990; 172:911-919.
- 14 Greenberger MJ, Strieter RM, Kunkel SL, et al. Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine *Klebsiella* pneumonia. *J Infect Dis* 1996; 173:159-165
- 15 Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ et al. Elevated levels of macrophage inflammatory protein 2 in severe murine peritonitis increase neutrophil recruitment and mortality. *Infect Immun* 1997; 65:3847-3851
- 16 Tesfaigzi Y. Roles of apoptosis in airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34:537-547
- 17 Bryskier A. Ketolides – telithromycin, an example of a new class of antibacterial agents. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6:661-669
- 18 Lomks JR, Goldmann DA. Telithromycin: a ketolide antibiotic for treatment of respiratory tract infections. *Clin Infect Dis* 2005; 40:1657-1664
- 19 Nguyen M, Chung EP. Telithromycin: the first ketolide antimicrobial. *Clin Ther* 2005; 27:1144-1163

- 20 Vazifeh D, Preira A, Bryskier A et al. Interactions between HMR 3647, a new ketolide, and human polymorphonuclear neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1944-1951
- 21 Araujo FG, Slifer TL, Remington JS. Inhibition of secretion of interleukin-1 β and tumor necrosis factor alpha by the ketolide antibiotic telithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:3327-3330
- 22 Nakagawa S, Kojio S, Taneike I, et al. Inhibitory action of telithromycin against Shiga toxin and endotoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310:1194-1199
- 23 Lotter K, Höcherl K, Bucher M, et al. *In vivo* efficacy of telithromycin on cytokine and nitric oxide formation in lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation in mice. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:615-612
- 24 Leiva M, Ruiz-Bravo A, Moreno E, et al. The anti-inflammatory activity of telithromycin in a mouse model of septic shock. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29:356-365
- 25 Rios AM, Mejias A, Chavez-Bueno S, et al. Impact of cethromycin (ABT-773) therapy on microbiological, histologic, immunologic, and respiratory indices in a murine model of *Mycoplasma pneumoniae* lower respiratory infection. *Antimicrob Agents Chemoter* 2004; 48:2897-2904
- 26 Fonseca-Aten M, Rios AM, Mejias A, et al. Treatment of experimental chronic pulmonary mycoplasmosis. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28:253-258
- 27 Menge C, Wieler LH, Schlapp T, et al. Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations in vitro. *Infect Immun* 1999; 67:2209–2217

- 28 Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138
- 29 Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, et al. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 9912-9918
- 30 Barrett EG, Johnston C, Oberdorster G et al., Silica-induced chemokine expression in alveolar type II cells is mediated by TNF- α . *Am J Physiol* 1998; 275: L1110-L1119
- 31 Poynter ME, Irvin CG, Janssen-Heininger YMW. Rapid activation of nuclear factor- κ B in airway epithelium in a murine model of allergic airway inflammation. *Am J Pathol* 2002; 160: 1325-1334
- 32 Niinobu T, Fukuo K, Yasuda O, et al. Negative feedback regulation of activated macrophages via Fas-mediated apoptosis. *Am J Physiol* 2000; 279: C504-C509
- 33 Llaudet L., Mabley JG, Pacher P et al. Inosine exerts a broad range of antiinflammatory effects in a murine model of acute lung injury. *Ann. Surg.* 2002; 235: 568-578
- 34 Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, et al. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest* 1990; 86:1945-1953
- 35 Tao F, Kobzik L. Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26:499-505
- 36 Cerri C, Chimenti D, Conti I, et al. Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. *J Immunol* 2006; 177:1975-1980

- 37 Skerrett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, et al. Respiratory epithelial cells regulate lung inflammation in response to inhaled endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287:L143-L152
- 38 Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P. Regulation of tumor necrosis factor- α transcription in macrophages: involvement of four κ B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF- κ B. *Mol Cell Biol* 1990; 10:1498-1506
- 39 Driscoll KE, Hassenbein DG, Howard BW, et al. Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. *J Leukocyte Biol* 1995; 58:359-364
- 40 Fadok VA, Bratton DL, Henson PM. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 2001; 108:957-962
- 41 Tassiulas I, Park-Min KH, Hu Y, et al. Apoptotic cells inhibit LPS-induced cytokine and chemokine production and IFN responses in macrophages. *Human Immunol* 2007; 68:156-164
- 42 Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; 407:784-788
- 43 Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukocyte Biol* 1997; 61:375-380
- 44 Terenzi F, Diaz-Guerra MJ, Casado M, et al. Bacterial lipopeptides induce nitric oxide-independent pathways in rat macrophages. *J Biol Chem* 1995; 270:6017-6021
- 45 Bosca L, Hortelano S. Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell Signaling* 1999; 11:239-244

- 46 Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, et al. NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *J Biol Chem* 1999; 274:4309-4318
- 47 Hortelano S, Castrillo A, Alvarez AM, et al. Contribution of cyclopentenone prostraglandins to the resolution of inflammation through the potentiation of apoptosis in activated macrophages. *J Immunol* 2000; 165:6525-6531
- 48 Fitzpatrick LR, Wang J, Le T. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor-kB, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299:915-920
- 49 Negrotto S, Malaver E, Alvarez ME, et al. Aspirin and salicylate suppress polymorphonuclear apoptosis delay mediated by proinflammatory stimuli. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319:972-979
- 50 Xing Z, Jordana M, Kirpalani H, et al. Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo: endotoxin induces TNF-alpha, MIP-2, IL-1beta, and IL-6 but not RANTES or TGF beta1 mRNA expression in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10:148-153
- 51 Fonseca-Aten M, Rios AM, Mejias A, et al. Treatment of experimental chronic pulmonary mycoplasmosis. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28:253-258
- 52 Yanagihara K, Kuroki M, Higuchi N, et al. Telithromycin inhibits the number of viable bacteria but not lymphocyte accumulation in a murine model of chronic respiratory infection. *Chemotherapy* 2007; 53:10-13
- 53 Heflin AC, Brigham KL. Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. *J Clin Invest* 1981; 68:1253-1260

