

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología



Inmunomodulación por agentes  
antimicrobianos en modelos  
experimentales de inmunocompromiso.

*M<sup>a</sup> Angeles Amat Hernández*

*Memoria de Tesis*

*Granada 2005*

Universidad de Granada  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Microbiología

Memoria de Tesis presentada por M<sup>a</sup> Angeles  
Amat Hernández para aspirar al grado de  
Doctora en Farmacia en la Universidad de  
Granada.

Fdo. M<sup>a</sup> Angeles Amat Hernández.

*Directores:*

Fdo. **Dr. D. Alfonso Ruiz-Bravo López**  
Catedrático del Departamento de  
Microbiología de la Facultad de Farmacia  
de la Universidad de Granada.

Fdo. **Dra. Dña. Encarnación Moreno Calvo**  
Profesora Titular del departamento de  
Microbiología de la Facultad de Farmacia  
de la Universidad de Granada.

Fdo. **Dra. Dña. Maria Jiménez-Valera**  
Profesora Titular del Departamento de  
Microbiología de la Facultad de Farmacia  
de la Universidad de Granada.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>7</b>
<b>1.1. INMUNOMODULACIÓN: CONCEPTOS Y MECANISMOS.</b>	<b>9</b>
<b>1.1.1. EL SISTEMA INMUNE Y LOS AGENTES QUE ACTÚAN SOBRE ÉL.</b>	<b>9</b>
1.1.1.1. Sinopsis del sistema inmune.	9
1.1.1.2. Agentes que inducen reacciones inmunitarias.	13
<b>1.1.2. MODIFICACIÓN NO ESPECÍFICA DE LOS MECANISMOS INMUNITARIOS.</b>	<b>16</b>
1.1.2.1. Inmunosupresión.	16
1.1.2.1.1. Inmunosupresión por agentes físicos.	16
1.1.2.1.2. Inmunosupresión por anticuerpos.	18
1.1.2.1.3. Inmunosupresión por agentes químicos.	19
1.1.2.2. Inmunopotenciación.	26
1.1.2.2.1. BRM endógenos.	26
1.1.2.2.2. BRM exógenos.	36
<b>1.2. INMUNOMODULACIÓN POR AGENTES ANTIMICROBIANOS.</b>	<b>41</b>
<b>1.2.1. MECANISMOS DE INMUNOMODULACIÓN POR AGENTES ANTIMICROBIANOS.</b>	<b>42</b>
<b>1.2.2. EFECTOS DE DISTINTOS GRUPOS DE AGENTES ANTIBACTERIANOS SOBRE EL SISTEMA INMUNE.</b>	<b>43</b>
1.2.2.1. Agentes $\beta$ -lactámicos.	43
1.2.2.2. Aminoglicósidos.	49
1.2.2.3. Macrólidos.	50
1.2.2.4. Tetraciclinas.	55
1.2.2.5. Fluoroquinolonas.	57
<b>1.2.3. EFECTOS DE DISTINTOS GRUPOS DE ANTIFÚNGICOS SOBRE EL SISTEMA INMUNE.</b>	<b>61</b>
1.2.3.1. Derivados imidazólicos.	62
1.2.3.2. Alaninas.	64
1.2.3.3. Pirimidinas fluoradas.	65
1.2.3.4. Antibióticos.	65
1.2.3.4.1. Antibióticos poliénicos.	65
1.2.3.4.2. Antibióticos no poliénicos.	69
1.2.3.5. Equinocardinas.	70
<b>1.2.4. EFECTOS DE LOS DISTINTOS GRUPOS DE AGENTES ANTIVIRALES SOBRE EL SISTEMA INMUNE.</b>	<b>71</b>
1.2.4.1. Inhibidores de la descapsidación.	71
1.2.4.2. Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos.	73
1.2.4.2.1. Análogos de nucleósidos.	73
1.2.4.2.2. Análogos de pirofosfato.	75
<b>1.2.4.3. INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA.</b>	<b>76</b>
1.2.4.3.1. Inhibidores nucleosídicos.	76
1.2.4.3.2. Inhibidores no nucleosídicos.	77
<b>1.2.4.4. INHIBIDORES DE LA MADURACIÓN DE PROTEÍNAS.</b>	<b>78</b>

<b>1.3. ENFERMOS INMUNOCOMPROMETIDOS: INFECCIONES Y TRATAMIENTO.</b>	<b>80</b>
<b>1.3.1. SITUACIONES CLÍNICAS DE INMUNOCOMPROMISO.</b>	<b>80</b>
1.3.1.1. Inmunodeficiencias primarias.	80
1.3.1.2. Autotransplante de células madre hematopoyéticas.	88
1.3.1.3. Aloinjertos.	89
1.3.1.4. Reacción de injerto contra huésped.	89
1.3.1.5. Cáncer.	90
1.3.1.6. Infecciones como causa de inmunosupresión.	91
<b>1.3.2. INFECCIONES EN INDIVIDUOS INMUNOCOMPROMETIDOS.</b>	<b>93</b>
1.3.2.1. Destrucción de las barreras físicas que limitan el medio interno.	93
1.3.2.2. Déficits en el complemento.	93
1.3.2.3. Defectos en la fagocitosis.	93
1.3.2.4. Deficiencias de células B.	94
1.3.2.5. Deficiencias de células T.	95
1.3.2.6. Deficiencias combinadas.	95
<b>1.3.3. AGENTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN INDIVIDUOS NEUTROPÉNICOS.</b>	<b>96</b>
1.3.3.1. Monoterapia.	96
1.3.3.2. Asociaciones de agentes antimicrobianos.	97
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>101</b>
<hr/>	
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>105</b>
<hr/>	
<b>3.1. ANIMALES.</b>	<b>107</b>
<b>3.2. ESTUDIOS <i>EX VIVO</i>.</b>	<b>107</b>
<b>3.2.1. DISEÑOS EXPERIMENTALES.</b>	<b>107</b>
<b>3.2.2. TRATAMIENTOS INMUNOSUPRESORES.</b>	<b>108</b>
3.2.2.1. Tratamiento con ciclofosfamida.	108
3.2.2.2. Tratamiento con azatioprina.	109
3.2.2.3. Tratamiento con tacrolimus.	109
<b>3.2.3. TRATAMIENTOS CON AGENTES ANTIMICROBIANOS.</b>	<b>109</b>
3.2.3.1. Ceftriaxona.	109
3.2.3.2. Moxifloxacino.	110
3.2.3.3. Anfotericina B.	110
3.2.3.4. Aciclovir.	111
<b>3.3. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>.</b>	<b>111</b>
<b>3.4. RECUENTO DE LEUCOCITOS PERIFÉRICOS.</b>	<b>112</b>
<b>3.5. RECUENTO DE ESPLENOCITOS.</b>	<b>112</b>
<b>3.6. RECUENTO DE CÉLULAS NUCLEADAS EN MÉDULA ÓSEA.</b>	<b>113</b>
<b>3.7. LINFOPROLIFERACIÓN EN RESPUESTA A MITÓGENOS.</b>	<b>114</b>

3.7.1. MEDIO DE CULTIVO.	114
3.7.2. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES DE ESPLENOCITOS.	114
3.7.3. RECUENTO DE CÉLULAS VIABLES Y AJUSTE DE LAS SUSPENSIONES.	114
3.7.4. CULTIVO DE ESPLENOCITOS.	115
3.7.5. MEDIDA DE LA LINFOPROLIFERACIÓN.	116
3.8. CULTIVO DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA.	116
3.8.1. OBTENCIÓN DE FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS/MACRÓFAGOS (GM-CSF).	116
3.8.2. OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA.	117
3.8.3. CONDICIONES DEL CULTIVO DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA.	117
3.8.4. LECTURA.	118
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	118
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>120</b>
4.1. MODELO DE INMUNOSUPRESION CON CICLOFOSFAMIDA.	122
4.1.1. CARACTERÍSTICAS DEL MODELO.	122
4.1.2. INMUNOMODULACIÓN POR CEFTRIAXONA.	126
4.1.3. INMUNOMODULACIÓN POR MOXIFLOXACINO.	129
4.1.4. INMUNOMODULACIÓN POR ANFOTERICINA B.	131
4.1.5. INMUNOMODULACIÓN POR ACICLOVIR.	133
4.2. MODELO DE INMUNOSUPRESIÓN CON AZATIOPRINA.	136
4.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL MODELO.	136
4.2.2. INMUNOMODULACIÓN POR CEFTRIAXONA.	139
4.2.3. INMUNOMODULACIÓN POR MOXIFLOXACINO.	141
4.2.4. INMUNOMODULACIÓN POR ANFOTERICINA B.	142
4.2.5. INMUNOMODULACIÓN POR ACICLOVIR.	144
4.3. MODELOS DE INMUNOSUPRESIÓN CON TACROLIMUS.	146
4.3.1. CARACTERÍSTICAS DEL MODELO EX VIVO.	146
4.3.2. CARACTERÍSTICAS DEL MODELO IN VITRO.	150
4.3.3. EFECTOS DE LAS COMBINACIONES DE TACROLIMUS Y ANTIMICROBIANOS IN VITRO.	151

<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>155</b>
<b>5.1. MODELOS DE INMUNOSUPRESION ESTUDIADOS.</b>	<b>157</b>
5.1.1. INMUNOSUPRESIÓN POR CICLOFOSFAMIDA.	157
5.1.2. INMUNOSUPRESIÓN POR AZATIOPRINA.	163
5.1.3. INMUNOSUPRESIÓN POR TACROLIMUS.	164
5.1.4. COMPARACIÓN DE LOS TRES MODELOS.	166
<b>5.2. INMUNOMODULACION POR LOS ANTIMICROBIANOS INVESTIGADOS.</b>	<b>166</b>
5.2.1. INMUNOMODULACIÓN POR CEFTRIAXONA.	166
5.2.2. INMUNOMODULACIÓN POR MOXIFLOXACINO.	167
5.2.3. INMUNOMODULACIÓN POR ANFOTERICINA B.	171
5.2.4. INMUNOMODULACIÓN POR ACICLOVIR.	172
<b>5.3. CONSIDERACIONES FINALES.</b>	<b>173</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>175</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>179</b>
<b>8. GLOSARIO.</b>	<b>222</b>

## 1. INTRODUCCIÓN.





## 1.1. INMUNOMODULACIÓN: CONCEPTOS Y MECANISMOS.

### 1.1.1. El sistema inmune y los agentes que actúan sobre él.

#### 1.1.1.1. Sinopsis del sistema inmune.

El sistema inmune comprende una red de células y moléculas (anticuerpos y citocinas), que interactúan entre sí, y que expresan dos niveles de reconocimiento de estructuras moleculares: en el primer nivel están los mecanismos pertenecientes a la inmunidad llamada no específica o innata que se basan en la capacidad para discriminar entre estructuras propias del organismo y estructuras extrañas o propias alteradas; y un segundo nivel donde están los mecanismos pertenecientes a la inmunidad específica que son capaces de reconocer individualmente estructuras específicas, llamadas determinantes antigénicos o epítopos, independientemente de su procedencia propia o extraña. Ambos tipos de

inmunidad incluyen mecanismos moleculares (clásicamente llamados “humorales”) y otros protagonizados por células.

*Inmunidad innata o no específica:* Entre los mecanismos moleculares de la inmunidad no específica figuran los sistemas de kininas y del complemento, que se activan en presencia de superficies extrañas denominadas “activantes” [Ruiz-Bravo, 1997]. La activación supone la aparición en las moléculas de actividades enzimáticas que, en última instancia, desencadenan diversos efectos protectores, fundamentalmente la inducción de reacciones inflamatorias, con la correspondiente focalización de defensas celulares y humorales en el tejido donde haya aparecido la superficie activante; pero también otros efectos, como la destrucción de microorganismos susceptibles al “complejo de ataque a membrana” constituido por las fracciones finales del complemento. El mecanismo celular no específico principal es, sin duda, la fagocitosis de partículas extrañas, que corre a cargo de células especializadas: macrófagos y neutrófilos. Los fagocitos forman parte del componente celular de los procesos inflamatorios. Su capacidad para reconocer estructuras superficiales de microorganismos patógenos se debe a la existencia de receptores que reconocen motivos moleculares conservados a través de los cambios adaptativos promovidos por las mutaciones microbianas. Estos motivos han sido denominados PAMPs (“**p**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns”) [Janeway y Medzhitov, 1998], y se sitúan en mananos y manoproteínas de la pared de levaduras, y componentes de la pared bacteriana como el lipopolisacárido de las bacterias Gram-negativas (LPS), lipoproteínas, peptidoglicano, ácidos lipoteicoicos de bacterias Gram-positivas, lipoarabinomananos de micobacterias, etc., así como subproductos del metabolismo procariota como los oligopéptidos con N-formil-metionina [Aderem y Ulevitch, 2000]. Los receptores que reconocen PAMPs se denominan PRRs (siglas de “**p**attern **r**ecognition **r**eceptors”) y

pueden ser solubles (determinadas proteínas plasmáticas) o estar en la superficie de células implicadas en la inmunidad, como los macrófagos.

*Inmunidad específica:* Los linfocitos son las células responsables de la inmunidad específica [Ruiz-Bravo y Sánchez-Pérez, 1997]. Estas células poseen en su superficie receptores que reconocen epítopos específicamente. Cada linfocito posee receptores que reconocen una sola especificidad. Los linfocitos están organizados en clones, derivados de una célula ancestral común; cada clon está constituido por células que poseen el mismo receptor y que, por tanto, reconocen el mismo epítipo. Los antígenos son sustancias que poseen epítopos y que reúnen las condiciones necesarias (tamaño suficiente, biodegradabilidad) para inducir la activación de los linfocitos, iniciando así una respuesta inmune. Los linfocitos B, que en los mamíferos proceden de la médula hematopoyética, responden ante el estímulo antigénico transformándose en células productoras de anticuerpos. Los linfocitos T, cuya maduración ocurre en el timo, se organizan en varias subpoblaciones: células  $T_H1$ , implicadas en reacciones inflamatorias y en la activación de macrófagos; células  $T_H2$ , cuya cooperación es necesaria, en la mayoría de los casos, para que las células B respondan frente a los antígenos que reconocen; células T citotóxicas o CTL (de “cytotoxic T lymphocytes”), que destruyen a las células portadoras de antígenos. Unos complicados mecanismos de control impiden que el sistema inmune protagonice respuestas autodestructivas, para lo cual los linfocitos que reconocen antígenos propios son eliminados antes de alcanzar la madurez, o permanecen inhibidos por procesos de tolerancia. Los fallos que pueden ocurrir en estos mecanismos de control son causa de enfermedades autoinmunes.

*Conexiones entre mecanismos no específicos y específicos:* Los mecanismos defensivos descritos actúan coordinadamente; las células implicadas se comunican mediante citokinas, y el sistema inmune funciona

como un todo integrado. Así, la unión de ciertos anticuerpos, pertenecientes a las clases IgM o IgG, con sus antígenos es una de las causas de activación de un sistema no específico, como es el complemento. Cuando los anticuerpos de clase IgG se unen a antígenos situados en la superficie de partículas, facilitan la fagocitosis de las mismas por los macrófagos. Los macrófagos y otras células no específicas son capaces de capturar antígenos, digerirlos parcialmente y presentar determinadas secuencias (oligopéptidos), en forma inmunogénica, a las células T (que, a diferencia de las B, no reconocen epítomos en la superficie de antígenos nativos libres, sino fragmentos de antígenos asociados a moléculas llamadas de histocompatibilidad, presentes en la superficie de células auxiliares). Algunas citocinas producidas por linfocitos T (principalmente, el interferón gamma o IFN- $\gamma$ ) inducen en los macrófagos un estado de activación, que los hace sensiblemente más eficaces en la fagocitosis y muerte intracelular de microorganismos, además de conferirles actividad citotóxica. También las citocinas producidas por células no específicas, como la IL-1 secretada por macrófagos, favorecen las respuestas de células específicas, como los linfocitos T. Como puede verse, las interacciones entre mecanismos no específicos y mecanismos específicos son numerosas. Sin embargo, existe un orden de respuestas defensivas frente a los agentes extraños, por ejemplo microorganismos, que puedan penetrar en el medio interno: si no ha habido contactos previos con los antígenos de ese agente (y, por tanto, el sistema inmune no ha podido generar "células memoria" específicas), actuarán en primer lugar los mecanismos no específicos, que por ser constitutivos actúan de forma inmediata; posteriormente, los linfocitos reconocerán los antígenos extraños y elaborarán sus respuestas específicas, que requieren más tiempo (las células deben proliferar y diferenciarse en células efectoras), pero son más eficaces en la neutralización y eliminación de los agentes extraños. Una presentación didáctica de todos estos hechos y conceptos se puede encontrar en Janeway *et al.* [2003].

#### 1.1.1.2. Agentes que inducen reacciones inmunitarias.

**Superficies activantes:** De todo lo expuesto anteriormente, se deduce que las partículas y macromoléculas poseedoras de superficies que, por sus características fisicoquímicas (nacidas de una composición química muy diferente de las superficies propias), son reconocidas como extrañas por los mecanismos de la inmunidad no específica, serán capaces de activar estos mecanismos. Esto ocurre con las estructuras superficiales polianiónicas de numerosos microorganismos: cápsulas bacterianas, membrana externa de bacterias Gram-negativas, envolturas de algunos viriones, pared celular de levaduras... [Ruiz-Bravo, 1997]. Estas estructuras son, pues, responsables de reacciones inespecíficas, como las respuestas inflamatorias y la fagocitosis.

**PAMPs:** Anteriormente se ha introducido este concepto y se han mencionado algunos de los PAMPs compartidos por grandes grupos microbianos. El reconocimiento de PAMPs por sus correspondientes PRRs induce reacciones defensivas, generalmente de tipo inflamatorio. Existen PRRs en la superficie de las células que participan en procesos de inflamación y fagocitosis, y su unión a PAMPs determina la activación de mecanismos intracelulares de transducción de señales que, finalmente, tienen como resultado la producción de citokinas proinflamatorias y de moléculas y radicales antimicrobianos. Ejemplos de PRRs son los TLRs (siglas de "Toll-like receptors"), así denominados por su relación filogenética con las proteínas Toll de *Drosophila*, implicadas en la resistencia a infecciones de la mosca del vinagre [Janeway y Medzhitov, 2002; Takeda *et al.*, 2003].

**Antígenos:** Por otra parte, los antígenos extraños inducen respuestas específicas, ya sea de producción de anticuerpos o de inmunidad celular (debida a células T). En una respuesta inmune específica, solo intervienen aquellos clones de linfocitos que posean receptores específicos para los

epítomos presentes en el antígeno. Estos receptores específicos son estructuras moleculares complejas, cuya parte específica está constituida, en las células B, por inmunoglobulinas de membrana, compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, iguales dos a dos (dos cadenas pesadas y dos ligeras); y en las células T, por dos cadenas polipeptídicas distintas que forman un heterodímero,  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ . Todas estas cadenas polipeptídicas poseen partes llamadas "variables" (porque sus secuencias de aminoácidos varían con la especificidad), que configuran la estructura espacial donde encaja el epítomo [Guillén *et al.*, 1997]. Como ya se ha indicado, las células B reconocen epítomos superficiales en antígenos libres. En cambio, el receptor de las células T reconoce simultáneamente fragmentos (frecuentemente internos) del antígeno y partes polimórficas de moléculas de histocompatibilidad propias, presentes en la superficie de células auxiliares (en cuyo interior ha sido procesado el antígeno). El término "propias", referido a las moléculas de histocompatibilidad de la célula presentadora, significa que debe ser histocompatible con el linfocito T; por tanto, sólo se reconocen apropiadamente las combinaciones extraño (antígeno) más propio (molécula de histocompatibilidad); frente a las combinaciones propio (antígeno) más propio (molécula de histocompatibilidad) hay tolerancia (salvo en casos de autoinmunidad) y en las combinaciones extraño (antígeno) más extraño (molécula de histocompatibilidad) las células T no son capaces de reconocer los fragmentos antigénicos.