- 54 Cigana C, Assael BM, Melotti P. Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:975-981
- 55 Hardy RD, Rios AM, Chavez-Bueno S, et al. Antimicrobial and immunologic activities of clarithromycin in a murine model of *Mycoplasma pneumoniae*-induced pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1614-1620
- 56 Urasaki Y, Nori M, Iwata S, et al. Roxithromycin specifically inhibits development of collagen induced arthritis and production of proinflammatory cytokines by human T cells and macrophages. *J Rheumatol* 2005; 32:1765-1774
- 57 Ogawa N, Sugawara Y, Fujiwara Y, et al. Roxithromycin promotes lymphocyte apoptosis in Dermatophagoides-sensitive asthma patients. *Eur J Pharmacol* 2003; 474:273-281
- 58 Kadota JI, Mizunoe S, Kishi K, et al. Antibiotic-induced apoptosis in human activated peripheral lymphocytes. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25:216-220
- 59 Aoshiba K, Nagai A, Konno K. Erythromycin shortens neutrophil survival by accelerating apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:872-877

Figure legends

FIGURE 1. Inhibitory effect of TEL on an *in vitro* model of airway inflammation.

Top, A: MIP-2 production by unstimulated (solid bars) and LPS-stimulated (open bars) RAW 264.7 cells. *Bottom, B:* MIP-2 production by MLE-12 cells incubated with supernatants from unstimulated RAW 264.7 cultures (open bars) or from LPS-stimulated RAW 264.7 cultures (solid bars). MIP-2 concentrations present in RAW 264.7 supernatants were subtracted from MIP-2 levels in MLE-12 cultures. Cells were stimulated with LPS for 24 h and TEL was added 1 h before stimulation. Results are the means of data from three cultures. Lines represent the standard deviation of the means. TEL-containing cultures were compared with the respective TEL-free culture by Student's t test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.005$.

FIGURE 2. Inhibition by TEL of TNF- α production by unstimulated (solid bars) and LPS-stimulated (open bars) RAW 264.7 cells. *Top, A:* Cells were treated with LPS for 6 h. *Bottom, B:* Cells were treated with LPS for 24 h. In all cases, TEL was added 1 h before stimulation. Results are the means of data from three cultures. Lines represent the standard deviation of the means. TEL-containing cultures were compared with the respective TEL-free culture by Student's t test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.005$.

FIGURE 3. Inhibitory effect of TEL on NF- κ B DNA binding activity as measured by ELISA in nuclear extracts from RAW 264.7 and MLE-12 cells. DNA binding of NF- κ B (p65) was examined in nuclear extracts by a commercial

immunoassay as described in Material and Methods. *Top, A:* NF- κ B activation in unstimulated (solid bars) and LPS-stimulated (open bars) RAW 264.7 cells. *Bottom, B:* NF- κ B activation in MLE-12 cells incubated with supernatants from unstimulated RAW 264.7 cultures (open bars) or from LPS-stimulated RAW 264.7 cultures (solid bars). Results are the means of data from three cultures. Lines represent the standard deviation of the means. TEL-containing cultures were compared with the respective TEL-free culture by Student's t test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.005$.

FIGURE 4. Inhibitory effect of TEL on the activation of NF- κ B in RAW 264.7 and MLE-12 cells transiently transfected with a NF- κ B luciferase reporter construct. *Top, A:* NF- κ B activation in unstimulated (solid bars) and LPS-stimulated (open bars) RAW 264.7 cells. *Bottom, B:* NF- κ B activation in MLE-12 cells incubated with supernatants from unstimulated RAW 264.7 cultures (open bars) or from LPS-stimulated RAW 264.7 cultures (solid bars). Results are the means of data from three cultures. Lines represent the standard deviation of the means. TEL-containing cultures were compared with the respective TEL-free culture by Student's t test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.005$.

FIGURE 5. Effect of TEL on apoptosis in an *in vitro* model of airway inflammation. Mono- and oligonucleosomes generated during the apoptotic fragmentation of cellular DNA were quantified by a commercial immunoassay as described in Material and Methods. *Top, A:* LPS- and camptothecin-induced apoptosis in RAW 264.7 cells incubated without (solid bars) or with TEL (10 μ g/ml) (open bars). *Bottom, B:* Apoptosis induced by camptothecin and supernatants from

LPS-stimulated RAW 264.7 cells in MLE-12 cells incubated without (solid bars) or with TEL (10 $\mu\text{g/ml}$) (open bars). Cells were induced with LPS or supernatants from RAW 264.7 cultures for 24 h, or with camptothecin for 5 h, and TEL was added 1 h before induction. Results are the means of data from three cultures. Lines represent the standard deviation of the means. TEL-containing cultures were compared with the respective TEL-free culture by Student's t test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$.