**Superantígenos:** Las macromoléculas denominadas superantígenos son reconocidas solo por la parte variable de las cadenas  $\beta$  ( $V\beta$ ) del receptor de células T; las cadenas  $\alpha$  no intervienen en el reconocimiento, por lo que las múltiples combinaciones de unas mismas cadenas  $\beta$  con cualesquiera cadenas  $\alpha$  son válidas para reconocer un mismo superantígeno. En consecuencia, mientras un antígeno convencional es reconocido, por término medio, por 1 entre  $10^4$  a  $10^6$  células T, un superantígeno puede activar del 5 al 25% de las células T [Herman *et al.*, 1991]. Los

superantígenos se unen directamente (sin necesidad de endocitosis ni procesamiento previos) a partes no polimórficas de moléculas de histocompatibilidad en la superficie de células presentadoras y, por otra parte, se unen a los segmentos V ã específicos en el receptor de las células T [Ogayar y Sánchez-Pérez, 1997]. La activación de ambas células y el elevado número de clones de células T capaces de responder, determinan una amplísima producción de citocinas, con resultados que van desde la anergia y la delección de clones hasta el síndrome del “shock” tóxico [Sawitzke *et al.*, 1995].

**Mitógenos:** Algunas sustancias que se unen a receptores de la superficie celular son capaces de estimular la proliferación de determinadas poblaciones linfocitarias, independientemente de la especificidad de los receptores para antígenos, por lo que se les llama mitógenos. Un mitógeno típico de linfocitos B es el LPS de las bacterias Gram-negativas; mitógenos de células T son las glicoproteínas (lectinas) de origen vegetal fitohemaglutinina A (PHA) y concanavalina A (ConA).

**Agentes inmunomoduladores y BRM:** Con las siglas BRM (“biological response modifiers”) se conocen agentes de muy diverso origen, que actúan de forma no específica sobre células implicadas en la inmunidad, con efectos de inmunomodulación: potenciación o supresión de mecanismos inmunitarios. Un mismo BRM puede actuar en un sentido u otro, dependiendo de los mecanismos inmunitarios afectados (por ejemplo, un agente puede potenciar la respuesta de anticuerpos y suprimir la inmunidad celular, o viceversa) y de factores externos como son dosis, vía y pauta de administración del agente. Roth [1988] distingue entre “BRM endógenos”, que serían las propias citocinas, moléculas que comunican entre sí a las células del sistema inmune, intercambiando señales de activación e inhibición, y “BRM exógenos”, que actúan modulando la producción de BRM endógenos.

## **1.1.2 Modificación no específica de los mecanismos inmunitarios.**

### 1.1.2.1. Inmunosupresión.

Como ya se ha indicado anteriormente (apartado 1.1.1.1), los fallos en los mecanismos de inducción de tolerancia frente a antígenos propios son la causa de enfermedades autoinmunes. La terapia ideal de estas enfermedades sería la supresión específica de las respuestas autoagresivas. Por otra parte, el desarrollo de las técnicas quirúrgicas hace que cada vez sean más los enfermos que se benefician de los trasplantes de órganos y tejidos. En la mayoría de los casos, se trata de trasplantes parcialmente compatibles (aloinjertos), en los que, pese a una cuidadosa selección de los pares donante/receptor, el sistema inmune del receptor reconoce y responde frente a los aloantígenos no compatibles presentes en las células del trasplante. También en estos casos, lo ideal sería suprimir específicamente las respuestas indeseables, sin afectar al resto del potencial inmunitario del enfermo. Sin embargo, estas intervenciones específicas no son posibles en la actualidad, por lo que (y en espera de otras posibles opciones futuras, como los xenoinjertos procedentes de animales manipulados genéticamente) se recurre a procedimientos de inmunosupresión inespecífica, debidamente controlados [Ruiz-Bravo *et al.*, 1998].

#### 1.1.2.1.1. Inmunosupresión por agentes físicos.

La irradiación con radiaciones electromagnéticas de longitud de onda adecuada tiene efectos inmunosupresores, debidos a la producción de daños celulares causados por la ionización de átomos. Los daños pueden ocurrir en el DNA o en el RNA, y si no pueden ser reparados impiden la división celular. La magnitud de sensibilidad de las células a la radiación



será mayor o menor en función de la fase del ciclo celular, es máxima en la fase de mitosis y es mínima en la fase S. No todas las funciones celulares son igualmente sensibles a las radiaciones: hay funciones radiosensibles, las ligadas a la proliferación celular; y radiorresistentes, las que no lo están [Ruiz-Bravo *et al.*, 1998].

Basándose en los efectos biológicos, el espectro electromagnético se puede dividir en dos grandes grupos: radiaciones ionizantes y no ionizantes [Ferris *et al.*, 1998].

- Radiaciones ionizantes: el espectro electromagnético con una frecuencia superior a la radiación ultravioleta genera unas ondas energéticas suficientes para expulsar electrones de los átomos, ocasionando rupturas en los enlaces químicos que producen alteraciones en el DNA. Según el daño se originan efectos necróticos, mutagénicos y cancerígenos. Este último efecto es debido a las alteraciones de los protooncogenes que constituye el mecanismo de activación de los oncogenes. Estos oncogenes se asocian de manera particular con determinados tipos de cáncer [Murray *et al.*, 2003].
- Radiaciones no ionizantes: donde encontramos las radiaciones ultravioletas, que comprenden las UV-A, la UV-B y la UV-C. Los efectos patológicos de las radiaciones ultravioletas son producidas por las UV-A y las UV-B. Las radiaciones UV-B provocan reacciones en el DNA que originan cambios moleculares y estructurales que ocasionan daños monoméricos y dimerizaciones. Las radiaciones UV-A a diferencia de las anteriores ocasionan un daño indirecto a través de la producción de moléculas químicas intermedias altamente reactivas. La radiación UV-A no es absorbida por el DNA, pero su acción genera oxígeno activado y radicales libres

hidroxílicos, que reaccionan con el DNA ocasionando daño monomérico [Ferris *et al.*, 1998].

#### 1.1.2.1.2. Inmunosupresión por anticuerpos.

El suero anti-linfocitos y su fracción de inmunoglobulinas, ALS (anti-lymphocyte serum) y ALG (anti-lymphocyte globulin) tienen actividad inmunosupresora. Se obtiene a partir de animales hiperinmunizados con antígenos linfocitarios de otra especie y cuya citotoxicidad se basa en la destrucción de los linfocitos circulantes. Los anticuerpos anti-linfocitos destruyen a los linfocitos circulantes, y ya que la mayor parte de los linfocitos que abandonan los órganos linfoides secundarios para pasar a linfa y a sangre son células T, habrá una pérdida progresiva de células T y un empobrecimiento celular de las áreas timo-dependiente [Ruiz-Bravo *et al.*, 1998]. La aplicación de las técnicas de obtención de anticuerpos monoclonales ha aportado nuevas posibilidades de eliminación selectiva de células inmunitarias. Actualmente se pueden seleccionar anticuerpos específicos para determinadas moléculas de la superficie linfocitaria, como CD3, CD4, moléculas del MHC (“**m**ajor **h**istocompatibility **c**omplex”) de clase II, etc. Algunos de estos anticuerpos, administrados *in vivo*, son capaces de eliminar la población o subpoblación celular portadora de la correspondiente molécula superficial.

En la actualidad hay numerosos anticuerpos monoclonales comercializados en España, como el Abciximab® que actúa de manera específica frente al receptor de la glicoproteína IIb/IIIa localizado en la superficie de las plaquetas; Basiliximab®, un anticuerpo de tipo quimérico murino /humano (Ig G-1K), que se une selectivamente a la cadena alfa del receptor de IL-2 y se utiliza para tratamiento preventivo del rechazo agudo en trasplantes de riñón [Adu *et al.*, 2003]; Infliximab®, quimérico humano derivado de ratón, capaz de unirse de manera selectiva al factor de necrosis

tumoral tipo alfa (TNF- $\alpha$ , “tumor necrosis factor”), inhibiendo sus funciones biológicas; Rituximad®, específico de los receptores de superficie CD20 de los linfocitos B humanos, indicado en el tratamiento de los linfomas no hodkignianos de células B; Daclizumad®, de reciente comercialización en nuestro país, es un anticuerpo monoclonal recombinante dirigido a la cadena alfa del receptor de IL-2, como el Basilimad® con el que comparte las indicaciones terapéuticas y caracterizándose por una excelente tolerancia. Actualmente existe una larga lista de anticuerpos monoclonales en fase experimental [Anónimo, 2000].

#### 1.1.2.1.3. Inmunosupresión por agentes químicos.

Multitud de agentes químicos tienen actividad inmunosupresora, pero en este trabajo solo se dedicará atención a la supresión producida por fármacos cuyo efecto inmunosupresor esté incluido en su actividad farmacológica. Los fármacos inmunosupresores pueden actuar a distintos niveles [Ruiz-Bravo *et al.*, 1998]: bloqueando la síntesis de DNA, inhibiendo la activación de los linfocitos y en último lugar alterando la recirculación y distribución de linfocitos e inhibiendo las respuestas inflamatorias.

**Bloqueo de la síntesis de DNA:** Entre los agentes con este mecanismo de acción encontramos los agentes alquilantes (ciclofosfamida), antimetabolitos del ácido fólico (metotrexato), antimetabolitos de bases púricas (azatioprina, micofenolato-mofetil) y pirimidínicas.

En primer lugar debemos hablar de la ciclofosfamida, ya que es uno de los fármacos seleccionados para nuestros modelos experimentales de inmunosupresión. La ciclofosfamida se considera el prototipo de los agentes alquilantes. Puede administrarse por las vías oral y parenteral. La molécula en sí es inactiva, pero los productos de su metabolismo hepático son capaces de establecer uniones covalentes con restos nucleofílicos de

proteínas y ácidos nucleicos; las alteraciones del DNA impiden su replicación y transcripción, mientras que las del RNA afectan a la traducción y, por tanto, a la síntesis proteica. Aunque la ciclofosfamida afecta a todas las fases del ciclo celular, la fase S parece ser la más sensible [Arnáiz *et al.*, 1997]. Entre sus indicaciones terapéuticas destacan las siguientes:

- Como agente antitumoral, la ciclofosfamida suele utilizarse en combinación con otros fármacos citostáticos, en el tratamiento de diversos tumores, como el carcinoma de mama [Gershanovich *et al.*, 1994], de ovario [Conte *et al.*, 1994] o linfomas [Wang *et al.*, 1994].
- A dosis inferiores a las indicadas en quimioterapia antitumoral, se utiliza como inmunosupresor, en el control del rechazo en órganos transplantados (en combinación con otros agentes inmunosupresores) [Ruiz-Bravo *et al.*, 1998] y en el tratamiento de trastornos inmunopatológicos en los que se deba suprimir una respuesta adversa, como la enfermedad de Wegener, el lupus eritematoso y las formas severas de artritis reumatoide [Arnáiz *et al.*, 1997]. La administración de ciclofosfamida, sola o combinada con factores estimuladores de la mielopoyesis (G-CSF, “granulocyte colony stimulation factor”), promueve la presencia de células madre hematopoyéticas en sangre periférica, lo que permite su rescate y criopreservación mientras los enfermos de diversos tipos de tumores son sometidos a quimioterapia intensa (generalmente utilizando combinaciones que suelen incluir la propia ciclofosfamida) con secuelas de afectación medular, para finalmente reintroducir las células progenitoras extraídas [Bezwodna *et al.*, 1994]. En los trasplantes de médula ósea, se utilizan dosis altas de ciclofosfamida para la destrucción del

sistema inmune y la inducción de aplasia medular previas al trasplante [Arnáiz *et al.*, 1997].

Los tratamientos con ciclofosfamida pueden ocasionar varios efectos secundarios, adversos, como indican los propios prospectos de las empresas que la comercializan: trastornos gastrointestinales (náuseas, vómitos, anorexia), alopecia, esterilidad reversible y, lógicamente, los derivados de la afectación medular: trombocitopenia y leucopenia. Las dosis elevadas y los tratamientos prolongados pueden causar cistitis hemorrágicas, nefropatías y cardiotoxicidad.

El metotrexato actúa como cofactor enzimático necesario para la síntesis de novo de las purinas. Tiene muy poca utilización en trasplantes pero se ha convertido en uno de los inmunosupresores preferidos para patologías de origen autoinmune debido a la relativa ausencia de efectos adversos.

La azatioprina es otro de los fármacos elegidos para determinar nuestro modelo de inmunosupresión murino; la azatioprina es un derivado imidazólico de la 6-mercaptopurina, sintetizado con la finalidad de hacer que se libere más lentamente la molécula activa. La 6-mercaptopurina es un análogo de la base purínica hipoxantina y se comporta como un antagonista impidiendo la proliferación celular mediante la inhibición competitiva de la síntesis de purinas necesaria para la formación de ácidos nucleicos. Parece que su acción inmunosupresora afectaría más a los linfocitos T que a los B y además reduce la actividad de las células natural killer (NK) [Carretero, 2000]. Entre sus indicaciones terapéuticas destacamos:

- Trasplantes.
- Hepatitis crónica activa.

- Artritis reumatoide grave.
- Lupus eritematoso sistémico.
- Dermatomiositis.
- Enfermedad inflamatoria intestinal.
- Anemia hemolítica adquirida.

La dosis empleada en el caso de trasplantes de órganos es de 5 mg/Kg/día, seguida de una dosis de mantenimiento de 1 a 4 mg/Kg/día según las necesidades clínicas y tolerancia. En las otras enfermedades, generalmente es de 2 a 2.5 mg/Kg/día que se reducirá si aparecen complicaciones. Las dosis se ajustan habitualmente en función del peso del paciente, con lo que se pretende alcanzar la mayor eficacia terapéutica y, al mismo tiempo reducir la incidencia de los efectos adversos. Se han sugerido diversas estrategias para monitorizar de forma individualizada y de modo más fiable la dosis de azatioprina, de todas, la más destacada es la determinación de la actividad de la tiopurina metiltransferasa [Gisbert *et al.*, 2002].

Como efectos secundarios más importantes figuran la mielodepresión, que es dosis-dependiente, y puede manifestarse como leucopenia, trombocitopenia, y anemia; adicionalmente, daños hepáticos, alteraciones gastrointestinales, alopecia reversible, rash, artralgias, mialgias, fiebre, pneumonitis, pancreatitis, meningitis y arritmias, estas últimas raramente [Del Valle *et al.*, 2001].

El micofenolato de mofetilo es otro profármaco que permite la adsorción del ácido micofenólico, un antiguo antibiótico nunca usado como tal, pero que ha resultado ser un inhibidor muy selectivo de la inosina monofosfato deshidrogenasa, enzima clave de la síntesis de novo de las bases púricas. Inhibe la proliferación de linfocitos T y B, frena la síntesis de

anticuerpos y la generación de linfocitos T citotóxicos. Las indicaciones terapéuticas son las mismas que las de la azatioprina.

*Inhibición de la activación de linfocitos:* Este es el mecanismo de acción de importantes moléculas inmunosupresoras, no citotóxicas, entre las que destacan por sus aplicaciones terapéuticas la ciclosporina A y el macrólido denominado FK506 o tacrolimus, comercializado con el nombre de Prograf®, de uso hospitalario.

La ciclosporina A es un decapeptido cíclico, producto del hongo *Tolypocladium inflatum*, posee un efecto inmunosupresor selectivo que afecta a las primeras fases de activación del sistema inmune. En el interior de las células T, la ciclosporina se une a la proteína ciclofilina, formando un complejo que inhibe a la calcineurina, lo que bloquea la vía de señalización dependiente del calcio, y, finalmente, impide la activación del factor de transcripción NF-AT (“nuclear factor of activated T cells”). El resultado es la inhibición de la transcripción del gen que codifica IL-2, que es una citokina necesaria para la activación de las células T (suministra señales de coactivación, incluyendo estimulación autocrina); la producción de otras citokinas se ve también inhibida. Desde su introducción en los años 70, se ha convertido en un clásico en el control del rechazo de trasplantes alogénicos, que también se emplea en enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, psoriasis) [Ruiz-Bravo *et al.*, 1998].

El tacrolimus, (antes conocido como FK506) es un macrólido de origen bacteriano (*Streptomyces tsukubaensis*) que, uniéndose a proteínas citosólicas de la familia FKBP (de “FK506 binding proteins”), inactiva también a la calcineurina, con el mismo resultado que la ciclosporina [Fonseca, 2003]. Este fármaco ha sido utilizado en nuestra investigación, como representante típico de los agentes inhibidores de la calcineurina.

Tacrolimus fue introducido con el propósito de evitar los numerosos efectos secundarios de la ciclosporina, especialmente su nefrotoxicidad. Las primeras series de ensayos clínicos de tacrolimus como inmunosupresor en trasplantes datan de finales de los 80. Las indicaciones terapéuticas de tacrolimus son:

- La inmunosupresión primaria en receptores de aloinjertos hepáticos y renales. El tacrolimus debe ser el inhibidor de la calcineurina de primera elección para pacientes que reciben un primer trasplante hepático [O'Grady *et al.*, 2002]. El tacrolimus se puede emplear en monoterapia o en asociaciones, en doble, triple o cuádruple. Actualmente existen asociaciones muy satisfactorias en los trasplantes, en términos de sobrevida del paciente y del injerto [Cherikh *et al.*, 2003].
- Rechazo de aloinjertos hepáticos, renales o cardíacos. El tacrolimus es más efectivo que la microemulsión de ciclosporina en la prevención de rechazo agudo después de un trasplante renal [Margreiter *et al.*, 2002].
- Y una nueva indicación, en la dermatitis atópica moderada o grave, siempre mediante uso tópico del tacrolimus. Además del mecanismo de acción antes comentado, por vía tópica parece unirse a las células de Langerhans y los mastocitos en la zona del receptor de la IgE, limitando así la capacidad para la presentación de antígenos, la liberación de histamina y las respuestas inflamatorias mediadas por IgE. Por otra parte se ha demostrado que no afecta a la síntesis normal de colágeno. Todos estos hechos explican la eficacia y seguridad en el control de la dermatitis atópica [Vélez *et al.*, 2002].



Los efectos adversos más destacados son fiebre, prurito, erupciones exantemáticas, hipertensión, edemas periféricos, hipertrofia cardiaca reversible generalmente en niños [Romero *et al.*, 2002]; además, alteraciones digestivas, muy frecuentemente náuseas y vómitos; genitourinarias donde hay que destacar la nefrotoxicidad que afecta entre un 33–44% de los casos; hepatobiliares, con incrementos de los valores de las transaminasas. La hiperglucemia es otros de los efectos más indeseables de este fármaco, y por último cabe destacar las alteraciones neurológicas con una importante incidencia de cefaleas, temblores y parestesia. En el caso del uso tópico el efecto adverso más frecuente es la sensación de quemazón o irritación, que comienza a los pocos minutos de su aplicación y puede durar unos noventa minutos [Fonseca, 2003].