FIGURE 6. Effect of TEL on the cellular composition of BAL in an *in vivo* model of LPS-induced acute lung injury. *Top, A*: BAL fluids were collected at 4 h after inhalation of LPS. *Bottom, B*: BAL fluids were collected at 24 h after inhalation of LPS. Untreated controls (open bars) and TEL-treated mice (dotted bars) were exposed to an aerosol of PBS alone; nebulizer concentration for mice treated with LPS alone (hatched bars) and with TEL and LPS (solid bars) was 500 $\mu\text{g/ml}$. TEL pre-treatment (20 mg/Kg) was given by i.p. route 1 h before nebulization. Absolute number of macrophages and neutrophils were obtained as the product of flow cytometry percentage and hemacytometer total leukocyte counts. Results are the means of data from eight animals. Lines represent the standard deviation of the means. TEL-pre-treated groups were compared with the respective TEL-free groups by Student's t test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$.

FIGURE 7. Effect of TEL on BAL fluid concentrations of proteins (*Top, A*) and nitrite (*Bottom, B*) in an *in vivo* model of LPS-induced acute lung injury. Untreated controls (open bars) and TEL-treated mice (dotted bars) were exposed to an aerosol of PBS alone; nebulizer concentration for mice treated

with LPS alone (hatched bars) and with TEL and LPS (solid bars) was 500 $\mu\text{g/ml}$. TEL pre-treatment (20 mg/Kg) was given by i.p. route 1 h before nebulization. Results are the means of data from four animals. Lines represent the standard deviation of the means. TEL-pre-treated groups were compared with the respective TEL-free groups by Student's t test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

FIGURE 8. Effect of TEL on BAL fluid concentrations of MIP-2 (*Top, A*) and TNF- α (*Bottom, B*) in an *in vivo* model of LPS-induced acute lung injury. Untreated controls (open bars) and TEL-treated mice (dotted bars) were exposed to an aerosol of PBS alone; nebulizer concentration for mice treated with LPS alone (hatched bars) and with TEL and LPS (solid bars) was 500 $\mu\text{g/ml}$. TEL pre-treatment (20 mg/Kg) was given by i.p. route 1 h before nebulization. Results are the means of data from four animals. Lines represent the standard deviation of the means. TEL-pre-treated groups were compared with the respective TEL-free groups by Student's t test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$.

FIGURE 9. Effect of TEL on plasma concentrations of MIP-2 (*Top, A*) and TNF- α (*Bottom, B*) in an *in vivo* model of LPS-induced acute lung injury. Untreated controls (open bars) and TEL-treated mice (dotted bars) were exposed to an aerosol of PBS alone; nebulizer concentration for mice treated with LPS alone (hatched bars) and with TEL and LPS (solid bars) was 500 $\mu\text{g/ml}$. TEL pre-treatment (20 mg/Kg) was given by i.p. route 1 h before nebulization. Results are the means of data from four animals. Lines represent the standard deviation of

the means. TEL-pre-treated groups were compared with the respective TEL-free groups by Student's t test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

Fig. 1

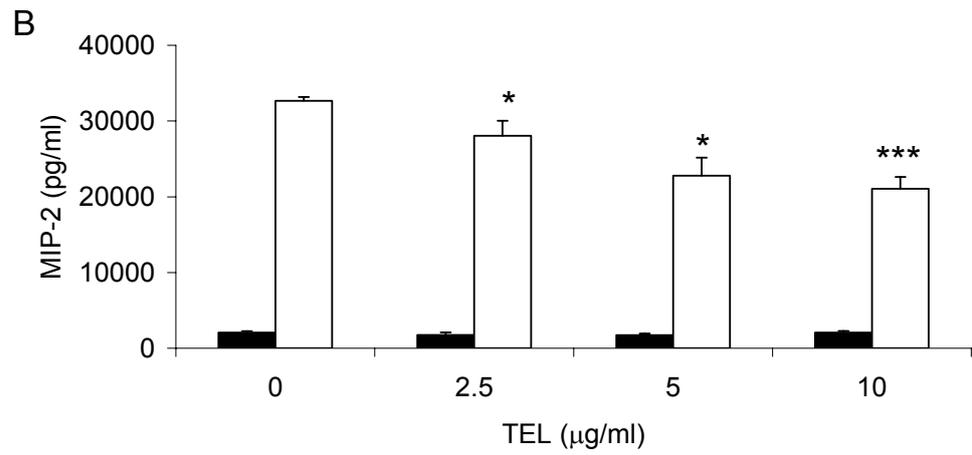
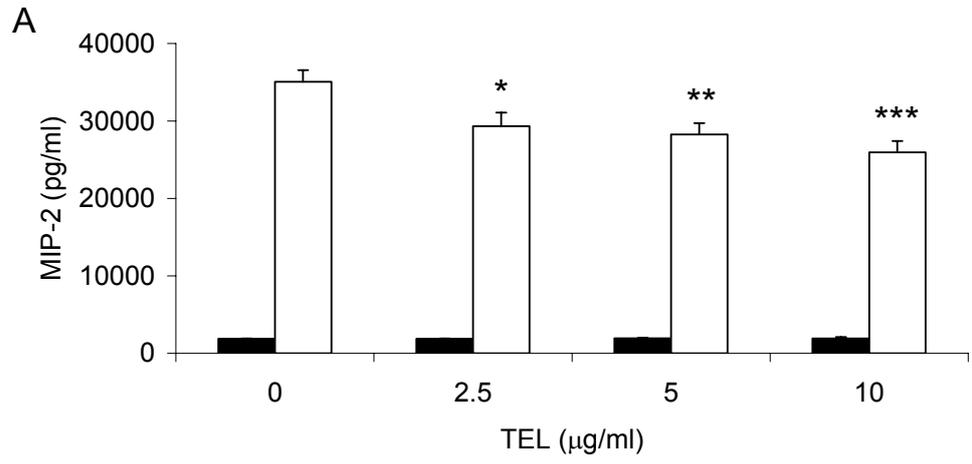


Fig. 2

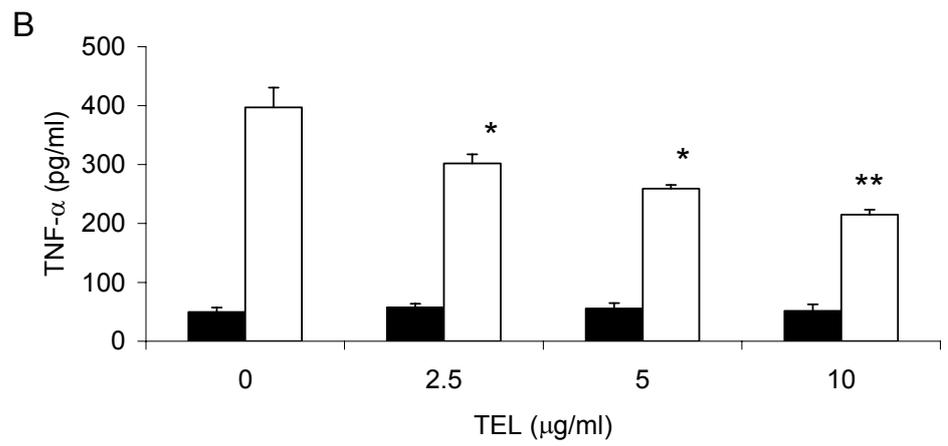
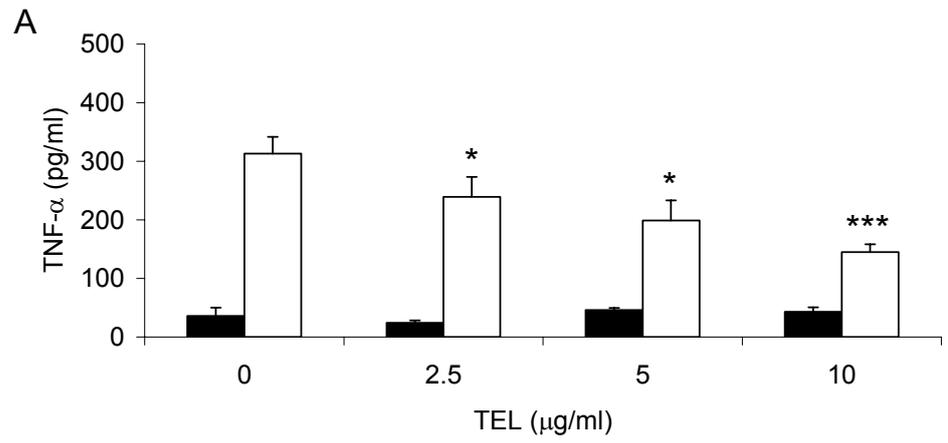