*Alteración de la recirculación y distribución de linfocitos e inhibición de las respuestas inflamatorias:* Estos son los principales mecanismos de acción de los corticosteroides y moléculas sintéticas relacionadas (prednisona, prednisolona), aunque también ponen en marcha otros mecanismos inmunosupresores, como la inhibición de la presentación de antígenos y de la secreción de citocinas coestimuladoras. Hay que tener presente que las hormonas esteroideas regulan, mediante su unión a receptores intracelulares, la expresión de un gran número de genes (alrededor del 1% del genoma) [Janeway *et al.*, 2003]. Por ello, la acción de los fármacos antiinflamatorios derivados es muy compleja, y existen diversos efectos colaterales, como la retención de líquidos, aumento de peso, desmineralización ósea, adelgazamiento de la piel, aumento de la glucemia, hiperlipemia, hipertensión, etc. Clásicamente, los corticosteroides han formado parte, en combinación con otros agentes (inhibidores de la calcineurina y agentes antiproliferativos), de los regímenes de inmunosupresión para controlar el rechazo de órganos transplantados [Eisen y Ross, 2004; Hardinger *et al.*, 2004], así como en el tratamiento de las manifestaciones de hipersensibilidad inmediata, especialmente el asma [Sin

*et al.*, 2004; Kallstrom, 2004], y en las enfermedades autoinmunes con patología inflamatoria [Lundberg *et al.*, 2004].

#### 1.1.2.2. Inmunopotenciación.

Como se indicó en el apartado 1.1.2.1, las sustancias capaces de aumentar la intensidad de los mecanismos inmunitarios suelen presentar una actividad multifactorial, que incide de forma diversa en la compleja red de interacciones entre las células y las moléculas del sistema inmune, por lo que sus efectos, más que potenciadores, son, en la mayoría de los casos, inmunomoduladores. Esta concepción es la que se recoge en la denominación "BRM". Como ya se indicó, las citokinas se consideran BRM endógenos, y son un buen ejemplo de actividades complejas (pleotropismo). Entre los BRM exógenos hay muchos de origen microbiano, ya sean microorganismos enteros, fracciones microbianas y productos de su metabolismo. Estos agentes suelen actuar estimulando macrófagos, que liberan citokinas, las cuales actuarán modificando el estado inmunitario y la capacidad de respuesta de los linfocitos, aunque algunos pueden actuar directamente sobre los linfocitos. También hay BRM inorgánicos, cuya acción combina la liberación lenta del antígeno incorporado en ellos y la inducción de reacciones inflamatorias, con la subsiguiente estimulación de macrófagos. Revisiones globales de los BRM y sus aplicaciones clínicas (como componentes de vacunas, en la inmunoterapia no específica de enfermedades tumorales y como inmunorestauradores en sujetos inmunocomprometidos) pueden encontrarse en Allison [1994] y Ruiz-Bravo *et al.* [1998].

##### 1.1.2.2.1. BRM endógenos.

La capacidad de respuestas coordinadas del sistema inmune, tanto en los mecanismos innatos como en los específicos, requiere la transferencia

de información entre células. Las células se comunican entre sí de dos maneras distintas: por contacto célula-célula, mediante juegos de moléculas que, ubicadas en las respectivas superficies celulares, actúan como ligandos y receptores; y a distancia, mediante moléculas secretadas por una célula, que se unen a receptores en la superficie de otra célula. En ambos casos, la ocupación del receptor por el ligando inicia una señal bioquímica que se transmite desde la superficie celular hasta el núcleo, mediante cadenas de intermediarios, conectados entre sí, que constituyen las vías de señalización, las cuales terminan con la activación de factores de transcripción que penetran en el núcleo y activan la transcripción de determinados genes.

Las moléculas utilizadas como mensajeros por las células implicadas en la inmunidad son las citokinas, que se definen como proteínas o glicoproteínas solubles, secretadas por una célula, que se unen a receptores en otras células (ocasionalmente, en la propia célula productora), induciendo determinadas respuestas (consecuencia de modificaciones en el perfil de activación de genes) [Janeway *et al.*, 2003]. Las citokinas son, por tanto, moléculas inmunorreguladoras que se corresponden con el concepto de BRM endógenos. La denominación de interleukina se reserva para citokinas producidas por leucocitos. Las interleukinas se representan con las siglas IL seguidas de un número. Los genes de todas las interleukinas conocidas (una treintena) han sido clonados, así como los de otras muchas citokinas y sus receptores. Por tanto, se pueden obtener citokinas, por técnicas de ingeniería genética, como proteínas recombinantes, lo que facilita su aplicación como inmunofármacos. Pero hay que tener en cuenta que la mayoría de las citokinas son moléculas pleiotrópicas, capaces de inducir un espectro más o menos amplio de efectos, y esta complejidad de acciones, unida a su gran actividad biológica y a la existencia de efectos colaterales indeseables, que exigen una dosificación muy precisa, son factores que limitan su utilización en terapia humana.

Las citokinas pueden agruparse en cuatro familias estructurales: hematopoyetinas, interferones, quimiokinas y familia del TNF (siglas de “tumor necrosis factor”); en un quinto grupo se incluirían citokinas no asignadas a ninguno de los anteriores (**Tabla 1**). A su vez, los receptores de citokinas se agrupan también en cuatro familias, que se corresponden muy aproximadamente con las familias de citokinas. La información general que sigue se puede contrastar en textos generales de inmunobiología, como el de Janeway *et al.* [2003]; adicionalmente, se incluyen algunas referencias específicas.

*Familia de hematopoyetinas:* Se encuentran en este grupo, entre otras, las citokinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-15, G-CSF y GM-CSF.

La eritropoyetina da nombre al grupo, aunque no es una citokina relevante en inmunidad. Si lo son, en cambio, los factores estimuladores de colonias (genéricamente, CSF, de “colony stimulating factor”): actúan sobre las células madre de médula ósea, progenitoras de los linajes mieloide/monocitoide, promoviendo su diferenciación en neutrófilos (granulocitos) (G-CSF), o en neutrófilos, monocitos y células dendríticas (GM-CSF). G-CSF es producido por fibroblastos y monocitos, mientras que macrófagos inflamatorios y linfocitos T son la principal fuente de GM-CSF. Estas citokinas permiten el reemplazamiento de las células fagocíticas perdidas en curso de las reacciones inflamatorias inducidas por procesos infecciosos; pero también estimulan la recuperación de la función medular en casos de leucopenia debida a diversas causas (por ejemplo, a tratamientos antineoplásicos), lo que ha llevado a su comercialización como fármacos promotores de leucopoyesis: Granocyte® (lenograstim), Euprotin® (lenograstim), Granulokine® (filgrastim) y Neupogen® (filgrastim) son formas recombinantes de G-CSF humano, y Leucomax® (molgramostim) es GM-CSF humano recombinante. GM-CSF es, además,

una citokina estimuladora de los macrófagos. Otra citokina promotora de leucopoyesis es IL-3, a la que conoce también como multi-CSF; IL-3 es producida por linfocitos T.

En esta familia figuran citocinas con efectos no relacionados con la leucopoyesis, pero de gran importancia en la regulación de la respuesta inmune. IL-2 es producida por células T CD4<sup>+</sup>, concretamente por la subpoblación T<sub>H1</sub>, así como por algunas células CD8<sup>+</sup>; es un importante factor coestimulador para los linfocitos T, que puede actuar también de forma autocrina; en su ausencia las respuestas de inmunidad celular son abolidas. También estimula la proliferación de células NK. IL-4, IL-5 e IL-6 son producidas por células T<sub>H2</sub>: todas ellas proporcionan señales a los linfocitos B (IL-4 coopera a la activación B y promueve la producción de ciertas clases de inmunoglobulinas, entre ellas la IgE que media las manifestaciones de hipersensibilidad inmediata; IL-5 promueve diferenciación de células B preactivadas y la síntesis de IgA; IL-6 estimula la diferenciación de linfocitos B). Además, IL-4, también producida por mastocitos, inhibe la diferenciación de T<sub>H0</sub> en T<sub>H1</sub> (favoreciendo, por tanto, indirectamente, la diferenciación en células T<sub>H2</sub>); IL-5 es un importante factor estimulador de eosinófilos (lo que la relaciona con la hipersensibilidad inmediata); IL-6, producida también por macrófagos, es una citokina proinflamatoria, que induce producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos y actúa como pirógeno endógeno.

**Tabla 1.** Familias de citocinas.

Familia	Citokina	Células Productoras	Efectos
Hematopoyetinas	IL-2	Células T <sub>H1</sub> , CTL	Proliferación de células T Promoción de hematopoyesis temprana Activación de células B, respuesta de IgE, diferenciación de células T <sub>H2</sub> Proliferación de células B, proliferación de eosinófilos
	IL-3	Células T, epitelio tímico	
	IL-4	Células T <sub>H2</sub> , mastocitos	
	IL-5	Células T <sub>H2</sub> , mastocitos	

	IL-6 GM-CSF	Células T <sub>H</sub> 2, macrófagos Macrófagos, células	Diferenciación de células B, respuesta de fase aguda  Crecimiento y diferenciación del linaje mieloide/monocitoide
<b>Interferones</b>	IFN- $\alpha$ IFN- $\beta$ IFN- $\gamma$	Leucocitos Fibroblastos Células NK, células T <sub>H</sub> 1	Resistencia antiviral, expresión de MHC-I Resistencia antiviral, expresión de MHC-I Activación de macrófagos, activación de NK, inmunorregulación
<b>Familia del TNF</b>	TNF- $\alpha$ TNF- $\beta$	Macrófagos, células NK Linfocitos B y T	Activación endotelial, respuesta de fase aguda Activación endotelial, citotoxicidad
<b>Quimiokinas</b>	IL-8	Macrófagos	Quimioatracción de neutrófilos
<b>No clasificadas</b>	IL-1 IL-10 IL-12 IL-18 TGF- $\beta$	Macrófagos  Macrófagos, células T <sub>H</sub> 2, células T <sub>H</sub> 1 Macrófagos, células B Macrófagos Células T <sub>H</sub> 3, células T <sub>H</sub> 1	Coestimulación de células T, respuesta de fase aguda  Inhibición de macrófagos, inhibición de la diferenciación de células T <sub>H</sub> 1  Activación de NK, diferenciación de células T <sub>H</sub> 1 Producción de IFN- $\gamma$ por células NK y T Inhibición de proliferación de linfocitos, tolerancia, acción antiinflamatoria

**Familia de interferones:** Los interferones se definen como moléculas que se producen en respuesta a la infección por virus (o a otros estímulos); una vez secretados, se unen a receptores en la superficie de las células vecinas a la productora, en las que inducen la transcripción de un número de genes, cuyos productos se activan en presencia de la infección por virus, inhibiendo la transcripción y degradando los mRNA; el resultado es el bloqueo de la difusión de la infección viral. Hay dos tipos de interferones humanos. El tipo I incluye al IFN- $\alpha$  (producido por leucocitos) y el IFN- $\beta$  (típicamente producido por fibroblastos); y el tipo II o interferón inmune es el IFN- $\gamma$  (producido principalmente por células NK, linfocitos T<sub>H</sub>1 y células T citotóxicas activadas), con importantes propiedades inmunorreguladoras:

incrementa la expresión de antígenos de histocompatibilidad (potenciando la capacidad de presentación de antígenos extraños a las células T), estimula la diferenciación de linfocitos B, inhibe la diferenciación de  $T_H0$  en  $T_H2$  (lo que, indirectamente, favorece la generación de  $T_H1$ ), activa a las células NK, pero, sobre todo, es la principal citokina activadora de macrófagos (lo que significa un papel crucial en la inmunidad celular, efectiva frente a patógenos intracelulares). Los tres interferones humanos se han comercializado como fármacos de origen recombinante (expresados en bacterias manipuladas genéticamente). La denominación Intron® hace referencia a IFN- $\alpha$ ; por sus propiedades antivirales, se utiliza en el tratamiento de la hepatitis B crónica de alta infectividad y de la hepatitis C crónica; por sus propiedades antiproliferativas e inmunomoduladoras, en la terapia de varias enfermedades tumorales (tricoleucemia, mieloma, sarcoma de Kaposi, linfoma folicular y leucemia mieloide crónica, y en la prevención de recidivas de enfermos a los que se han extirpado melanomas). La conjugación del IFN- $\alpha$  con polietilenglicol (pegilación) mejora las propiedades farmacocinéticas; los productos pegilados, como Pegintron® y Pegasys®, se utilizan, solos o combinados con ribavirina, en la terapia de la hepatitis C. Avonex®, Betaferon® y Frone® son distintas formas de IFN- $\beta$  humano; los dos primeros se utilizan en la terapia de las formas recidivantes de la esclerosis múltiple en enfermos ambulatorios, ya que, por mecanismos no conocidos, son capaces de reducir la frecuencia y gravedad de las recaídas. Frone® está indicado en hepatitis crónicas B y C, del condiloma acuminado (causado por *Papillomavirus*) y como coadyuvante a la hormonoterapia del carcinoma de mama. Imukin® es IFN- $\gamma$ , que se utiliza en el tratamiento de inmunodeficiencias como la enfermedad granulomatosa crónica, en la que la capacidad microbicida de los fagocitos es gravemente deficitaria.

Recientemente, a partir de datos de secuencia del genoma humano, se ha identificado una nueva familia de citocinas, relacionada con los

interferones. En esta familia figuran IL-28 e IL-29 y su receptor, IL-28R; ambas citokinas son inducidas por infección vírica y poseen actividad antiviral [Sheppard *et al.*, 2003].

**Familia de quimiokinas:** Se conocen con esta denominación, un gran número de citokinas con capacidad para atraer, quimiotácticamente, a diversos tipos de células implicadas en la inmunidad. Las células que responden migran a favor del gradiente de concentración de la quimiokina, hacia el foco de producción de la misma. Hay dos grupos de quimiokinas, las CC, que presentan, cerca del extremo amino-terminal, dos cisteínas adyacentes, y las CXC, que incluyen un aminoácido distinto entre las dos cisteínas. Las quimiokinas CC se unen a receptores en la superficie de monocitos y otros tipos celulares: por ejemplo, MCP-1, producida por macrófagos, fibroblastos y queratinocitos en respuesta a estímulos inflamatorios, induce la adhesión al endotelio vascular, promoviendo la diapedesis de monocitos, linfocitos T, células NK y polimorfonucleares basófilos; RANTES, producida por células T, células endoteliales y plaquetas, tiene un espectro similar; MIP-1 $\alpha$  (producida por macrófagos, células T, mastocitos) y MIP-1 $\beta$  (producida por macrófagos, neutrófilos, células endoteliales) atraen a monocitos, células T, células NK y células dendríticas. Entre las CXC, algunas promueven la diapedesis y posterior migración de neutrófilos, como IL-8, producida por macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos; o PBP, secretada por plaquetas. Otras quimiokinas CXC atraen a células T (es el caso de IP-10) o células B (por ejemplo, BCL). Un aspecto de interés es que algunas quimiokinas, tanto CC, como MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , o CXC, como SDF-1, se unen a receptores (CD195 y CD184, respectivamente) que son, a su vez, correceptores para el virus del SIDA (HIV); por tanto, son capaces de bloquear la fusión de la envoltura del HIV con la membrana citoplásmica de las células T CD4<sup>+</sup>, lo que se ha tomado como base para diseñar



fármacos que impiden la entrada del HIV en sus células diana [Shaheen y Collman, 2004].

*Familia del TNF:* Los componentes de este grupo son proteínas triméricas, que pueden encontrarse en forma soluble, pero también como moléculas de la superficie celular. TNF- $\alpha$  es una citokina proinflamatoria producida por macrófagos, células T y células NK; también conocida como "caquexina", por inducir estados de caquexia en enfermedades infecciosas o tumorales prolongadas, sus principales acciones son la inducción de la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, la elevación de la temperatura corporal y la activación del endotelio vascular. La producción masiva de TNF- $\alpha$  en casos de sepsis por respuesta generalizada a la endotoxina de bacterias Gram-negativas o a superantígenos de cocos Gram-positivos se considera una causa principal del shock séptico [Tsytsykova y Goldfeld, 2000]. Las propiedades antitumorales que TNF- $\alpha$  demostró en modelos experimentales, y a las que debe su nombre, no han encontrado aplicación generalizada en clínica humana, aunque, comercializado con las denominaciones de tasonermina (Beromún®), se utiliza en el tratamiento, por perfusión arterial, de sarcomas de extremidades, antes de su eliminación quirúrgica, o, como terapia paliativa, en sarcomas inextirpables. Alternativamente, se investiga el efecto beneficioso de la neutralización de la actividad biológica de TNF- $\alpha$  en enfermedades autoinmunes con un componente inflamatorio importante, como la artritis reumatoide o la enfermedad de Crohn. Tanto Infliximab como Adalimumab son anticuerpos monoclonales específicos para TNF- $\alpha$  humano, que se utilizan en la terapia de este tipo de patologías; etanercept (Enbrel®) es una proteína dimérica, constituida por la parte Fc de la IgG y el receptor p75 del TNF- $\alpha$ , que se usa para bloquear TNF- $\alpha$ , con igual finalidad. Aunque el papel concreto del TNF- $\alpha$  en la defensa frente a las infecciones no está bien establecido, se han comunicado casos graves de reactivación de tuberculosis en pacientes tratados con estos

inmunofármacos; por ello, la preexistencia de una tuberculosis activa se considera actualmente una contraindicación para tales tratamientos [Centers for Disease Control and Prevention, 2004].

TNF- $\alpha$ , producido por linfocitos, induce activación endotelial y muerte por apoptosis. Otras moléculas de esta familia, ubicadas en la superficie de linfocitos T, causan apoptosis en células diana; un buen ejemplo es el ligando de Fas (FasL o CD178). Pero en otros casos el efecto es activador, como es el caso del ligando de CD40, denominado CD154, que, expresado por células T<sub>H2</sub> activadas, proporciona señales coestimuladoras a los linfocitos B, induciendo el cambio de clase de inmunoglobulina. Aunque pertenecientes a esta familia, tanto CD154 como CD178 no deben considerarse citokinas, ya que no actúan a distancia sino que intervienen en interacciones célula-célula.

*Otras citokinas:* En este “cajón desastre” figuran citokinas no asignadas a ninguna de las familias anteriores. IL-1, tanto en sus formas  $\alpha$  como  $\beta$ , es una citokina proinflamatoria producida por macrófagos y células epiteliales; es un pirógeno endógeno, y también media la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, además de estimular a los macrófagos y de coadyuvar a la activación de células T.

También producidas por macrófagos, IL-12 e IL-18 activan a las células NK, favoreciendo la producción de IFN- $\gamma$ , y promueven la diferenciación de T<sub>H0</sub> en T<sub>H1</sub>, representando un papel importante en la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares.

Dos importantes citokinas antiinflamatorias incluidas en este grupo son IL-10, producida por macrófagos y por células T<sub>H2</sub>, y TGF- $\beta$  (siglas de “transforming growth factor”), producida por células T<sub>H3</sub>, que tiene, además, efectos antiproliferativos, y se asocia a la tolerancia (falta de

respuesta) que se puede inducir por la administración de antígenos por vía oral.

*Las citokinas en la inmunidad innata y específica:* Entre las citokinas que intervienen en la inmunidad innata, ocupan una posición crucial las monokinas, o sea, citokinas producidas por los macrófagos, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 y GM-CSF. Hay que recordar que algunas de ellas, como IL-1 o IL-6, también participan en la inmunidad específica.

Las citokinas producidas por células T son decisivas en la respuesta inmune específica. Los perfiles de producción de citokinas permiten distinguir a las subpoblaciones  $T_H1$  (IL-2, IFN- $\gamma$ ),  $T_H2$  (IL-4, IL-5, IL-6),  $T_H3$  (TGF- $\beta$ ) y  $T_R1$  (TGF- $\beta$  e IL-10). IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6 suministran señales coestimuladoras a los linfocitos y/o promueven su diferenciación a células efectoras; IFN- $\gamma$  participa en la inmunidad celular, contribuyendo a la activación de macrófagos; TGF- $\beta$  e IL-10 son citokinas supresoras.

Las citokinas establecen una serie de redes de comunicación complejas, que implican distintos mecanismos de inmunidad innata y específica. Por ejemplo, los macrófagos estimulados por productos microbianos (PAMPs) producen citokinas pro-inflamatorias, entre ellas IL-1, que, a su vez, coadyuva a la activación de linfocitos T, e IL-6, que promueve la diferenciación de las células B activadas a plasmocitos. Por su parte, las células  $T_H1$  activadas producen IFN- $\gamma$ , que activa a los macrófagos, los cuales producirán todo su arsenal de citokinas. En cambio, las células  $T_H2$  y las  $T_R1$  producen IL-10, que inhibe a las  $T_H1$  y a los macrófagos. La complejidad de las redes se incrementa por el pleiotropismo ya comentado: una misma citokina que se una al mismo complejo receptor en diversos tipos de células, puede inducir respuestas

biológicas distintas en cada uno de esos distintos linajes celulares [Ishihara e Hirano, 2002].

#### 1.1.2.2.2. BRM exógenos.

Desde mediados del siglo pasado, se fueron acumulando evidencias sobre la capacidad de algunas bacterias para potenciar mecanismos inmunitarios que podían conducir a la destrucción de células tumorales *in vivo*, tanto en modelos experimentales como en series clínicas. La atención de los investigadores se centró en preparaciones de BCG (siglas de bacilo de Calmette y Guerin, para designar a una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, usada como vacuna antituberculosa), que en clínica humana se administraban sobre extensas escarificaciones cutáneas y también, intralesionalmente. Tras una serie de resultados preliminares alentadores, se concluyó que los efectos antitumorales de BCG no fueron significativos en la mayoría de los casos; sin embargo, prosigue su uso, en aplicación intravesical: Vejicur® e Immuncyst® BCG son preparaciones de cepas BCG liofilizadas, indicadas en el tratamiento del carcinoma de vejiga *in situ* y en el tratamiento preventivo de recidivas de carcinoma urotelial. El mecanismo de acción no es bien conocido, pero se cree que las micobacterias inducen una reacción inflamatoria en la mucosa, con acumulación de macrófagos, neutrófilos y linfocitos T y secreción de citocinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-2), que puede ser un factor importante en la destrucción de células tumorales [Bohle y Brandau, 2003]. También se investiga el potencial de BCG para incrementar la inmunogenicidad de vacunas con células tumorales inactivadas de melanoma y cáncer de mama. Otras bacterias, como propionibacterias y estreptococos, han sido también reconocidas como agentes inmunomoduladores y se sigue investigando sus posibles aplicaciones clínicas.

Los estudios para determinar en qué fracciones de las micobacterias y otras bacterias Gram-positivas residía la actividad inmunomoduladora condujeron a establecer el MDP (“muramil dipeptide”) como la mínima fracción activa de la mureína (componente de la pared bacteriana). El MDP se une a TLR2, presente en la superficie de macrófagos, cuyas funciones de fagocitosis y secreción de citocinas estimula [Beutler *et al.*, 2001]; también potencia las respuestas de anticuerpos y de inmunidad celular. El MDP posee efectos colaterales como pirogenicidad e inducción de sueño, pero se han conseguido derivados acilados de esta molécula que conservan las propiedades inmunomoduladoras con mínima toxicidad. Uno de ellos, el murabutide, incrementa la resistencia no específica frente a infecciones e incrementa la leucopoyesis, sin efectos colaterales indeseables. Recientemente, se ha encontrado que el murabutide inhibe la replicación del virus del SIDA (HIV) en células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas), en las cuales incluso la denominada HAART (“highly active antiretroviral therapy”) es poco eficaz, por lo que actúan como reservorios del HIV [De La Tribonniere *et al.*, 2003]. Los macrófagos estimulados con murabutide expresan tres factores celulares con capacidad para inhibir la replicación del HIV, y reprimen otros que facilitan su entrada y replicación [Darcissac *et al.*, 2000]; el análisis de linfocitos de enfermos de HIV ha permitido descubrir un nuevo factor celular, una helicasa de RNA, que es un cofactor crucial en la replicación del HIV a nivel transcripcional, y que es inhibida por el murabutide [Cocude *et al.*, 2003]. Los ensayos clínicos realizados en los últimos años revelan que el murabutide es bien tolerado y que puede mejorar la situación inmunitaria deteriorada en los enfermos de SIDA.

El LPS es un componente típico de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, también denominado endotoxina. Esta molécula se une a una proteína plasmática, denominada LBP (“LPS binding protein”), y el complejo es capturado por CD14, un receptor de la superficie de los

macrófagos; finalmente, el complejo LPS-LBP-CD14 se une, en la membrana, a TLR4 y su molécula asociada MD-2, lo que genera una señal de activación celular: los macrófagos se ven estimulados en sus funciones de fagocitosis, producción de radicales microbicidas de oxígeno y nitrógeno, y secreción de citokinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, etc.), que causan una reacción inflamatoria, fiebre y estimulación de la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos [Miyake, 2003; Miller *et al.*, 2005]. En situaciones de infección sistémica por bacterias Gram-negativas, el LPS puede causar sepsis debida a una liberación masiva de citokinas proinflamatorias, con resultado de daño endotelial, coagulación intravascular, hipotensión y, finalmente, fallo multiorgánico (choque séptico) [Karima *et al.*, 1999]. Además de estimular a los macrófagos, el LPS es un mitógeno y activador policlonal de linfocitos B, y un modulador de la respuesta de anticuerpos [Ruiz-Bravo *et al.*, 1998]. La toxicidad del LPS limita sus aplicaciones, pero se han obtenido diversos derivados de su parte activa (el lípido A) que retienen propiedades inmunomoduladoras con menores efectos colaterales. Uno de estos derivados, con aplicaciones inmunofarmacológicas, es el MPL (“mono-phosphoril-lípido A”) [Salkowski *et al.*, 1997]. Esta molécula es capaz de potenciar las respuestas específicas de anticuerpos de clase IgG, en detrimento de la clase IgE, por lo que se está ensayando su incorporación, como coadyuvante, en vacunas desensibilizadoras frente a alérgenos polínicos [Drachenberg *et al.*, 2001]. El MPL inicia la serie de agonistas del TLR4, a la que se incorpora ahora un análogo sintético del lípido A, denominado AGPs (“aminoalkyl-glucosaminide-4-phosphates”) [Baldrige, 2004], capaz de estimular de forma no específica la resistencia a un amplio rango de infecciones, así como de actuar como coadyuvante de vacunas, incluyendo vacunas con antígenos tumorales.

Diversas lipoproteínas bacterianas son mitogénicas para linfocitos B, estimulan a los macrófagos y han mostrado poseer actividad coadyuvante

de la respuesta inmune. TLR1, TLR2 y TLR6 han sido caracterizados como receptores para lipoproteínas [Tai *et al.*, 1994; Edinger *et al.*, 1994]. La actividad biológica de las lipoproteínas de la pared celular de bacterias Gram-negativas reside en el extremo amino-terminal, que incluye la parte lipídica (ácidos grasos unidos al resto de la molécula por enlaces éster), y se conserva en lipopéptidos obtenidos por degradación proteolítica de la proteína y en lipopéptidos sintéticos [Edinger *et al.*, 1994]. Actualmente se investigan derivados sintéticos tipo triacil-lipopentapéptido para obtener coadyuvantes mejorados.

El DNA procariótico es un inmunoestimulador, y se ha comprobado que la presencia de dinucleótidos no metilados de citosina y guanina (CpG) es necesaria para esta actividad. Las secuencias que contienen CpG son reconocidas por TLR9 [Takeda *et al.*, 2003]. Dos oligodesoxinucleótidos, conteniendo CpG, y unidos entre sí por los extremos 3', constituyen un inmunómero, con potente actividad inmunomoduladora, y capaces de desviar la respuesta específica, del perfil T<sub>H</sub>2 al T<sub>H</sub>1, lo que les convierte en candidatos para coadyuvantes en vacunas desensibilizadoras frente a alérgenos [Kandimalla *et al.*, 2003].

Diversos productos del metabolismo microbiano poseen propiedades inmunomoduladoras [Ruiz-Bravo *et al.*, 1998]. El dextrano (una cadena de poliglucosa que se inicia en una fructosa) es un EPS ("extracellular polymeric substance") bacteriano, mitógeno para linfocitos B y estimulador de macrófagos. El lentinano es un polisacárido fúngico que estimula a los macrófagos, induciendo la liberación de IL-1 y factores leucopoyéticos. AM3 (glicofosfopeptical) es un polisacárido fúngico (glucomanano de *Candida utilis*) conjugado a un péptido y adsorbido en una matriz de sulfato cálcico, que parece modular la actividad de los macrófagos, deprimiendo la producción de las citocinas proinflamatorias IL-1 y TNF- $\alpha$ , pero estimulando la capacidad para fagocitar

microorganismos y matarlos en los fagosomas; se emplea como inmunorrestaurador y es capaz de inducir citokinas antivirales en cultivos de leucocitos periféricos. El ácido algínico (polímero de glucurónico y manosórico) producido por algas pardas es un coadyuvante que potencia la respuesta de anticuerpos de la clase IgG, por lo que se ha utilizado, conjugado con alérgenos, para la elaboración de vacunas desensibilizantes.

Además de los BRMs de origen microbiano, otras moléculas han mostrado también actividad inmunomoduladora con aplicación farmacológica [Ruiz-Bravo *et al.*, 1998]. Es el caso de los derivados imidazólicos, como la isoprinosina (metisoprinol), que tiene actividad estimuladora de macrófagos, linfocitos T y células NK, y, a dosis altas, acción antiviral (por interferir con la síntesis de RNA viral); se está utilizando en la terapia de la panencefalitis esclerosante subaguda (una rara pero muy grave complicación del sarampión).

También hemos de mencionar aquí otros coadyuvantes de la inmunidad, como los liposomas, que son vesículas limitadas por una o varias bicapas lipídicas [Ruiz-Bravo *et al.*, 1998]. Los liposomas pueden incorporar antígenos en forma muy inmunógena. La inserción de proteínas portadoras de manosas facilita la unión a un PRR de la superficie de los macrófagos (el receptor para manosa o CD206), que procesarán el antígeno y presentarán los correspondientes oligopéptidos a los linfocitos T<sub>H</sub>. La composición de los lípidos del liposoma es crucial en lo que se refiere a sus efectos inmunoadyuvantes. Se han realizado ensayos clínicos de vacunas vehiculizadas en liposomas, incluyendo en algunos casos citokinas (como IL-2) en el vehículo, para reforzar el efecto inmunopotenciador. Las siglas ISCOM (“immunostimulating complexes”) designan a unas microvesículas de un saponósido triterpénico de origen vegetal, denominado Quil A, que pueden incorporar antígenos en forma muy inmunógena. Algunos ensayos clínicos han mostrado la eficacia de ISCOM como coadyuvante de vacunas,



habiéndose señalado su capacidad para conseguir que el antígeno incorporado sea procesado por la vía de los antígenos endógenos (como si hubiese sido sintetizado en el interior de las células presentadora), lo que permite inducir una respuesta específica de CTL.

## 1.2. INMUNOMODULACIÓN POR AGENTES ANTIMICROBIANOS.

En términos generales, el tamaño molecular de los agentes antimicrobianos es insuficiente para que se comporten como antígenos. Es bien conocido que algunos agentes antimicrobianos pueden actuar como haptenos, moléculas específicas pero carentes de inmunogenicidad, que, sin embargo, en caso de combinarse con macromoléculas (proteínas del propio organismo) que actúen como portadores (“carrier”), son capaces de inducir respuestas específicas, frecuentemente perjudiciales para el individuo tratado (reacciones alérgicas).

Desde hace tiempo se viene prestando atención a otro tipo de interacción entre los agentes antimicrobianos y el sistema inmune, consistente en la capacidad de aquellos para modificar, de forma no específica, los mecanismos inespecíficos y específicos de la inmunidad. En algunos casos la modificación de la relación patógeno-hospedador por agentes antimicrobianos puede contribuir a los efectos antimicrobianos; por otra parte, hay que considerar las condiciones previas del hospedador y, especialmente, de su sistema inmune, que puede resultar determinante a la hora de elegir agentes que, aparte de sus acciones antimicrobianas, tengan repercusiones sobre los mecanismos inmunitarios. Estas propiedades inmunomoduladoras de los agentes antimicrobianos son el objeto de estudio en el presente trabajo, y los correspondientes efectos y mecanismos de acción serán revisados a continuación.

### 1.2.1. Mecanismos de inmunomodulación por agentes antimicrobianos.

Jiménez-Valera *et al.* [1997] señalan tres formas por las que los agentes antimicrobianos pueden ejercer influencias no específicas sobre el sistema inmunitario:

- Actuando directamente sobre las células del sistema inmunitario. Estos efectos pueden investigarse tanto *in vivo* (tratando animales de experimentación con el agente antimicrobiano) como *in vitro* (incorporando el agente a cultivos de células inmunitarias).
- Induciendo cambios en la superficie de los microorganismos patógenos, haciéndolos más susceptibles a los mecanismos efectoros del sistema inmune. Para investigar esto es necesario diseñar sistemas *in vitro*, en los que los microorganismos son incubados previamente en presencia de dosis subinhibitorias (inferiores a la concentración mínima inhibitoria o CMI) del agente, y posteriormente se someten a la acción de mecanismos efectoros (fagocitosis, lisis por complemento).
- Causando la lisis de microorganismos, ya sean indígenas (miembros habituales de la microbiota intestinal) o patógenos (en situaciones de infección), y, en consecuencia, determinando la liberación de fracciones microbianas con actividad inmunomoduladora. Este mecanismo puede sustentarse detectando las fracciones microbianas activas *in vitro* (en sobrenadantes de suspensiones bacterianas sobre las que ha actuado el agente) o *in vivo* (p.e., en la sangre de animales, infectados experimentalmente o no, y tratados con el agente en cuestión).

### 1.2.2. Efectos de distintos grupos de agentes antibacterianos sobre el sistema inmune.

En la **Tabla 2** se presenta una clasificación de las principales familias de agentes antibacterianos. A continuación, se describen los efectos inmunomoduladores aportados por la revisión bibliográfica.

#### 1.2.2.1. Agentes $\beta$ -lactámicos.

Este amplio grupo de agentes antibacterianos, caracterizados por poseer un anillo  $\beta$ -lactámico, se subdivide en 4 familias [Yao y Moellering, 1999]:

- Penicilinas, en las que un anillo tiazolidínico se une al anillo  $\beta$ -lactámico (lo que se puede considerar el resultado de la condensación de una L-cisteína y una D-valina), que a su vez va unido a una cadena acilada (grupo amido) cuya naturaleza influye de forma determinante en la actividad antibacteriana de la molécula resultante [Davis, 1990]. Junto a la clásica bencil-penicilina o penicilina G, producto natural de *Penicillium notatum* descubierto en 1929 por Fleming, figuran los subgrupos de penicilinas semisintéticas: resistentes a penicilinasas (meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina), aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina) y ureidopenicilinas (mezlocilina, piperacilina).
- Cefalosporinas, constituídas por un anillo de dihidrotiazina unido al anillo  $\beta$ -lactámico. De acuerdo con los espectros de acción (sucesivamente ampliados) se conocen hasta cuatro generaciones de cefalosporinas: 1ª generación, de espectro reducido a bacterias Gram-positivas y pocas Gram-negativas (cefalotina, cefazolina, cefapirina, cefalexina); 2ª generación, con espectro expandido frente

a bacterias Gram-negativas (cefaclor, cefamandol, cefuroxima, cefoxitina, cefmetazol); 3<sup>a</sup> generación, de amplio espectro (cefixima, cefotaxima, ceftriaxona); y 4<sup>a</sup> generación, cuyo amplio espectro ha sido expandido frente a microorganismos productores de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas inducibles (cefepima, cefpiroma).

- Monobactámicos, moléculas con un único anillo, el  $\beta$ -lactámico, al que se unen cadenas laterales; el único agente con uso clínico es el aztreonam, de espectro reducido a bacterias Gram-negativas aeróbicas (produzcan o no  $\beta$ -lactamasas).
- Carbapenems, cuya estructura básica es similar a la de las penicilinas, pero sustituyendo el azufre del heterociclo tiazolidínico por un carbono; poseen el espectro más amplio de los  $\beta$ -lactámicos, ya que actúa sobre bacterias Gram-positivas (con la excepción de los estafilococos resistentes a meticilina) y Gram-negativas, aerobias y anaerobias. Los dos compuestos utilizados en clínica son el imipenem (asociado a la cilastatina, que inhibe la dihidropeptidasa renal, la cual inactiva al imipenem) y el meropenem.

Todos los agentes  $\beta$ -lactámicos comparten un mecanismo de acción similar: se unen a proteínas de la superficie bacteriana, denominadas PBP's (de "penicillin-binding proteins"), inhibiendo sus actividades enzimáticas (necesarias para la síntesis del peptidoglicano), lo que tiene como consecuencia la muerte de la bacteria, ya sea por fenómenos osmóticos o por autólisis [Mensa *et al.*, 1997; Yao y Moellering, 1999]. Por tanto, son agentes bactericidas, que actúan sobre bacterias en fase de crecimiento [Mensa *et al.*, 1997]. Dado que algunas moléculas de este grupo ven limitadas sus excelentes cualidades antimicrobianas y farmacológicas por su susceptibilidad a enzimas bacterianas que rompen el anillo  $\beta$ -lactámico (denominadas, por ello,  $\beta$ -lactamasas), se ha propuesto su uso clínico

asociadas a agentes inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, como son el ácido clavulánico, el sulbactam o el tazobactam. Las asociaciones amoxicilina/clavulánico, ticarcilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam y piperacilina/tazobactam amplían los espectros respectivos que poseen las correspondientes penicilinas [Mensa *et al.*, 1997].

**Efectos sobre fagocitos y citokinas proinflamatorias:** La inducción de citokinas proinflamatorias, por imipenem [Nuñez *et al.*, 1989] y cefalosporinas (cefalexina, cefamandol, ceftazidima) [Tufano *et al.*, 1992], ha sido demostrada desde hace años. Algunos trabajos han demostrado efectos estimuladores, sobre la actividad fagocítica y la producción de IL-1 por macrófagos peritoneales, ejercidos por antibióticos  $\beta$ -lactámicos como imipenem [Ortega *et al.*, 1997] y aztreonam [Ortega *et al.*, 1999]. La asociación amoxicilina/clavulánico incrementa la producción de IL-1 e IL-8 por neutrófilos humanos estimulados con LPS [Reato *et al.*, 1999]. Globalmente, Pierce *et al.* (1995) estiman que los agentes  $\beta$ -lactámicos, *in vitro*, ejercen efectos variables sobre el metabolismo oxidativo de los neutrófilos, medido por quimioluminiscencia. En efecto, algunos son capaces de inhibir la mieloperoxidasa de los neutrófilos, o de acelerar la detoxificación de los radicales oxidantes producidos por estos leucocitos en el curso de la fagocitosis [Labro, 2000]. De modo similar, hay descripciones contrapuestas sobre la modulación de la producción de GM-CSF por diversos tipos de células: la cefodizima estimula su producción [Pacheco *et al.*, 1994], pero otras cefalosporinas lo deprimen [Lenhoff y Olofsson, 1996].

**Efectos sobre la inmunidad específica:** Una referencia clásica la constituye el trabajo de Gillissen [1982], quien examinó los efectos de 10 cefalosporinas, administradas a dosis usadas en clínica, sobre la respuesta de anticuerpos específicos en ratones inmunizados con hematíes de cordero; los resultados (potenciación de la respuesta cuando se administraron dosis únicas, supresión cuando los animales recibieron series

de tres dosis) resaltaron la importancia de la pauta de administración y pusieron de manifiesto la capacidad inmunomoduladora de estos agentes.