Fig. 3

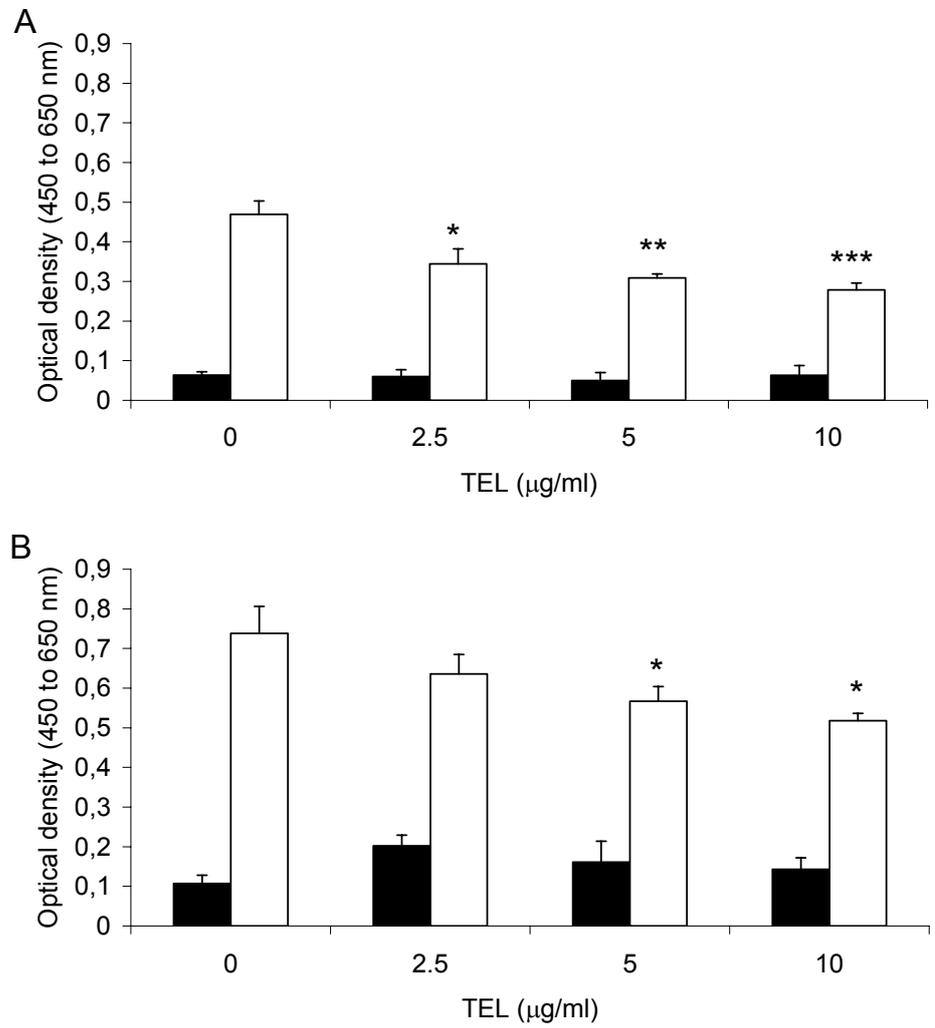


Fig. 4

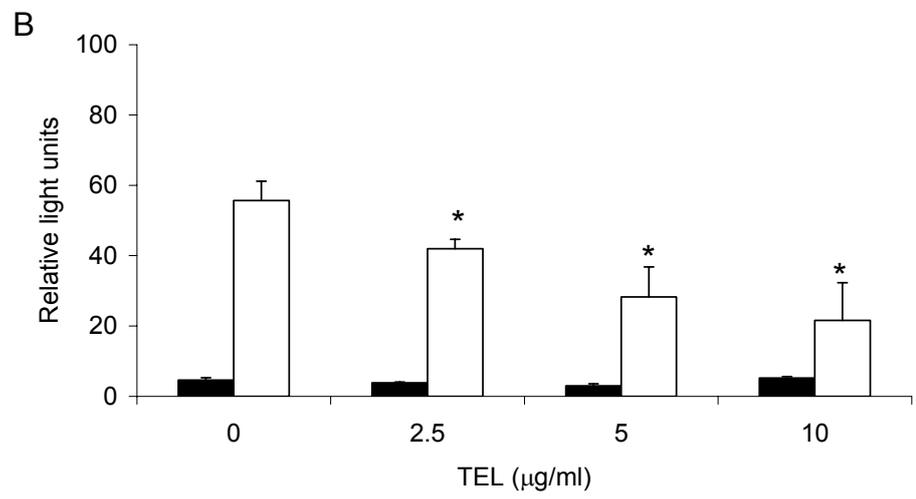
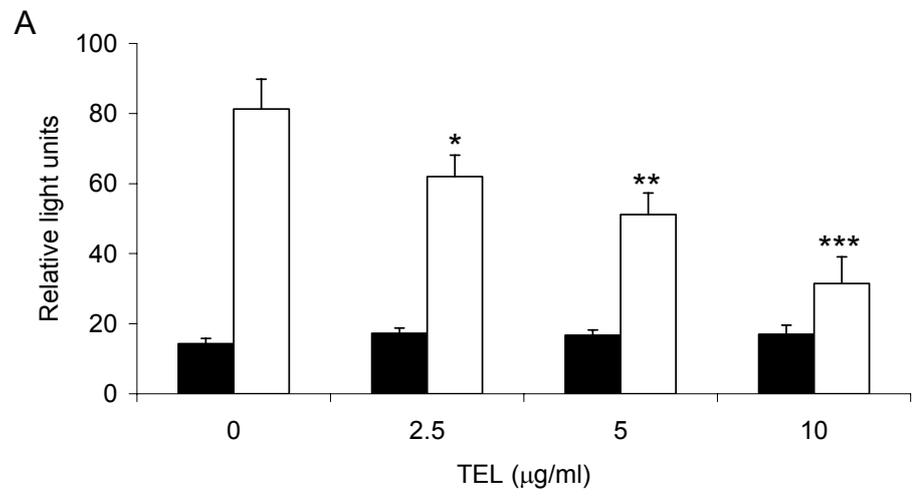