**Tabla 2.** Clasificación de antibacterianos.

Mecanismo de acción	Diana	Clase	Agentes
Inhibición de la síntesis de los peptidoglicanos y estimulación de autolisinas bacterianas	Proteínas de unión a la penicilina	β-lactámicos: Penicilinas	Penicilina-G, amoxicilina, meticilina, carbenicilina.
		Cefalosporinas	Cefalotina, cefotaxima, ceftriaxona, cefoxitima.
		Carbapenems	Imipenem.
		Monobactámicos	Aztreonam
Inhibición de la síntesis de los peptidoglicanos	D-Ala-D-Ala	Glicopéptidos	Vancomicina.
	Piruviltransferasa	Fosfomicina	Fosfomicina.
Alteración de la membrana bacteriana	Lipopolisacáridos y fosfolípidos	Polimixina	Polimixina B, polimixina E.
Inhibición de la síntesis del ácido micólico	Proteína transportadora de la acil-reductasa	Isoniazida	Isoniazida.
Inhibición de la replicación del DNA	DNA girasa	Quinolonas 1° quinolonas Fluorquinolonas Desfluoroquinolonas	Ácido nalidíxico. Ciprofloxacino, moxifloxacino. Garenoxacino.
	DNA	Metronidazol	Metronidazol.
	Enzimas para la producción del tetrahidrofolato	Sulfonamidas y Trimetopim	Trimetoprin sulfametoxazol.
Inhibición de la transcripción	RNA polimerasa	Rifampicina	Rifampicina.
Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 30S ribosomal	Aminoglicósidos	Estreptomina, kanamicina, gentamicina.
		Tetraciclinas	Doxiciclina, miociclina.
		Macrólidos	Eritromicina, claritromicina, roxitromicina.
	Subunidad 50S ribosomal	Ketólidos	Telitromicina.
		Streptograminas	Quinupristin-dalfopristina.
		Oxazolidinonas	Linezolina.
		Lincosaminas	Clindamicina.
	Cloranfenicol	Cloranfenicol.	

Los efectos supresores de la piperacilina y, sobre todo, de la mezlocilina *in vivo* han sido mostrados por Roszkowski *et al.* [1985<sup>b</sup>]: depresión de la respuesta de anticuerpos frente a hematíes de cordero, de la linfoproliferación en respuesta a mitógenos y de la hipersensibilidad retardada a la oxazolona. Sin embargo, cefodizima es un potente estimulador de la proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos y de la producción de anticuerpos [Van Vlem *et al.*, 1996]. Asimismo, la capacidad para producir IL-2 está incrementada en los linfocitos de ratones tratados con aztreonam [Ortega *et al.*, 2000] y de seres humanos tratados con cefotaxima [Bessler *et al.*, 2000].

**Modificación de la superficie bacteriana:** Frieling *et al.* [1997] han comprobado efectos diferentes de agentes como cefuroxima e imipenem, sobre *Escherichia coli*; las bacterias muertas por la cefalosporina incrementaron su capacidad para estimular la producción de citokinas proinflamatorias por leucocitos periféricos, mientras que lo contrario ocurrió con las muertas por el imipenem. Estas diferencias también se extienden a la facilidad de ingestión por los fagocitos: Yokochi *et al.* [2000] observan que los largos filamentos inducidos en *Pseudomonas aeruginosa* por la ceftazidima son difíciles de fagocitar por macrófagos peritoneales, mientras que las formas redondeadas que la misma bacteria produce en presencia de imipenem son fagocitadas muy fácilmente. Por su parte, Cuffini *et al.* [1998] señalan que la asociación amoxicilina/clavulánico incrementa la susceptibilidad de una cepa de *Streptococcus pneumoniae*, resistente a la penicilina, a la fagocitosis y muerte intracelular por neutrófilos.

**Liberación de fracciones bacterianas:** Van Langevelde *et al.* [1998] han mostrado que los agentes  $\beta$ -lactámicos imipenem y cefamandol inducen la liberación de ácido lipoteicoico y fragmentos de peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*; los sobrenadantes que contienen estas fracciones



son, a su vez, estimuladores de los leucocitos humanos de sangre periférica, induciendo la producción de TNF- $\alpha$  e IL-10.

#### 1.2.2.2. Aminoglicósidos.

La estructura de los aminoglicósidos contiene un anillo aminociclitol (ciclohexitol con restos amino) unido (por uniones glicosídicas) a dos o más azúcares (uno de los cuales, al menos, debe ser un aminoazúcar) [Davis, 1990]. Se trata de moléculas policatiónicas, que se unen a polianiones de la superficie bacteriana, como el LPS de las bacterias Gram-negativas, para penetrar por procesos de transporte activo [Mensa *et al.*, 1997]. La acción bactericida de los aminoglicósidos se debe a su capacidad para unirse irreversiblemente a la subunidad 30 S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis proteica [Yao y Moellering, 1999]. Dentro de este grupo figuran moléculas de origen natural (producidas por actinomicetos), como estreptomicina, neomicina, kanamicina, tobramicina y gentamicina; y productos semisintéticos, como la amikacina (derivada de la kanamicina) [Yao y Moellering, 1999]. Son activos sobre bacterias Gram-negativas en condiciones aerobias y sobre algunas bacterias Gram-positivas, como *S. aureus* y micobacterias [Mensa *et al.*, 1997; Yao y Moellering, 1999].

*Efectos sobre fagocitos y citokinas proinflamatorias:* Hay escasas evidencias experimentales al respecto, lo que posiblemente se deba a que estos agentes no se concentran en el interior de las células (de hecho, aminoglicósidos como la gentamicina se utilizan en ensayos de fagocitosis para eliminar las bacterias extracelulares) y no tienen, por tanto, posibilidades de alcanzar niveles intracelulares que puedan interferir con las funciones de la célula. En el trabajo *in vitro* de Pierce *et al.* [1995], los aminoglicósidos mostraron efectos inhibidores sobre el metabolismo oxidativo de los neutrófilos, con la notable excepción de la estreptomicina (que resultó potenciadora), pero las dosis usadas eran superiores a las

concentraciones plasmáticas obtenidas en clínica. Según Baronia *et al.* [1998], la amikacina presente en formulaciones tópicas no altera la respuesta de los monocitos a factores quimiotácticos del suero, pero induce la liberación de PDGF (“platelet-derived growth factor”), TGF (“transforming growth factor”) y TNF- $\alpha$  por estas células, lo que se traduce, globalmente, en un efecto estimulante sobre el proceso de cicatrización de heridas.

*Efectos sobre la inmunidad específica:* También en este apartado la bibliografía es muy escasa. Destaca la aportación de Roszkowski *et al.* [1985<sup>b</sup>], señalando el efecto supresor del tratamiento de ratones con amikacina sobre las respuestas de células formadoras de anticuerpos (IgM e IgG) frente a hemátis de cordero y de hipersensibilidad retardada a la oxazolona.

*Modificación de las propiedades inmunomoduladoras de bacterias:* En su estudio comparativo ya citado, Frieling *et al.* [1997] estimularon leucocitos de sangre periférica con cultivos de *E. coli* muertos por calor o por diversos agentes antimicrobianos, encontrando que las bacterias tratadas con amikacina indujeron mayores niveles de IL-1 e IL-6 que las muertas por calor.

### 1.2.2.3. Macrólidos.

La estructura química que caracteriza a los macrólidos es un anillo macrolactónico de 14 (eritromicina, claritromicina, roxitromicina), 15 (Azitromicina) o 16 (espiromicina, josamicina) átomos de carbono, unido a dos azúcares [Mensa *et al.*, 1997]. Esta estructura es un caso particular dentro de las moléculas conocidas como poliketidos, sintetizadas por actinomicetos y hongos mediante condensación de ácidos carboxílicos pequeños como el acético, siendo característica de ellas la presencia de

múltiples grupos carbonilos o hidroxilos separados por un átomo de carbono [Katz y Donadio, 1993; Hutchinson y Fujii, 1995]. Los macrólidos son antimicrobianos de amplio espectro, de acción generalmente bacteriostática, aunque a dosis altas pueden ser bactericidas; actúan inhibiendo la síntesis proteica, porque se unen reversiblemente al componente 23 S de la subunidad 50 S del ribosoma bacteriano, bloqueando la translocación de la cadena polipeptídica nascente [Yao y Moellering, 1999]. Es interesante resaltar que los macrólidos son concentrados por los fagocitos, alcanzando concentraciones intracelulares entre 10 y 150 veces mayores que las extracelulares, según el agente de que se trate [Mensa *et al.*, 1997]; esta acumulación intracelular es importante en lo que se refiere a la acción antimicrobiana sobre microorganismos intracelulares, pero también debe ser considerada como un componente principal de la capacidad de estos agentes para modificar la capacidad de respuesta de células implicadas en la inmunidad.

*Efectos sobre fagocitos y citokinas proinflamatorias:* Aunque hay algunos resultados contradictorios al respecto [ver la revisión de Jiménez-Valera *et al.*, 1997], recientemente se han acumulado numerosas evidencias sobre los efectos inhibidores de los macrólidos sobre diversas funciones de los fagocitos, resaltando su efecto inhibidor en la producción de radicales oxidantes por células estimuladas y en la producción de citokinas proinflamatorias. Estudios sobre la relación estructura-actividad han demostrado que sólo los derivados de la eritromicina A afectan a la explosión oxidativa fagocítica de una forma dependiente del tiempo y la dosis [Abdelghaffar *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1996]. Además, estos agentes estimulan de forma directa la exocitosis por neutrófilos [Abdelghaffar *et al.*, 1996]. Los macrólidos interfieren en la producción de citokinas *in vitro* [Labro, 1998], generalmente disminuyendo la producción de citokinas proinflamatorias por fagocitos estimulados, mientras que se incrementa la producción de la citokina antiinflamatoria IL-10 [Kawasaki *et al.*, 1998]. Los estudios *in vivo* han mostrado que la azitromicina, a las dosis

clínicas usuales, no tiene efectos antiinflamatorios en las vías respiratorias de sujetos sanos expuestos a ozono [Criqui *et al.*, 2000], pero la eritromicina y la josamicina inhiben el daño tisular causado por la deposición intrapulmonar de inmunocomplejos, aparentemente por la inhibición de la liberación de citocinas como IL-1 y TNF- $\alpha$  [Tomooki *et al.*, 1999]. La modulación en la producción de citocinas proinflamatorias ha sido también observado en eosinófilos [Kohyama *et al.*, 1999] y en células no fagocíticas [Schultz *et al.*, 1998]. En términos generales, la supresión de la liberación de citocinas proinflamatorias, va acompañada por una disminución paralela de la expresión del RNA mensajero. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que la roxitromicina inhibe la producción de IL-1 y TNF- $\alpha$  por monocitos humanos [Suzaki *et al.*, 1999], así como la producción de metabolitos oxidativos por neutrófilos, inhibición que no se consigue evitar mediante el tratamiento de las células con citocinas como GM-CSF, IFN- $\gamma$  o las propias IL-1 y TNF- $\alpha$  [Vozifeh *et al.*, 2000]. Estos efectos de la roxitromicina son también demostrables *in vivo*, aunque para ello se requieren tratamientos largos (> 7 semanas) [Suzaki *et al.*, 1999]. Igualmente, se ha demostrado que la claritromicina inhibe diversas funciones de los neutrófilos (quimiotaxis, mecanismos microbicidas intracelulares) [Kadir *et al.*, 2000], y tiene un importante potencial de aplicaciones clínicas ya que suprime las reacciones inflamatorias locales y sistémicas debidas al trauma quirúrgico, por lo que puede utilizarse simultáneamente para prevenir complicaciones infecciosas y como antiinflamatorio [Woo *et al.*, 1999<sup>a</sup>]. Esta acción inhibidora de la claritromicina se extiende a la producción de citocinas por las células T<sub>H</sub>1 [Morikawa *et al.*, 2002]. La eritromicina inhibe la producción de metabolitos oxidativos por fagocitos [Pierce *et al.*, 1995], pero favorece la desgranulación de los neutrófilos, con lo que incrementa la liberación de péptidos antimicrobianos [Schultz *et al.*, 2000].

Estas propiedades de los macrólidos han promovido investigaciones sobre su posible uso como agentes antiinflamatorios, especialmente en

estados inflamatorios de la mucosa respiratoria [Iino *et al.*, 1992]. Una observación crucial al respecto ha sido la de que los macrólidos (y en concreto, la claritromicina) reprimen, en células de la mucosa bronquial humana, la transcripción del gen que codifica para IL-8, impidiendo la unión de la proteína activadora AP-1 a su sitio en la región del promotor de dicho gen [Abe *et al.*, 2000]. En el mismo sentido, Tamaoki [2004] recoge varias publicaciones que demuestran un efecto inhibitorio de macrólidos como eritromicina y claritromicina sobre la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, lo que significa que estos agentes son capaces de modular negativamente una vía de transducción de señales de activación muy importante en las células inflamatorias. La capacidad de macrólidos como eritromicina, claritromicina, azitromicina y roxitromicina para inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, la quimiotaxis e infiltración de neutrófilos en la mucosa de las vías respiratorias, y la secreción de moco, hace que se haya propuesto su uso en la terapia de enfermedades como panbronquiolitis difusa, fibrosis quística, asma, sinusitis crónica y bronquiolitis crónica [Siddiqui, 2004; Tamaoki *et al.*, 2004].

*Efectos sobre la respuesta inmune específica:* Las evidentes limitaciones introducidas en los modelos experimentales (dosis del agente antimicrobiano, duración del tratamiento, naturaleza del antígeno de prueba, clases de inmunoglobulinas medidas, etc.) hacen que la falta de actividad modificadora de la respuesta de anticuerpos descrita en los primeros estudios con ratones tratados con eritromicina y claritromicina [recogidos por Jiménez-Valera *et al.*, 1997] no constituya una evidencia definitiva en contra de la modulación de la inmunidad humoral por este grupo de agentes. Por ello, no es sorprendente que Sato *et al.* [1999] hayan descrito un efecto potenciador de la eritromicina sobre la respuesta de células T<sub>H</sub>1 a la inmunización de ratones con el DNA plasmídico que constituye una vacuna de DNA, lo que se traduce en un incremento de la producción de anticuerpos de la subclase IgG2a frente a los epítomos

codificados por la vacuna, así como de la producción de IFN- $\gamma$  por las células TH1 específicas para dichos epítomos y de la generación de linfocitos T citotóxicos; estos autores sugieren que el efecto potenciador del macrólido está mediado por la estimulación de la actividad de las células accesorias, presentadoras de antígeno.

Ciertamente, la capacidad de los macrólidos para modular la respuesta de las células T está bien fundamentada, aunque los factores implicados deben ser complejos: así, la adición de algunos macrólidos al medio de cultivo inhibe la linfoproliferación en respuesta a mitógenos [Morikawa *et al.*, 1994], pero el tratamiento *in vivo* puede incrementar la proliferación en respuesta al mitógeno de células T, concanavalina A [Konno *et al.*, 1992]. La importancia de la duración del tratamiento la han mostrado Konno *et al.*, en sucesivas publicaciones [1992, 1993]: el tratamiento de ratones con roxitromicina, de dos a cuatro semanas, estimula la producción de IL-2, pero si se prolonga seis semanas, el efecto es inhibitorio. La roxitromicina parece suprimir la respuesta de las células TH2, lo que incluye la inhibición de la secreción de IL-4 [Konno *et al.*, 1994]. Como esta respuesta es necesaria para la formación de anticuerpos de la clase IgE, se ha propuesto que la roxitromicina puede ser beneficiosa para el tratamiento del asma debida a la hipersensibilidad inmediata [Konno *et al.*, 1993]. Un aspecto importante del trabajo de Morikawa *et al.* [1994] es la observación de que la asociación de macrólidos y de agentes inmunosupresores como ciclosporina A o tacrolimus incrementa el efecto supresor sobre la proliferación de las células T, lo que puede tener relevancia en determinadas situaciones clínicas (receptores de transplantes alogénicos, enfermos con procesos inflamatorios).

**Liberación de fracciones bacterianas:** La eritromicina es uno de los agentes inhibidores de síntesis proteica de los que Van Langevelde *et al.* [1998] han demostrado que no favorecen la liberación de fracciones activas

(peptidoglicano, ácidos teicoicos) por *S. aureus*. Por tanto, este no parece ser uno de los mecanismos que expliquen la inmunomodulación por macrólidos.

*Modificación de la superficie bacteriana:* Se ha descrito que el tratamiento de *Haemophilus influenzae* con concentraciones subinhibitorias de azitromicina aumenta la opsonización dependiente de la activación del complemento [Bonnet y Van der Auwer, 1993]. Otro posible efecto del tratamiento de bacterias con macrólidos a dosis inferiores a los correspondientes valores de CMI consiste en incrementar la susceptibilidad de las bacterias fagocitadas a los mecanismos de muerte intracelular, como han demostrado Braga *et al.* [1998] con *S. aureus*, neutrófilos y el nuevo macrólido rokitamicina.

#### 1.2.2.4. Tetraciclinas.

Las tetraciclinas son poliketidos aromáticos (cuatro anillos condensados) producidos por actinomicetos [Hutchinson y Fujii, 1995]. Estos agentes entran en las bacterias por un proceso de transporte activo, que consume energía, y una vez dentro se unen a la subunidad ribosomal 30 S, donde bloquean el acceso del aminoacil-tRNA al complejo mRNA-ribosoma, inhibiendo la síntesis de proteínas [Yao y Moellering, 1999]. Sus efectos son, en general, bacteriostáticos [Mensa *et al.*, 1997]. Suelen agruparse, según sus parámetros farmacocinéticos, en tetraciclinas de vida media corta (< 9 h), como la propia tetraciclina, la clortetraciclina y la oxitetraciclina; de vida media intermedia (12 h), la demeclociclina; y de vida media larga (> 15 h), como doxiciclina y minociclina [Mensa *et al.*, 1997].

*Efectos sobre fagocitos y citocinas proinflamatorias:* Desde los primeros estudios sistemáticos sobre efectos de antimicrobianos en la

fagocitosis, se sabe que las tetraciclinas inhiben la quimiotaxis pero estimulan la ingestión de partículas por los fagocitos [Mandell, 1982]. En lo que se refiere a la formación de citokinas proinflamatorias, hay datos discrepantes entre la minociclina, que incrementa su producción por macrófagos estimulados con LPS [Kloppenburger *et al.*, 1996], y otros compuestos de este grupo (tetraciclina, doxiciclina), que la inhiben en situaciones tan extremas como un modelo experimental de choque por endotoxina [Milano *et al.*, 1997], y que de hecho se utilizan en clínica, en ciertos casos, como agentes antiinflamatorios [Lamster *et al.*, 1996; Solomon *et al.*, 2000]. Recientemente, Attur *et al.* [1999] han propuesto un mecanismo para esta acción antiinflamatoria, observando que la doxiciclina y la propia minociclina inhiben la producción de intermediarios de nitrógeno reactivo pero estimulan la de prostaglandina 2 por macrófagos estimulados con LPS. El uso de la minociclina en el tratamiento del acné se basa en su capacidad para inducir la liberación de un neuropéptido antiinflamatorio por los queratinocitos [Sainte-Marie *et al.*, 1999]. Por un mecanismo similar se justifica su aplicación terapéutica en periodontitis [Williams *et al.*, 2001]. Incluso se han documentado bases experimentales para proponer el uso de minociclina como agente terapéutico y antiinflamatorio en encefalomiелitis autoinmune y esclerosis múltiple [Popovic *et al.*, 2002]. La doxiciclina se utiliza en infecciones de la superficie ocular y en periodontitis, en cuya aplicación clínica se ha mostrado que son las propiedades antiinflamatorias de la molécula, administrada en dosis sub-antimicrobianas, las responsables del efecto terapéutico [Walker *et al.*, 2000].

**Efectos sobre la respuesta inmune específica:** La inmunomodulación por tetraciclinas afecta a la respuesta de anticuerpos. Woo *et al.* [1999<sup>b</sup>] han examinado la influencia de varios antimicrobianos sobre la respuesta de anticuerpos del ratón en tres modelos distintos de inmunización: por vía parenteral, con un antígeno timo-independiente; por vía parenteral, con un antígeno timo-dependiente; y a nivel mucosal, con una vacuna viva; los



resultados muestran que la doxiciclina ejerce un efecto supresor de la respuesta de anticuerpos específicos en los dos primeros casos y potenciador en el último. Los efectos antiinflamatorios de la doxiciclina, mencionados en el apartado anterior, se explican, al menos parcialmente, por su capacidad de inducir apoptosis en las células T activadas [Liu *et al.*, 1999].

La minociclina es un típico agente inmunomodulador, con efectos complejos sobre el sistema inmune. La observación de que esta molécula es capaz de mejorar los cuadros de artritis, hasta el punto de ser considerada dentro del arsenal terapéutico frente a este trastorno inmunopatológico [Choy y Scott, 1997], ha encontrado ya una convincente base experimental: la minociclina inhibe la proliferación de clones de células T sinoviales y su producción de IFN- $\gamma$  [Kloppenburg *et al.*, 1993], y deprime la producción de IL-2 por células T y la capacidad de respuesta de las propias células T a esta citokina [Kloppenburg *et al.*, 1995]. La complejidad de acción de la minociclina viene ilustrada por sus efectos distintos sobre células T, suprimiendo la producción de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$ , y sobre monocitos, estimulando la liberación de TNF- $\alpha$  y de IL-6 [Kloppenburg *et al.*, 1996]. Más todavía, se ha descrito un caso en el que el tratamiento con minociclina ha desencadenado un síndrome con fiebre, linfadenopatía, linfocitosis, eosinofilia, hepatitis y edema pulmonar, atribuido a la liberación masiva de citokinas, comportamiento que ha sido comparado al de un superantígeno [Macneil *et al.*, 1997].

#### 1.2.2.5. Fluoroquinolonas.

La denominación “quinolonas” incluye una serie de compuestos antimicrobianos que comparten una estructura básica, la 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, con dos anillos condensados en los que se pueden introducir diversas sustituciones originando varias subfamilias de

moléculas: derivados de la 4-quinolona, de la naftiridina, de la cinolina y de la piridopirimidina [Gobernado y Santos, 1988]. Las modificaciones químicas se asocian con cambios en el espectro de acción antimicrobiana, y así aquí también se habla de “generaciones” [Yao y Moellering, 1999]:

- *1ª generación:* corresponde a los compuestos más antiguos de este grupo, como son los ácidos nalidíxico (el primero, sintetizado en 1962), oxolínico y pipemídico, de espectro reducido a bacterias Gram-negativas, y que, en razón de su rápida eliminación por la orina, se utilizaron en la terapia de las infecciones urinarias.
- *2ª generación:* son las fluoroquinolonas, en las que la introducción de un átomo de flúor unido al carbono 6 del doble anillo quinolónico mejora las propiedades farmacológicas y amplía notablemente el espectro de acción (bacterias Gram-positivas y Gram-negativas); figuran en esta generación agentes de gran utilidad clínica, como son norfloxacino (la primera fluoroquinolona en aparecer, en 1978), enoxacino, ofloxacino, ciprofloxacino, fleroxacino, pefloxacino y lomefloxacino.
- *3ª generación:* corresponde a moléculas con mayor espectro de actividad (especialmente ampliada frente a cocos Gram-positivos), tales como esparfloxacino, grepafloxacino, moxifloxacino y trovafloxacino (este último retirado del mercado por su hepatotoxicidad).

Las quinolonas son agentes bactericidas, que inhiben la girasa de DNA o topoisomerasa II, con lo que se bloquea la replicación y reparación del DNA bacteriano; las moléculas de 3ª generación también inhiben las topoisomerasas de tipo IV [Yao y Moellering, 1999]. Aunque su afinidad por las enzimas eucarióticas es muy baja (de ahí su buen índice

terapéutico), hay que tener presente que estos agentes se concentran en el interior de los fagocitos, alcanzando niveles hasta 14 veces superiores a los del medio extracelular [Yao y Moellering, 1999].

*Efectos sobre fagocitos y citokinas proinflamatorias:* Según Roszkowski *et al.* [1985<sup>a</sup>], el ciprofloxacino aumenta la respuesta de quimioluminiscencia en neutrófilos humanos enfrentados a estafilococos sin opsonizar. El efecto estimulador de las quinolonas sobre fagocitos ha sido corroborado recientemente por Azuma *et al.* [1999]: *in vitro*, varias fluorquinolonas mostraron su capacidad para inhibir la quimiotaxis e incrementar la generación de anión superóxido en macrófagos. Se ha observado sinergismo significativo entre los radicales oxidantes incrementados y la actividad antibacteriana intracelular de varias fluoroquinolonas [Van Rensburg *et al.*, 1990]. Entre citokinas como G-CSF y ofloxacino se ha demostrado un efecto sinérgico para la actividad bactericida de neutrófilos [Kropec *et al.*, 1995]. Algunos autores han observado que altas concentraciones de ofloxacino y fleroxacino (25-100 mg/l) potencian la medida de fagocitosis por quimioluminiscencia, mientras que otras quinolonas (esparfloxacino, lomefloxacino, grepafloxacino, etc) la disminuyen significativamente [Kubo *et al.*, 1994]. Estudios complementarios del mismo grupo sugirieron que el incremento inducido por ofloxacino en la respuesta oxidativa por neutrófilos fue debida a una potenciación de la proteína-kinasa C (PKC) [Nagafuji *et al.*, 1993; Matsumoto *et al.*, 1995]. Un efecto potenciador similar en la explosión oxidativa de neutrófilos se ha visto con ofloxacino, fleroxacino, esparfloxacino, y levofloxacino en macrófagos de rata [Azuma *et al.*, 1999]. Todas las quinolonas, en mayor o menor grado, pero de forma significativa, alteran la quimiotaxis de macrófagos de rata de forma dependiente de la dosis. Los efectos de las quinolonas en la producción de citokinas por monocitos están ampliamente estudiados: A altas concentraciones, pefloxacino y ciprofloxacino disminuyen la producción de IL-1 por

monocitos estimulados con LPS, y ofloxacino y ciprofloxacino disminuyen la producción de TNF- $\alpha$ . Un efecto supresor se ha observado a concentraciones terapéuticas de trovafloxacino, en la síntesis de IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, GM-CSF, y TNF- $\alpha$ , por monocitos humanos estimulados con LPS [Khan *et al.*, 1998]. Estos efectos supresores se atribuyen a varios mecanismos, como la acumulación de AMP cíclico y la inhibición de la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B [Dalhoff y Shalit, 2003].

*Efectos sobre la respuesta inmune específica:* Al igual que ocurre en los fagocitos, las quinolonas se concentran en el citoplasma de las células inmunocompetentes, lo que puede traducirse en modificaciones de las funciones celulares [Gootz *et al.*, 1990]. Cuando se incuban linfocitos en presencia de ciprofloxacino, a concentraciones similares a las plasmáticas que se consiguen en clínica, se observa un incremento en la incorporación de timidina tritiada inducida por fitohemaglutinina A (PHA, mitógeno de células T) [Forsgren *et al.*, 1986]. La interpretación común de este hecho es que hay un incremento de la proliferación de las células T, pero en realidad lo que ocurre es que la base pirimidínica se acumula como consecuencia de la inhibición de la síntesis de pirimidinas por la ruta de novo [Forsgren *et al.*, 1987<sup>a</sup>]; en realidad, el resultado es el contrario: el ciprofloxacino *in vitro* bloquea la progresión de los linfocitos en el ciclo celular, así como la síntesis de inmunoglobulinas por células B [Forsgren *et al.*, 1987<sup>b</sup>]. Los primeros ensayos *in vivo* apuntaron a un efecto potenciador del ciprofloxacino sobre la respuesta de anticuerpos específicos en ratones inmunizados con hematíes de cordero [Roszkowski *et al.*, 1986], pero la situación es más compleja, ya que variando la pauta y la duración del tratamiento se ha podido poner de manifiesto una acción moduladora, en la que la producción de anticuerpos de la clase IgM se ve inalterada o potenciada, pero la de IgG se ve suprimida [Jiménez-Valera *et al.*, 1995]. La liberación de fracciones activas por la microbiota intestinal afectada por el agente de amplio espectro puede ser un componente importante en la

modificación de la respuesta de anticuerpos, así como en la supresión, asimismo observada, de las respuestas de hipersensibilidad retardada y de linfoproliferación en respuesta a mitógenos [Jiménez-Valera *et al.*, 1995]. El levofloxacino también inhibe la linfoproliferación en respuesta a PHA, aunque sorprendentemente estimula la producción de IL-2 [Yoshimura *et al.*, 1996]. Este efecto estimulador de la liberación de IL-2 ha sido igualmente observado con ciprofloxacino, pero la interpretación es que ocurre como consecuencia de un conjunto de mecanismos evocadores de la típica respuesta al estrés de las células de mamífero [Riesbeck *et al.*, 1998]. A nivel de la modulación de las vías intracelulares de transducción de señales, la superinducción de citocinas como IL-2 o IFN- $\gamma$  por fluoroquinolonas se asocia a una modulación positiva de la activación del factor de transcripción AP-1 [Riesbeck, 2002]. La aplicación de la metodología de micromatrices (“microarrays”) ha permitido establecer que la incubación de linfocitos humanos con ciprofloxacino incrementa la transcripción de más de un centenar de genes (entre ellos, genes de interleukinas, moléculas de adhesión, moléculas de vías de señalización intracelulares, reguladores del ciclo celular, moléculas relacionadas con la apoptosis), mientras que otros tantos resultaron reprimidos, panorama sorprendente que parece coherente con la hipótesis de una respuesta celular al estrés [Eriksson *et al.*, 2003].

### **1.2.3. Efectos de distintos grupos de antifúngicos sobre el sistema inmune.**

En la **Tabla 3** se presenta una clasificación de familias de agentes antifúngicos. No existen demasiados estudios sobre los efectos de estos agentes en el sistema inmunitario, en comparación con los antibacterianos. Sin

embargo, en los individuos con inmunodepresión grave, las infecciones fúngicas son graves y, aunque sean tratadas con éxito, tienen un riesgo aumentado de recidiva tras la retirada del tratamiento. Por este motivo parece interesante determinar en qué forma afectan estos grupos terapéuticos al sistema inmune deteriorado.

**Tabla 3.** Clasificación de los fármacos antifúngicos.

Mecanismo de acción	Clase	Agente
Alteran la permeabilidad de la membrana	Poliénicos	Anfotericina B, nistatina
Inhiben la síntesis del ergosterol	Alaninas Morfolina Azoles	Naftifina, terbinafina. Amorolfina Miconazol, ketoconazol, fluconazol, itraconazol
Interacción con los microtúbulos	Benzofuranos	Griseofulvina
Inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos	Pirimidinas	Fluocitosina
Inhiben competitivamente la quitina sintetasa	Polioxinas, nikkomicinas	
Inhiben la glucanosintetasa	Equinocardinas, papulocandinas	Caspofungina
Formación de complejos con los mananos	Benanomicinas, pradimicinas	

### 1.2.3.1. Derivados imidazólicos.

Los antifúngicos azólicos o azoles, son un grupo de fármacos fungistáticos sintéticos que se caracterizan por poseer un anillo imidazólico

que contiene dos o tres nitrógenos. En función de esta última característica los azoles se dividen en imidazoles y triazoles.

Todos ellos actúan inhibiendo la enzima 14-ademetilasa. Esta inhibición se produce al formarse un complejo del azol con una parte del citocromo P-450 del hongo. El bloqueo de esta enzima impide la conversión de lanosterol en ergosterol, que es un componente fundamental de la membrana citoplasmática del hongo, y produce una alteración de la permeabilidad de la membrana y acumulación de peróxidos que la dañan [Lumbreras *et al.*, 2003].

Los imidazoles significaron una considerable aportación al tratamiento de las infecciones fúngicas; sin embargo, la existencia de limitaciones relacionadas con su reducido espectro de actividad, su escasa biodisponibilidad y la posibilidad de aparición de efectos secundarios graves, restringieron su empleo.

Los triazoles poseen el mismo mecanismo de acción que los imidazoles, pero con un espectro antifúngico superior y menos efectos secundarios. En la actualidad existen tres triazoles utilizados como antifúngicos sistémicos: fluconazol, itraconazol y voriconazol, y varios más en fases avanzadas de desarrollo (posaconazol, ravuconazol, etc.).

**Efectos sobre fagocitos y citocinas proinflamatorias:** Del fluconazol existen más referencias que del resto de los antifúngicos de este grupo, entre otras razones por ser el más utilizado en el caso de infecciones sistémicas graves. Zervos *et al.* [1996] demostraron que el fluconazol aumenta la actividad bactericida de los neutrófilos *in vitro*. A este mecanismo se ha atribuido el efecto beneficioso del fluconazol en el shock séptico, puesto de manifiesto por Jacobs *et al.* [2003]. Las combinaciones de fluconazol con diversas citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-4 e IL-10)

incrementan la producción de radicales de nitrógeno activo y, en consecuencia, la actividad microbicida de los macrófagos humanos [Baltch *et al.*, 2001].

*Efectos sobre la respuesta inmune específica:* En general, los derivados azólicos tienen un moderado efecto inmunosupresor, excepto el fluconazol, que no parece poseer propiedades inmunomoduladoras [Yamaguchi *et al.*, 1993]. Los antifúngicos de este grupo disminuyen la secreción de IL-4 e IL-5, sin alterar la producción de IFN- $\gamma$  o IL-2; parece que la supresión de estas interleukinas se debe a la reducción de la señal de la 3'-5'-ciclo adenosina monofosfato [Kanda *et al.*, 2001]. Un trabajo reciente indica que el itraconazol inhibe la actividad de la proliferación de los linfocitos T *in vitro* [Cooper *et al.*, 2003]. El voriconazol no tiene efectos inhibidores sobre la maduración y activación de las células dendríticas ni efectos sobre la proliferación de los linfocitos T [Heather *et al.*, 2003].

#### 1.2.3.2. Alaninas.

Esta clase de antifúngicos sintéticos ejerce su acción mediante la inhibición de la escualeno epoxidasa, una enzima implicada en la síntesis del ergosterol. Son fármacos de gran afinidad por las enzimas fúngicas, que apenas muestran interacciones con las enzimas de los mamíferos. Existen dos alaninas comercializadas la naftilfina y la terbinafina. Solo en el caso de la terbinafina encontramos comercializada una presentación oral y puede que en un futuro sea considerada una alternativa terapéutica para las micosis sistémicas. No hemos encontrado bibliografía



relevante sobre sus posibles efectos inmunomoduladores.

#### 1.2.3.3. Pirimidinas fluoradas.

Flucitosina, fluorocitosina o 5-fluorocitosina es el único antifúngico perteneciente a la clase de las pirimidinas, la cual actúa sobre la síntesis de los ácidos nucleicos [Arikan, S. y Rex, J.H., 2003]. Este compuesto es un profármaco que debe ser metabolizado por las enzimas fúngicas para ser activo. La flucitosina penetra en el interior de la célula fúngica tras contactar con una enzima de membrana llamada citosina permeasa. Ya en el interior de la célula, la flucitosina es desaminada a 5-fluoruracilo, tras lo que se producen varias fosforilaciones que acaban de generar ácido 5-fluoruracilo, el cual se incorpora a la cadena de ARN, lo que ocasiona la producción de ARN aberrante. Además, este compuesto puede metabolizarse a ácido 5-fluordeoxiuracílico, que es un potente inhibidor de la timidilato sintetasa, enzima esencial para la síntesis de ADN. Estas acciones inhiben el crecimiento de las células fúngicas, pero no causan su muerte, por lo que la flucitosina es un compuesto fungistático [Cuenca *et al.*, 2002].

Las referencias sobre interacciones entre flucitosina y sistema inmune son muy escasas y relativamente antiguas. Se ha descrito ausencia de actividad moduladora sobre la capacidad de proliferación de linfocitos murinos [Roselle y Kauffman, 1978] y humanos [Roselle y Kauffman, 1980], así como sobre otros parámetros inmunitarios.

#### 1.2.3.4. Antibióticos.

##### 1.2.3.4.1. Antibióticos poliénicos.

Los polienos son moléculas macrólidas con cadenas

insaturadas que presentan un amplio espectro de actividad antifúngica. Se conocen más de doscientos compuestos dentro de esta clase, los cuales muestran varias características comunes. La primera de ellas es una escasa biodisponibilidad digestiva, lo que conlleva que no existan presentaciones orales de estos fármacos. La segunda es su baja solubilidad en agua, que crea problemas para tener formulaciones intravenosas. Y la tercera es su toxicidad, lo que obligó a detener el desarrollo farmacológico de casi todas estas moléculas. Empezaron a estudiarse a mediados del siglo XX y en la actualidad sólo perviven la anfotericina B y la nistatina.

La anfotericina B fue aislada en 1955 de un actinomiceto denominado *Streptomyces nodosus* y ha sido el fármaco más utilizado en el tratamiento de las infecciones fúngicas profundas. Por la experiencia acumulada sigue siendo considerado el patrón en la comparación de fármacos antimicóticos.

Su estructura química formada por una porción hidrófila, carbonos hidroxilados, y otra hidrófoba, lo convierten en una molécula anfipática responsable de su mecanismo de acción sobre las membranas celulares. Puede comportarse como fungicida o fungistático dependiendo de la sensibilidad del hongo y de la concentración de la anfotericina en el lugar de acción.

Su mecanismo de acción, se debe a la afección por los esteroides de las células eucariotas, pero tiene una mayor afinidad por el ergosterol de los

hongos que por el colesterol, que es el principal esteroide de las membranas plasmáticas de las células animales. Como consecuencia de esta unión se altera la permeabilidad de la membrana del hongo, aparece un poro, y se crea un canal iónico transmembrana; este hecho provoca una salida masiva de iones y la consiguiente destrucción de la célula fúngica. Así mismo existen otros mecanismos de acción colaterales, pero que son pocos conocidos. Se cree que su unión con esteroides intracelulares puede causar daños celulares. Además parece activar mecanismos oxidativos y determinadas funciones de los linfocitos, como la secreción de citocinas [Cuenca *et al.*, 2002].

Debido a su gran toxicidad, se han buscado numerosas formulaciones que buscan conservar la actividad de la anfotericina B, minimizando los efectos colaterales indeseables. En la actualidad contamos con nuevas formulaciones como:

- Anfotericina B liposómica: se encuentra comercializada como AmBisome®, el fármaco activo se encuentra incluido en los liposomas. Con esta formulación se consigue disminuir la toxicidad de la anfotericina B convencional manteniendo el mismo espectro de acción. Existen numerosos estudios comparativos en cuanto a la eficacia de la anfotericina B liposomal con la convencional quedando demostrado al menos una eficacia similar y un menor porcentaje de efectos adversos. No obstante su elevado coste ha limitado su uso [Walsh *et al.*, 2002].
- Complejo lipídico de anfotericina B: es un complejo formado por concentraciones casi equimoleculares de anfotericina B y lípido. Permite administrar dosis cinco veces superiores a la de la anfotericina convencional porque aumenta su tolerancia. Comercializada como Albecet®.

- Anfotericina B en dispersión coloidal: Complejo estable de anfotericina B y sulfato de colesterol en una relación 1:1 molar. Comercializada como Amphocil®.

La nistatina produce unos efectos tóxicos tan graves que no puede emplearse en infusión parenteral. Su mecanismo de acción es similar al de la anfotericina B. En el caso de la nistatina también encontramos una presentación liposomal, Nyostran®. Se encuentra actualmente en fase de evaluación, aunque los datos publicados obtenidos de modelos animales, así como algunos casos de tratamientos en humanos parecen confirmar una buena alternativa terapéutica [Cuenca y Rodríguez-Tudela, 2002].