Fig. 5

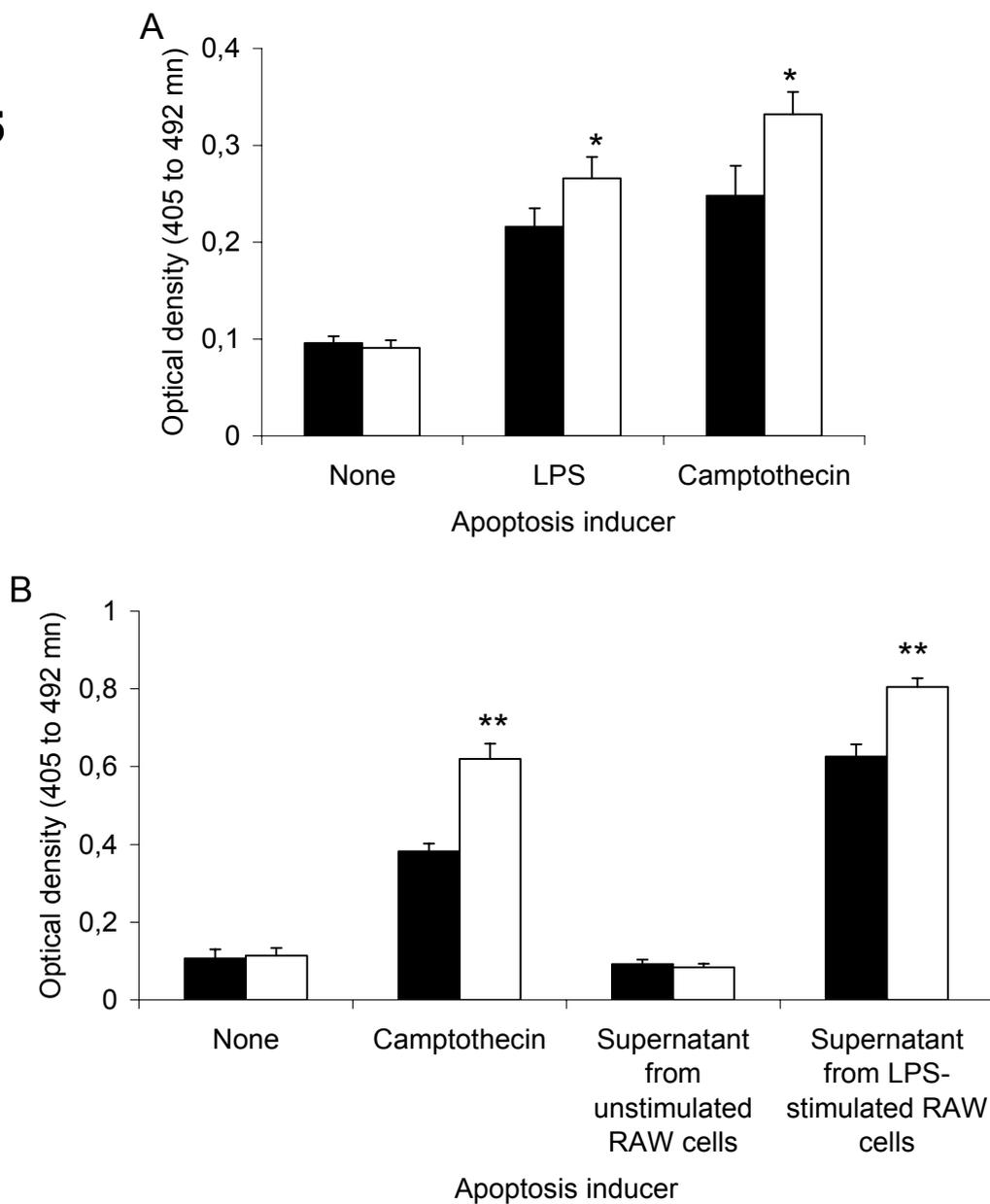


Fig. 6

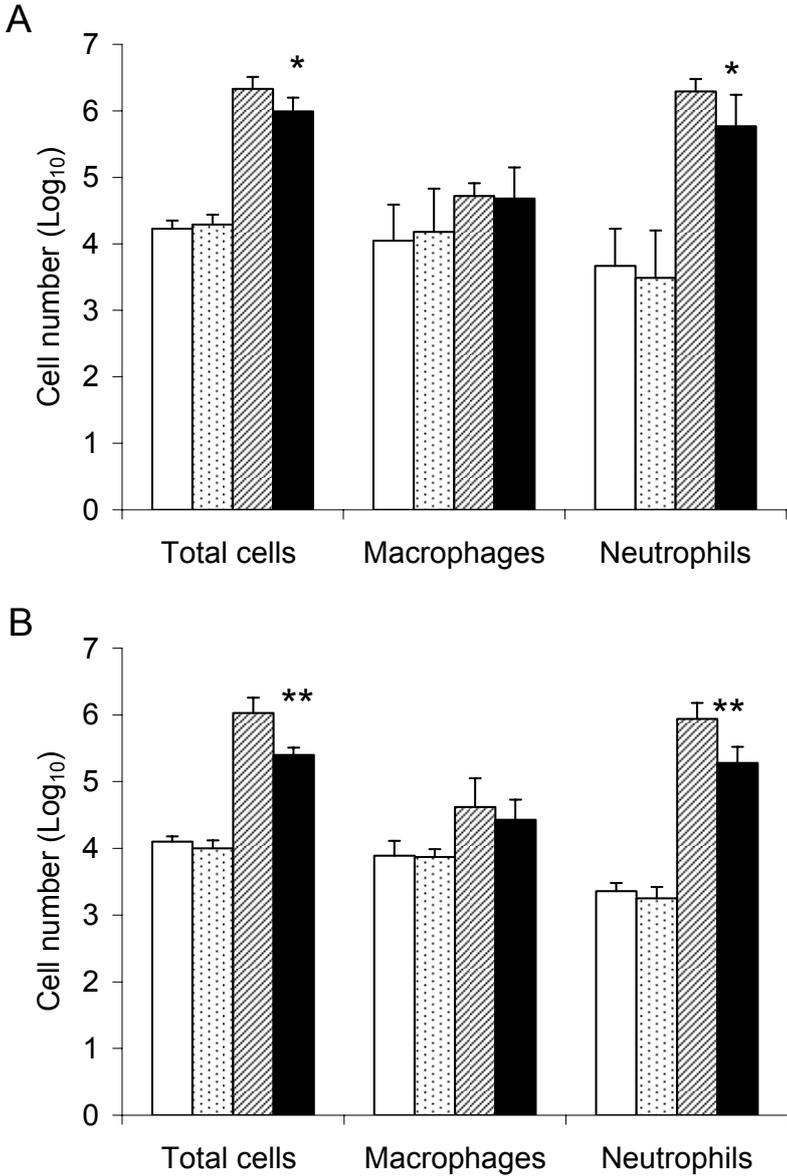


Fig. 7

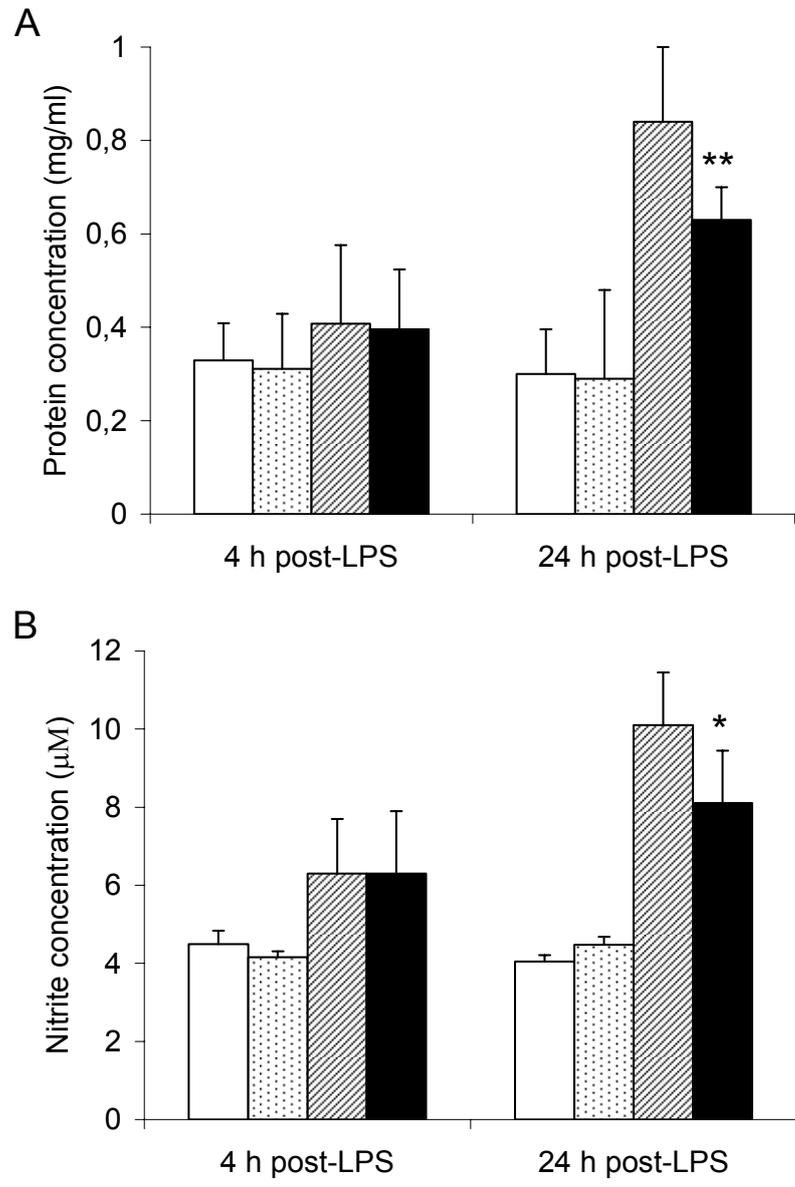


Fig. 8

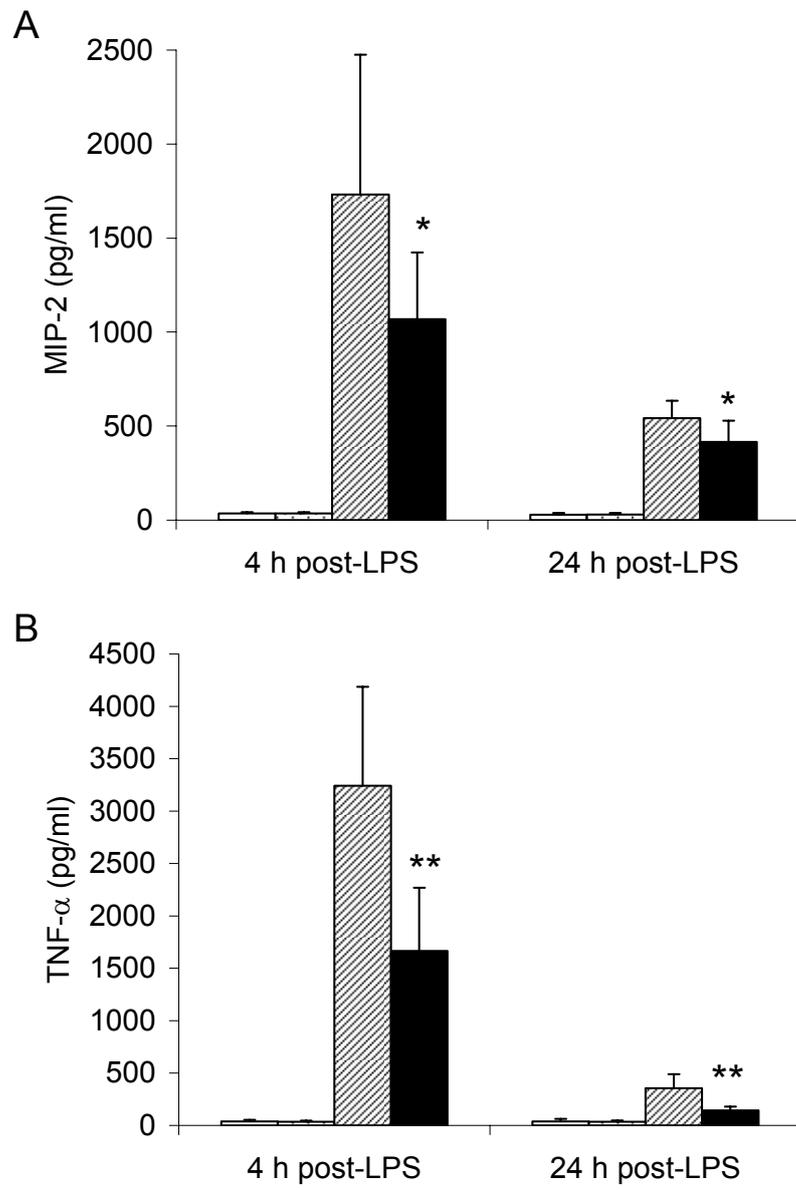
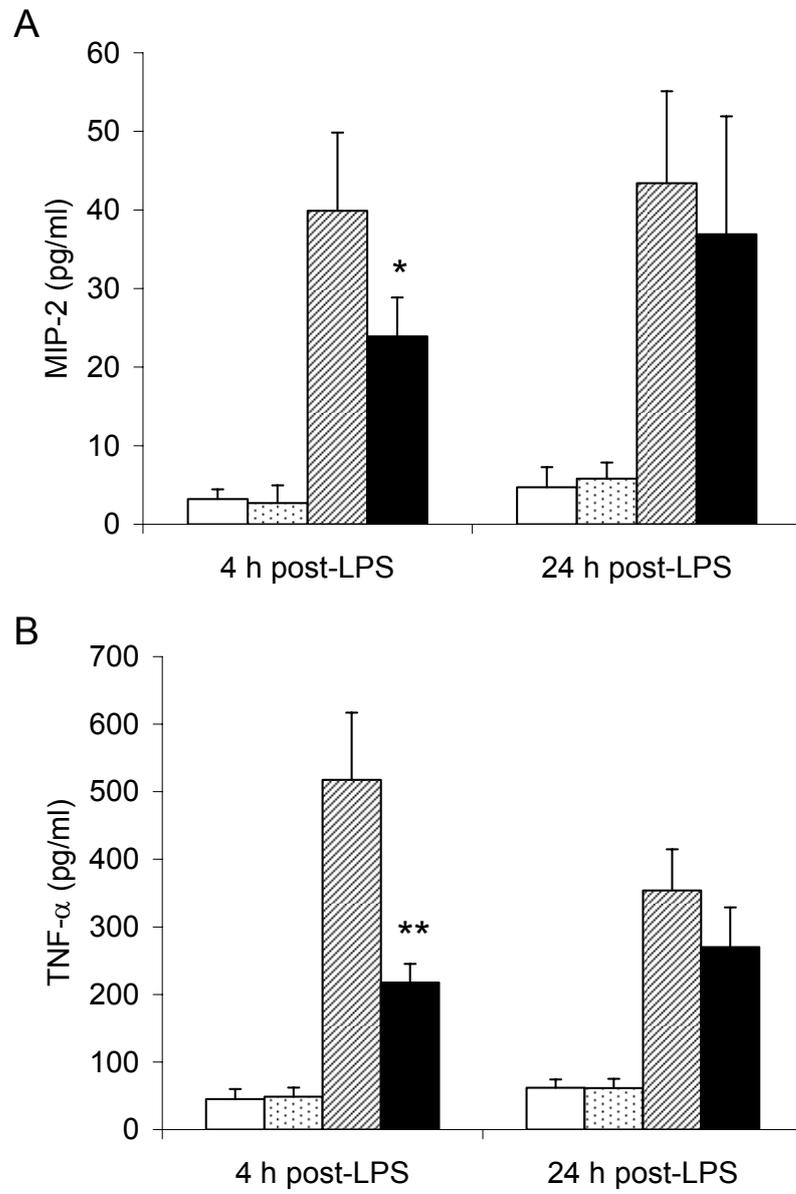


Fig. 9



CONCLUSIONS

1. Telithromycin was able to modify the in vitro response of murine spleen cells to Lipopolysaccharide (LPS) and concanavalin A (ConA). Mitogen-induced proliferation of both B- and T-cells was moderately enhanced. The ConA-induced production of IFN- γ was suppressed, whereas the LPS-induced production of IL-10 was augmented.

2. Telithromycin was not an apoptosis inducer but increased apoptosis induced by camptothecin in mitogen-activated spleen cells.

3. Macrophages have proven to be a target for immunomodulatory activity of telithromycin. The ketolide inhibited the production of TNF- α through inhibition of NF- κ B DNA binding.

4. Telithromycin protected BALB/c mice from lethal septic shock induced with LPS. This protection was related to the reduction of plasma levels of inflammatory mediators (pro-inflammatory cytokines and nitric oxide) and the increase of an anti-inflammatory cytokine (IL-10).

5. In an in vitro model which recreated the macrophage-epithelial cells interaction operating in pulmonary acute inflammation, telithromycin exerted anti-inflammatory effects at three levels: (1) MIP-2 production by LPS-induced macrophages; (2) TNF- α production by LPS-induced macrophages (this monokine plays a major role in mediating the chemokine response of airway epithelial cells); and (3) MIP-2 production by alveolar epithelial cells stimulated with monokines from LPS-induced macrophages.

6. Telithromycin exerted potent anti-inflammatory effects in LPS-induced in vivo airways injury. We propose that telithromycin acts in the early phase of inflammation by reducing release of inflammatory mediators through NF- κ B

inhibition, and in the later phase through enhancement of inflammatory cell apoptosis.

7. In an in vivo model of LPS-induced pulmonary acute inflammation, telithromycin exerted potent anti-inflammatory effects: (1) neutrophil recruitment was inhibited; (2) inflammatory mediators in bronchoalveolar lavage fluid were reduced.

8. The final conclusion of this work is that the anti-inflammatory activity is an important component of the therapeutic effect of telithromycin.