*Efectos sobre fagocitos y citocinas proinflamatorias:* La anfotericina B convencional, a dosis bajas, tiene efectos estimuladores sobre los macrófagos, incrementando la quimiotaxis, la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular, la actividad fagocítica y el potencial microbicida intracelular debido a la formación de radicales de nitrógeno activo [Tohyama *et al.*, 1996; Rogers *et al.*, 2000; Reyes *et al.*, 2000]. A dosis altas, los efectos son de inhibición, lo que puede estar asociado a su capacidad para inducir apoptosis [Reyes *et al.*, 2000]. También es importante el tipo de célula afectada: en los neutrófilos, anfotericina B actúa como un antioxidante intracelular que inhibe la generación de radicales oxidantes antimicrobianos [Reyes *et al.*, 2000]. También es de suma importancia la formulación farmacéutica: la inducción de citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF y IL-12 es mayor en los tratamientos con anfotericina B convencional que con la formulación liposómica, la cual, en cambio, inhibe la apoptosis inducida por otros agentes [Reyes *et al.*, 2000].

*Efectos sobre la respuesta inmune específica:* Algunos estudios clásicos demostraron que la anfotericina B estimula la proliferación de linfocitos B *in vitro* en respuesta a mitógenos y deprime algunos parámetros

de inmunidad celular, como la hipersensibilidad de contacto, propiedades inmunomoduladoras que siguen presentes en derivados atóxicos del antifúngico [Roselle y Kauffman, 1980; Sarthou *et al.*, 1986]. Estudios posteriores han evidenciado que la anfotericina B ejerce efectos supresores sobre los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, lo que debe ser tenido en cuenta cuando se administre a pacientes inmunosuprimidos [Geginat *et al.*, 1999]. Este efecto ocurre tanto con la anfotericina tradicional como con la liposómica y depende de la dosis [Kretschmar *et al.*, 2001].

#### 1.2.3.4.2. Antibióticos no poliénicos.

Dentro de los antibióticos encontramos también de estructura no poliénica, como la griseofulvina, producida por varias especies de *Penicillium*, especialmente *P. griseofulvum*. Su mecanismo de acción se basa en impedir la reproducción del hongo porque interacciona con los microtúbulos, lo que provoca una interferencia en la formación del huso mitótico, por lo que afecta a las células en división. Aparte de esto existen muchas pruebas que demuestran que el fármaco se une al RNA, por lo que inhibe la síntesis de los ácidos nucleicos [Arikan y Rex, 2003].

La griseofulvina tiene especial afinidad por las células productoras de queratina, células de la piel, pelo y uñas, se fija a ellas con gran intensidad; de tal forma que a medida que va creciendo el nuevo tejido se hace resistente a la acción del hongo y se va eliminando el tejido infectado. Este es uno de los motivos por los que las tiñas son tediosas de curar, variando la duración del tratamiento entre semanas o meses, dependiendo de la velocidad de crecimiento del tejido infectado.

No se ha prestado atención a las propiedades inmunomoduladoras de la griseofulvina, a pesar de que hay evidencias experimentales sobre su capacidad para modular la expresión de moléculas superficiales implicadas

en las funciones de las células inmunitarias. La griseofulvina reduce la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase II inducida por tratamiento con IFN- $\gamma$ , sin afectar a la expresión de la molécula de adhesión ICAM-I [Tamaki *et al.*, 1992]. En una publicación más reciente, se extiende este efecto inhibitor a la expresión de VCAM-1 y E-selectina inducidas por TNF- $\alpha$ , confirmando la ausencia de efecto apreciable sobre ICAM-1 [Ashaina *et al.*, 2001].

#### 1.2.3.5. Equinocardinas.

La caspofungina es el primer representante de una nueva familia de antifúngicos, denominados equinocardinas, que se caracterizan por actuar en una diana fúngica, la pared del hongo, distinto de la del resto de los antifúngicos disponibles. La caspofungina es un lipopéptido cíclico semisintético con una cadena lateral N-acil, que fue sintetizado a partir de un producto de fermentación de *Glarea lozoyensis*, un hongo aislado en las riberas del río Lozoya. Actúa inhibiendo la síntesis de 1,3- $\beta$ -D-glucano, componente clave de la pared de la célula fúngica, lo que provoca inestabilidad osmótica e impide sus funciones de crecimiento y replicación. El 1,3- $\beta$ -D-glucano no está presente en las células de los mamíferos, lo que explicaría la escasa toxicidad del fármaco sobre las células humanas. La caspofungina supone una alternativa útil al tratamiento de diversas micosis profundas con anfotericina B, especialmente en especies intrínsecamente resistentes al fluconazol [Mora-Duarte *et al.*, 2002].

Aunque, al igual que otros agentes antifúngicos, se han publicado estudios de actividad de caspofungina frente a micosis sistémicas en modelos de ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida o por otros medios, no existen apenas estudios centrados en el posible potencial inmunomodulador de este agente, que actúa sinérgicamente con los macrófagos en el control de la infección por *Aspergillus fumigatus*; este

sinergismo, en cambio, no se ha observado con los neutrófilos [Chiller *et al.*, 2001].

#### **1.2.4. Efectos de los distintos grupos de agentes antivirales sobre el sistema inmune.**

Aparte de la pandemia del SIDA y sus implicaciones biomédicas y socioeconómicas, existe el convencimiento de que, en las sociedades desarrolladas, las infecciones virales vienen a adquirir, gradualmente, la importancia que hace años tuvieron las infecciones bacterianas. Por otra parte, las infecciones virales son, generalmente, más difíciles de tratar, aun teniendo en cuenta la creciente emergencia de resistencias ante los agentes antibacterianos. La investigación sobre agentes antivirales ha experimentado un gran impulso y, con seguridad, en los próximos años obtendremos nuevas moléculas que incrementen el arsenal terapéutico frente a estas enfermedades. En la **Tabla 4** se presenta una clasificación de los fármacos antivirales.

**La bibliografía sobre las interacciones entre agentes antivirales y sistema inmune es escasa, pese a que muchos de ellos inhiben funciones celulares y, por tanto, a priori, podría suponerseles un potencial inmunomodulador. A continuación, se revisan aspectos de los principales grupos de agentes antivirales sobre los que existe alguna información relativa a interacciones con la inmunidad.**

##### **1.2.4.1. Inhibidores de la descapsidación.**

Los derivados del adamantano son aminas tricíclicas que bloquean la descapsidación del virus. Tienen utilidad contra el virus influenza de tipo A. La amantadina se introdujo en 1966 y no fue muy utilizada debido a su limitado efecto, a los problemas sobre el sistema nervioso central y a la aparición de resistencias. La rimantadina se introdujo en clínica en 1994,

siendo su dosis necesaria aproximadamente la mitad que de amantadina, además de no presentar tantos problemas secundarios [Uriarte, 2001].

Un trabajo pionero sobre interacciones entre amantadina y sistema inmune mostró que este agente ejerce efectos inhibidores sobre los linfocitos T citotóxicos (células T CD8<sup>+</sup>) [Clark *et al.*, 1989]. Durante años, la amantadina se ha utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, sin conocer el mecanismo responsable de este efecto farmacológico. Recientemente, se ha comprobado que los linfocitos T de los enfermos de Parkinson presentan anomalías en la producción de IL-2 *in vitro*, defecto que es corregido por la amantadina [Wandinger *et al.*, 1999]. Adicionalmente, se ha observado que el tratamiento de larga duración con amantadina incrementa la proporción T CD4<sup>+</sup>/T CD8<sup>+</sup> [Tribl *et al.*, 2001].

**Tabla. 4.** Clasificación de los fármacos antivirales.

Mecanismo de acción	Agentes	Virus susceptibles
Inhibición de la adsorción	Péptidos de ICAM-1	<i>Rhinovirus</i>
Inhibición de la entrada (fusión)	Análogos de quimokinas	VIH
Inhibición de la descapsidación	Amantadina, rimantadina	<i>Influenzavirus</i>
Inhibición de la síntesis de RNA	Ribavirina	Hepatitis C
Inhibición de la síntesis de DNA	Análogos de nucleósidos: Aciclovir Análogos de pirofosfatos: Foscarnet	Herpesvirus
Inhibición de la retrotranscriptasa	Zidovudina Dideoxynucleósidos	VIH



Inhibición de la síntesis de proteínas	Interferones	Numerosos virus
Inhibición de la maduración de las proteínas	Inhibidores de la proteasa del VIH (Ritonavir, etc)	VIH
Inhibición de la salida de viriones hijos	Zanamivir	<i>Influenzavirus</i>

#### 1.2.4.2. Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos.

Figuran en este grupo dos tipos de agentes: diversos análogos de nucleósidos y un análogo de pirofosfato.

##### 1.2.4.2.1. Análogos de nucleósidos.

Los nucleósidos son componentes de los ácidos nucleicos, compuestos por un azúcar, ribosa o desoxirribosa según sea ARN o ADN, respectivamente, y con una base heterocíclica púrica o pirimidínica. Es fácil imaginar cómo los análogos de estos nucleósidos pueden interferir con los procesos de replicación y/o transcripción en los que están implicados.

El miembro más característico de este grupo es el aciclovir, cuyo descubrimiento tuvo un gran impacto porque resultó el primer inhibidor selectivo de los herpesvirus humanos. La diana molecular del aciclovir es la DNA-polimerasa viral, que confunde el trifosfato de aciclovir con dGTP y lo incorpora a la cadena de DNA viral que está formando. Como en su estructura falta el grupo hidroxilo en la posición 3', bloquea la posterior prolongación de la cadena de DNA, considerándose un terminador de cadena. La activación del aciclovir necesita tres fosforilaciones sucesivas, que realizan tres quinasas. La primera debe convertir el aciclovir en

monofosfato y es una timidina-kinasa viral, que está ausente en las células no infectadas; esta es la principal causa de la toxicidad selectiva del fármaco [Uriarte, 2001].

El aciclovir es la molécula “cabeza” de una familia de antivirales de gran importancia. Entre ellos figura el penciclovir, que tiene un perfil farmacológico parecido al aciclovir. El trifosfato de penciclovir tiene una vida media más larga que el aciclovir, por lo que su administración puede ser menos frecuente. Existen también los profármacos, con una biodisponibilidad mejorada. El valaciclovir tiene la ventaja que cuando se administra por vía oral, se hidroliza muy rápidamente en aciclovir y el aminoácido esencial L-valina, alcanzándose concentraciones plasmáticas de 3 a 5 veces superiores a las obtenidas con la administración del fármaco solo. En el caso del famciclovir, profármaco del penciclovir, es el primer aciclonucleósido con amplio espectro antiviral. Por conjugación estructural entre este compuesto y los fonatos se llega a una nueva clase de antivirales, los fosfonatos de aciclonucleósidos [Uriarte, 2001].

Las cepas de citomegalovirus carentes de timidina-kinasa son resistentes al aciclovir, ya que no ocurre la primera de las tres fosforilaciones necesarias para activar al fármaco. Sin embargo, otro representante de la familia, el ganciclovir, si es activo frente a estos virus, porque puede ser activado, alternativamente, por una fosfotransferasa viral [Swierkosz, 2003].

Aunque hay numerosas publicaciones sobre los efectos de estos fármacos en combinación con citocinas, o administrados a individuos inmunocomprometidos, lo cierto es que las interacciones con los mecanismos inmunitarios han recibido escasa atención. Cuando se administra de forma prolongada, el aciclovir puede provocar trombocitopenia, neutropenia y leucopenia [Grella *et al.*, 1998]. Aunque este efecto adverso está descrito en el propio prospecto del fármaco y se

considera en muy rara ocasión (menos 0.5% de los casos), tiene que ser tenido en cuenta en determinados pacientes. En cuanto al ganciclovir, una de sus mayores limitaciones es, precisamente, la depresión medular que produce. La neutropenia puede presentarse hasta en un 25-40% de los pacientes, trombocitopenia en el 20% y anemias en el 4%. Estas reacciones se agravan en el caso de pacientes con una reserva medular menor [Flórez *et al.*, 1999]. Obviamente, los efectos de los profármacos sobre el sistema inmune serán los mismos descritos para las moléculas activas en las que se convierten en el organismo.

A dosis altas, el aciclovir es tóxico para los linfocitos *in vitro*, y, selectivamente, para los linfocitos T *in vivo* [Poluektova *et al.*, 1996]. Un estudio realizado por Gavilán *et al.* [1999], indica que el aciclovir modula la respuesta linfoproliferativa inducida por el antígeno de citomegalovirus. Basándose en esta observación establecieron la hipótesis de que esta inmunomodulación podría estar relacionada con su efecto preventivo en la enfermedad por citomegalovirus de los pacientes con trasplante.

Del valaciclovir se ha descrito su capacidad para disminuir los niveles de células NK en el ser humano, por mecanismos independientes de su acción antiviral [Thomas *et al.*, 2004].

#### 1.2.4.2.2. Análogos de pirofosfato.

El representante de este grupo es el foscarnet, que puede ocupar el sitio de unión del pirofosfato en la DNA- o RNA-polimerasa, impidiendo por ello su función. El foscarnet inhibe la polimerasa viral 100 veces más que la polimerasa celular. Cuando el trifosfato de nucleótido se une a la polimerasa, el fragmento pirofosfato se rompe y el monofosfato se une a la cadena de ADN o al ARN que está en fase de polimerización. Si sobre la polimerasa no hay sitio para aceptar el pirofosfato porque ese sitio está

ocupado por el fármaco, no se produce la hidrólisis del pirofosfato y se bloquea la polimerización [Uriarte, 2001].

Con este fármaco, se han observado anemias en un 25% de los pacientes y granulocitopenias en el 17% de los casos [Flórez, 1999]. No se han recogido publicaciones sobre efectos inmunomoduladores, aunque abundan las referencias acerca de la reconstitución inmunitaria de enfermos cuyo sistema inmune estaba dañado por infecciones virales que responden al tratamiento antiviral.

#### 1.2.4.3. Inhibidores de la transcriptasa inversa.

Existen dos grupos de fármacos que inhiben la transcriptasa inversa viral: los nucleosídicos que poseen similitud estructural con los 2'-desoxinucleótidos naturales con los que compiten y los no nucleosídicos que no requieren activación previa y actúan directamente sobre la enzima.

##### 1.2.4.3.1. Inhibidores nucleosídicos.

Los inhibidores nucleosídicos de la retrotranscriptasa precisan ser fosforilados mediante enzimas celulares para pasar a la forma trifosfato, que ejerce la actividad inhibidora. De esta forma, por una parte compiten con los desoxinucleótidos naturales para unirse a la transcriptasa inversa y, por la otra, al ser incorporados en el ADN viral nuevamente sintetizado, actúan como terminadores de cadena.

La zidovudina fue el primer fármaco antirretroviral. El gran inconveniente es la toxicidad hematológica, la más común es la anemia que aparece en el 15-30% de los pacientes con enfermedad avanzada y altas dosis, disminuyendo al 10% y al 2% en los asintomáticos. Es frecuente también la aparición de macrocitosis, reversible al cesar el tratamiento. La neutropenia puede aparecer en el 50% de los casos, especialmente en dosis

altas, y la leucopenia en el 30%. Ocasionalmente aparece trombocitopenia, si bien es más común que el fármaco tenga efectos beneficiosos sobre la cifra de plaquetas. La pancitopenia y la aplasia medular son posibles aunque muy raras [Flórez *et al.*, 1999].

Como consideración general, hay dos perfiles distintos de efectos adversos dentro del grupo: zidovudina y, con menor intensidad, lamivudina, tienen toxicidad hematológica y gastrointestinal; didanosina, zalcitabina y estavudina presentan, en grados diferentes, riesgos de neuropatía periférica y pancreatitis. Por su parte, abacavir produce reacciones de hipersensibilidad.

Los estudios con tratamientos combinados con dos análogos de nucleósidos, como la zidovudina y didanosina, demostraron una eficacia superior a la monoterapia. Los regímenes con tratamiento antirretroviral de gran actividad son capaces de suprimir de forma rápida y prolongada la replicación viral, con lo que la carga viral (cantidad de virus en sangre, estimada a partir del número de copias de genoma viral por unidad de volumen de sangre) puede llegar a niveles indetectables [Resino *et al.*, 2002]; como consecuencia lógica, los recuentos de células T CD4<sup>+</sup> se elevan, pero este no es un efecto inmunomodulador, sino la consecuencia esperable del efecto antiviral. La lipodistrofia asociada a alteraciones en la producción de citokinas proinflamatorias, que algunos de estos fármacos, combinados con inhibidores de la proteasa, pueden causar, se comentará en el apartado 1.2.4.4.

#### 1.2.4.3.2. Inhibidores no nucleosídicos.

Los inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa tienen la peculiaridad de su estructura química, muy alejada de los nucleósidos antirretrovirales. Los dos disponibles actualmente en España son

nevirapina y el efavirenz. Estos fármacos no parecen tener resistencia cruzada con los derivados nucleosídicos (zidovudina, especialmente), aunque la resistencia frente a la propia nevirapina aparece de forma relativamente rápida, salvo que se utiliza asociado con otros antirretrovirales.

Estos fármacos inducen incrementos en los recuentos de linfocitos T CD4+, como han demostrado Clotet *et al.* [1996] para la loverida, pero, obviamente, no se trata de un auténtico efecto inmunomodulador, sino de la consecuencia del efecto terapéutico que disminuye la carga viral.

#### 1.2.4.4. Inhibidores de la maduración de proteínas.

Los inhibidores de la proteasa del HIV interfieren una etapa vital en el ensamblaje de nuevos viriones. Las proteínas codificadas por el gen *gag* se sintetizan como una poliproteína que debe ser hidrolizada, por una proteasa viral, en sus componentes individuales. Los inhibidores de la proteasa viral imitan la estructura química de los puntos de la cadena peptídica donde el enzima produce los cortes, bloqueando así la acción del enzima. La potencia antiviral es superior a la de los inhibidores de la transcriptasa inversa, pero son también más susceptibles a las resistencias [Swierkosz, 2003]. De los comercializados en España el indinavir sigue siendo la referencia desde el punto de vista de relación eficacia/riesgo. El ritonavir es igual de potente pero tiene una incidencia superior de efectos adversos, y el saquinavir, que fue el primer fármaco del grupo, es menos eficaz *in vivo* debido a su baja biodisponibilidad. La eficacia clínica de nelfinavir parece ser similar al indinavir y superior al saquinavir, en tanto que es mejor tolerado que ritonavir. También la incidencia de interacciones es menor que con ritonavir y saquinavir. Una de sus ventajas es que no parece existir resistencia cruzada con otros inhibidores de la proteasa o, en el caso de haberla, no parece que sea completa. El lopinavir es el último inhibidor de la proteasa comercializado en España, que presenta la

peculiaridad de haber sido formulado junto con el ritonavir. Esta asociación no responde a un planteamiento de tipo farmacodinámico sino farmacocinético. Lo que se ha buscado es la obtención de niveles séricos de lopinavir muy superiores a los que se obtendrían si el fármaco se administrara en solitario [Anónimo, 2003].

La utilización de la terapia antirretroviral de alta eficacia (HAART) se traduce en la reducción de la carga viral y un aumento de la cifra de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En España el empleo del HAART se inició en 1997 asociando inhibidores de la proteasa con otros fármacos antirretrovirales [Martín *et al.*, 2000].

El principal efecto adverso del HAART es el síndrome de lipodistrofia, al que se asocian niveles incrementados de citokinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6. Tanto los inhibidores de retrotranscriptasa como los de proteasa, que integran el HAART, participan de esta alteración en la producción de citokinas, a la que se atribuye la pérdida de adipocitos por inducción de apoptosis [Lagothu *et al.*, 2004]. Sin embargo, se ha descrito que inhibidores de proteasa como nelfinavir, ritonavir o saquinavir, inhiben la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B señalizada desde las vías de activación de los receptores "Toll-like", TLR-2 y TLR-4, lo que supondría un efecto antiinflamatorio beneficioso en el caso de los enfermos de SIDA con sobreinfección por bacterias que pueden inducir reacciones inflamatorias a través de estos receptores [Equils *et al.*, 2004].

## 1.3. ENFERMOS INMUNOCOMPROMETIDOS: INFECCIONES Y TRATAMIENTO.

### 1.3.1. Situaciones clínicas de inmunocompromiso.

Clásicamente, los déficits inmunitarios se clasifican en primarios o congénitos y secundarios o adquiridos [Jiménez *et al.*, 1998]. Las inmunodeficiencias primarias se deben, mayoritariamente, a la presencia de genes defectuosos que afectan negativamente al desarrollo del sistema inmune. Las secundarias acontecen en individuos inmunológicamente normales, que como consecuencia de un determinado incidente (exposición a agentes inmunosupresores, físicos, químicos o biológicos), padecen la inhibición de mecanismos inmunitarios, de forma reversible o irreversible.

#### 1.3.1.1. Inmunodeficiencias primarias.

Existe todo un espectro de inmunodeficiencias primarias, que va desde los déficits muy concretos, que afectan a un determinado mecanismo de la inmunidad, hasta fallos que, por ocurrir tempranamente en la ontogenia del sistema inmune, tienen efectos globales. Se incluyen en este apartado enfermedades debidas a defectos congénitos en mecanismos de la inmunidad no específica, como el sistema del complemento, la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos y las células fagocíticas y sus funciones; y aquellas causadas por deficiencias congénitas que afectan a la capacidad para desarrollar respuestas inmunes específicas. La información presentada se ha recogido de las siguientes fuentes generales: Arnáiz *et al.* [1997]; Hayward [1994]; y Jiménez *et al.* [1998].

*Déficits del sistema del complemento:* Cuando los genes que codifican una proteína componente del sistema del complemento son defectuosos, la repercusión sobre la inmunidad dependerá de la posición



que dicho componente ocupe en las vías de activación. Así, los defectos en la expresión de C1 (cualquiera de sus componentes), C4 o C2 determinarán el bloqueo de la activación por la vía clásica; si las fracciones afectadas son los factores B o D, se impedirá la activación de la vía alternativa; la fracción C3 tiene una posición crucial y su déficit bloquea la activación por cualquiera de ambas vías; cualquier deficiencia en las fracciones C5, C6, C7, C8 o C9 ocluye la vía efectora, evitando la formación del complejo de ataque a membrana. Los efectos biológicos de la activación del complemento (formación de las anafilotoxinas C3a y C4a y de la quimiotaxina y anafilotoxina C5a; opsonización de microorganismos por C3b) se verán afectados según el nivel bloqueado por cada déficit concreto. Debe considerarse también que algunas deficiencias afectan a moléculas reguladoras del sistema del complemento, como ocurre en el déficit del inhibidor de la activación de C1 (conocido como C1INH), que se traduce en activaciones espontáneas reiteradas de la vía clásica, con un cortejo de signos inflamatorios característicos de la patología conocida como “edema angioneurótico hereditario”; o los déficits de los factores I (que inactiva a la convertasa alternativa de C3) o H (cofactor sérico del anterior), que, al posibilitar la activación incontrolada de la vía alternativa, determinan un exagerado consumo de C3.

*Alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión:* Se han descrito casos en los que la expresión de CD18, que constituye la cadena  $\beta$  de las  $\beta$ 2 integrinas, está más o menos seriamente alterada. Si el defecto llega a impedir las interacciones entre estas integrinas y sus ligandos presentes en la superficie del endotelio activado (como ICAM-1, denominado CD54), se hace imposible la unión de los leucocitos al endotelio activado y su posterior salida del compartimento vascular para dirigirse, atraído quimiotácticamente, hacia focos inflamatorios tisulares.

*Deficiencias en la fagocitosis:* Entre las más conocidas figuran el llamado “síndrome del leucocito perezoso”, que afecta a la movilidad quimiotáctica de los fagocitos, y la “enfermedad granulomatosa crónica”, en la que las células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) carecen de alguna de las cuatro subunidades de NADPH-oxidasa (enzima necesaria para la generación de superóxido), lo que limita sustancialmente su capacidad microbicida, con el resultado de que muchos microorganismos fagocitados permanecen viables en el interior de los fagolisosomas. Algunas inmunodeficiencias primarias cursan con neutropenia debida a la formación de autoanticuerpos frente a antígenos de la superficie leucocitaria (ver el “síndrome hiper-IgM”, más adelante).

*Deficiencias que afectan a las células B:* Los defectos en la diferenciación y maduración de células B repercuten, en mayor o menor medida, en la capacidad para producir anticuerpos específicos en respuesta a los estímulos antigénicos. Las enfermedades que se reseñan son ejemplos de los diversos grados de afectación.

- Agammaglobulinemia de Bruton: Se debe a una mutación puntual en el gen *btk* que codifica la tirosina-kinasa de Bruton, y que se localiza en el brazo largo del cromosoma\_X. Esta enzima interviene en la transducción de señal desde el receptor de las células pre-B; su ausencia impide la maduración de las células pre-B (y posiblemente determine su eliminación por apoptosis). La enfermedad afecta a niños varones; las niñas pueden ser portadoras. Los enfermos tienen muy pocas o ningunas células B ni circulantes ni en el tejido linfoide (ausencia de centros germinales), y carecen de plasmocitos (en médula ósea hay células pro-B, pero muy pocas células pre-B con cadenas  $\mu$  intracitoplásmicas). Los niveles de inmunoglobulinas son indetectables o mínimos.

- **Inmunodeficiencia común variable:** Suele manifestarse entre los 10 y los 30 años, tras un periodo inicial de funciones inmunitarias normales, por lo que se la denomina ocasionalmente "inmunodeficiencia adquirida". Afecta a ambos sexos y la causa es desconocida; aparentemente, diversas alteraciones en la maduración de las células B pueden conducir a esta situación, pudiendo intervenir también células T con actividad supresora. Algunos enfermos carecen de células plasmáticas, otros poseen plasmocitos incapaces de secretar inmunoglobulinas (en general, no hay capacidad para realizar respuestas de anticuerpos). Todos los casos presentan niveles muy bajos de IgG sérica, a veces acompañados de déficits en IgM e IgA. Los recuentos de linfocitos B son normales, pero el fenotipo es inmaduro.
- **Deficiencia selectiva de IgA:** Es la inmunodeficiencia más frecuente, si bien la mitad de los casos pueden ser asintomáticos. Hay una cierta heterogeneidad: en algunos casos, hay total ausencia de IgA (los enfermos de este grupo pueden formar anticuerpos anti-IgA) mientras que en otros se trata de valores séricos inferiores a los normales. La causa de la inmunodeficiencia de IgA es desconocida: los recuentos de células B son normales, pero no hay (o hay muy pocos) plasmocitos productores de IgA. Es posible que haya un fallo a nivel de la cooperación de células T<sub>H</sub> (tal vez una inadecuada secreción de citocinas), que evite el cambio de isotipo a IgA.
- **Deficiencias selectivas de subclases de IgG:** Estos déficits son infrecuentes. No se conocen las causas. Las consecuencias dependen de la subclase afectada. Hay frecuentes asociaciones con otras inmunodeficiencias, tanto B como T.

- Síndrome hiper-IgM: Se trata de una inmunodeficiencia que cursa con hipogammaglobulinemia excepto para la clase IgM, que presenta niveles séricos elevados. Hay dos formas de esta enfermedad: una de ellas, de herencia ligada al sexo (los enfermos son varones) y otra, autosómica recesiva (que puede afectar a niñas). La forma ligada al sexo se debe a una mutación en el gen que codifica la proteína CD154, ubicado en el cromosoma X. CD154 se expresa en la superficie de las células T<sub>H</sub> activadas y es el ligando de CD40, presente en las células B. La interacción CD154/CD40 es necesaria para completar la activación de las células B e inducir el cambio de isotipo; en su ausencia, las células B sólo generan plasmocitos productores de IgM. Las células B de estos enfermos pueden ser activadas por agonistas de CD40. La forma autosómica recesiva se debe a una mutación que afecta a la vía de señalización que parte de CD40, por lo que, en este caso, las células B no responden a los agonistas de CD40. En el tejido linfoide de estos enfermos hay escasos folículos linfoides primarios, no hay centros germinales y no ocurre la maduración de afinidad (son frecuentes la esplenomegalia y, en general, una hiperplasia linfoide con alteraciones en la arquitectura tisular). Los recuentos de células B son normales (o incluso algo elevados). En algunos casos, entre las IgM circulantes hay autoanticuerpos dirigidos frente a células sanguíneas, especialmente frente a neutrófilos (lo que puede causar neutropenia).

*Deficiencias que afectan a las células T:* Dado el papel crucial de las células T<sub>H</sub> en los mecanismos de la inmunidad adquirida, los déficits de células T suelen afectar, no sólo a la llamada inmunidad celular, sino también a las respuestas de anticuerpos frente a antígenos

timodependientes. Las patologías más características se indican a continuación.

- Síndrome de DiGeorge: Es un defecto congénito debido a la falta de desarrollo de los sacos bronquiales 3º y 4º que, durante la embriogénesis (6ª a 12ª semana), deben originar timo, glándula paratiroides y estructuras cardiovasculares y faciales. Aunque no se han demostrado fallos genéticos concretos, son frecuentes determinadas alteraciones cromosómicas: trisomía 18 y deleciones en los cromosomas 10 y 22. Muchos casos son hereditarios, pero también influyen factores ambientales durante la gestación. Los recién nacidos presentan anomalías faciales y, como consecuencia de la ausencia de paratiroides, hipocalcemia con tetania (que aparece poco después del parto, al decaer la hormona paratiroidea materna); las alteraciones vasculares (arco aórtico anormal) pueden determinar insuficiencia cardíaca. El timo puede faltar por completo (aplasia), pero algunos enfermos presentan residuos de tejido tímico (hipoplasia), ocasionalmente ectópico, en cuyo caso hay una buena estructura tisular, con diferenciación cortico-medular y corpúsculos de Hassall. Los enfermos que sobreviven a las patologías neonatales no inmunitarias, desarrollan deficiencias de la inmunidad celular, cuya severidad depende del grado de hipoplasia tímica. En las formas graves, hay linfopenia, con pocos linfocitos T, que además, no responden a mitógenos. Muchos casos con hipoplasia terminan generando una inmunidad celular normal.
- Síndrome de Nezelof: Se debe a un fallo genético que afecta al desarrollo del timo y que se hereda de forma autosómica recesiva. Los enfermos presentan un timo pequeño, con alteraciones en su arquitectura (displasia tímica): mala

diferenciación córtico-medular, escasos timocitos, ausencia de corpúsculos de Hassall; el epitelio tímico es normal. Las pruebas de laboratorio revelan niveles normales (o elevados) de las cinco clases de inmunoglobulinas, células B normales o incrementadas; generación de centros germinativos; y linfopenia debida a la escasez de células T, cuyas respuestas están muy deprimidas, tanto *in vivo* (hipersensibilidad retardada) como *in vitro* (proliferación en respuesta a mitógenos).

***Inmunodeficiencias combinadas:*** Los fallos genéticos que afectan a las etapas tempranas de diferenciación de las células madres repercuten globalmente en los mecanismos inmunitarios, afectando a las funciones de las células B y T y, en su caso, también a las células fagocíticas. Entre estas graves inmunodeficiencias figuran una serie de patologías denominadas con las siglas SCID (de “severe combined immunodeficiency disease”).

- Inmunodeficiencia severa combinada (SCID) ligada al cromosoma X: Conocida con las siglas SCID T<sup>-</sup> B<sup>+</sup> NK<sup>-</sup>, esta es la más frecuente de las SCID (entre el 50 y el 60% de casos). Se debe a una mutación en el gen que codifica la cadena  $\gamma$  compartida por los receptores de una serie de interleukinas: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15. Esta cadena  $\gamma$  contribuye a incrementar la afinidad de los citados receptores por sus correspondientes citocinas, y además constituye la conexión entre ellos y la tirosina-kinasa JAK-3, que inicia la vía de señalización de los estímulos generados al ocupar las citocinas sus receptores. Se ha comprobado que, de todas las señales abortadas en estos enfermos, las determinantes de la enfermedad son las que corresponden a IL-7R (receptor de la IL-7), esenciales para el desarrollo de las células T, y a IL15-R, necesarias para el desarrollo de las células NK. Estos enfermos carecen de células T y NK, y sus células B presentan algunas

anomalías fenotípicas y funcionales. Sus timos carecen de diferenciación entre las zonas cortical y medular, no tienen corpúsculos de Hassal y contienen escasos precursores linfoides. Hay hipoplasia en los órganos linfoides periféricos.

- SCID de herencia autosómica recesiva: La enfermedad conocida como SCID T<sup>-</sup> B<sup>-</sup> NK<sup>+</sup> se debe a fallos en la recombinación de los fragmentos génicos V(D)J que genera la diversidad de receptores de células B y T. Al menos en algunos enfermos, se detectan alteraciones en las proteínas Rag-1 o Rag-2. Hay linfopenia, que afecta tanto a las células B como a las T, ausencia de desarrollo tímico, despoblación de los órganos linfoides secundarios, hipogammaglobulinemia y ausencia de inmunidad celular.
- SCID por déficit de adenosina-deaminasa (ADA): La ausencia de ADA determina la acumulación de productos tóxicos (deoxiadenosina y su trifosfato) en el desarrollo de las células B y T, lo que se traduce en linfopenia, con una presentación clínica similar a la anterior, pero generalmente no tan severa.
- SCID por déficit de purina-nucleótido-fosforilasa (PNP): El déficit de PNP también determina la acumulación en los linfocitos de productos tóxicos procedentes del metabolismo de las purinas, por lo que esta patología es similar a la anterior, aunque el déficit predominante es en la inmunidad celular.
- Disgenesia reticular: Es la inmunodeficiencia combinada menos frecuente, pero también la más grave, ya que se debe a un fallo, aún no caracterizado, en las células madre, que afecta tanto a los linajes linfoides (células B y T) como mieloides (neutrófilos y monocitos/macrófagos).

- Síndrome de Wiskott-Aldrich: En esta enfermedad hay respuestas anormales de las células B, con producción de autoanticuerpos, algunos de los cuales causan trombocitopenia, y de las células T. Es característico de esta enfermedad el que la inmunodeficiencia se acompañe de eczema y sangrados (usualmente intestinales).
- Ataxia telangiectasia: En esta enfermedad, la inmunodeficiencia (tanto humoral como celular) se acompaña de alteraciones neurológicas (ataxia) y telangiectasias (dilataciones capilares) en la conjuntiva ocular y la piel. Hay defectos citogenéticos en las células T, que, con el tiempo, pueden causar proliferaciones malignas (leucemias).

#### 1.3.1.2. Autotransplante de células madre hematopoyéticas.

La terapia actual de algunas enfermedades tumorales incluye la aplicación de dosis masivas de quimioterapia, cuya mielotoxicidad conduce a la aplasia medular. Para evitar esta situación, se puede obtener un número suficiente de células madre (“stem cells”), ya sea de la médula ósea hematopoyética o de la sangre circulante del propio enfermo, antes de iniciar el tratamiento, y reintroducirlas en el organismo una vez concluido el tratamiento mielotóxico. Estas células repoblarán las zonas medulares, restableciendo las funciones de hematopoyesis destruidas por la quimioterapia. Como son células autólogas, no existe ningún tipo de reconocimiento de antígenos extraños ni hay rechazo; pero en el lapso de tiempo que transcurre entre la abolición de la función medular y la restauración de dichas funciones (que depende de la proliferación y diferenciación de las células transplantadas), el individuo está severamente inmunocomprometido. Aunque los enfermos trasplantados suelen recibir



factores inductores de la diferenciación celular (factores estimuladores de colonias), este intervalo de tiempo puede durar varios meses, durante los cuales hay que prevenir o combatir las infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos animales.

#### 1.3.1.3. Aloinjertos.

Si bien, mediante la realización de los correspondientes tipajes de antígenos principales de histocompatibilidad (sistema HLA en el ser humano), se procura conseguir el mayor número posible de coincidencias entre donante y receptor, lo cierto es que, salvo los casos excepcionales de gemelos univitelinos, los aloantígenos presentes en los tejidos trasplantados inducen respuestas inmunes que deben ser controladas para evitar el rechazo agudo del trasplante [Martorell, 1998]. El control incluye el uso de agentes inmunosupresores, en combinaciones como ciclosporina A, azatioprina y corticoides (prednisolona), que, pese a la precisión de las dosificaciones, siempre causan una supresión inespecífica que compromete al enfermo frente a infecciones oportunistas [Ruiz-Bravo *et al.*, 1998]. La introducción de nuevos agentes supresores (tacrolimus, rapamicina, deoxispergualina) ha mejorado estas situaciones, disminuyendo el riesgo de infecciones [Martorell, 1998].

#### 1.3.1.4. Reacción de injerto contra huésped.

Como la médula ósea contiene linfocitos inmunocompetentes y células progenitoras que van a diferenciarse en el organismo del receptor, en los aloinjertos de médula hematopoyética se presenta una situación en la que el propio tejido trasplantado protagonizará respuestas específicas frente a las incompatibilidades antigénicas reconocidas en los tejidos del receptor [Batchelor, 1994]. Estas respuestas constituyen lo que se conoce como "reacción de injerto contra huésped" (GVHD, de "graft versus host disease"). Los aloinjertos de médula ósea van precedidos de un tratamiento inmunosupresor previo, "acondicionante", que destruye la capacidad de respuesta del receptor, evitando por tanto el rechazo del trasplante [Ruiz-Bravo *et al.*, 1998]. Además, se puede tratar *in vitro* la médula obtenida, antes de proceder a su trasplante, con el objetivo de eliminar las células T inmunocompetentes presentes en la médula y, finalmente, la

administración de agentes inmunosupresores (ciclosporina, metotrexato), puede prevenir el desarrollo de GVHD [Batchelor, 1994].

#### 1.3.1.5. Cáncer.

El término “cáncer” engloba una diversidad de enfermedades, que, teniendo en común la proliferación celular incontrolada, la invasividad y la capacidad de producir metástasis, son demasiado heterogéneas como para hacer afirmaciones generales. Así, si bien es cierto que los enfermos de cáncer suelen pasar por etapas en las que su sistema inmune aparece deteriorado en mayor o menor grado, la gravedad y las causas de esta inmunodepresión dependen mucho del tipo de tumor. Entre los factores causales de inmunosupresión no específica en enfermos de cáncer se han señalado las siguientes:

- Algunos agentes cocarcinógenos son inmunosupresores, y precisamente esa actividad inmunosupresora puede contribuir a la carcinogénesis, al inhibir la “inmunovigilancia” que ejercen las células T, por su capacidad para detectar las alteraciones en las proteínas sintetizadas en el interior de las células del organismo. Un ejemplo convincente lo constituye la inmunosupresión debida a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), con la consecuencia de que en los pacientes de SIDA haya una incidencia anormalmente alta de ciertos tumores, como el sarcoma de Kaposi [Schulz, *et al.* 1998]. La restricción del linfoma de Burkitt, causado por el ubicuo virus de Epstein-Barr (*Lymphocryptovirus*), a ciertas áreas geográficas se atribuye a la coincidencia con la infección por *Plasmodium falciparum*, que ejerce efectos supresores sobre las células T [Liebowitz, 1998].

- Los tumores sólidos pueden atrapar en su interior linfocitos, que son apartados de sus normales patrones de recirculación, afectando negativamente a la capacidad de respuesta.
- Las neoplasias que afectan a células del sistema inmune (leucemias, linfomas, mielomas) pueden determinar la acumulación de células funcionalmente inútiles; en algunos casos, es posible que las propias células neoplásicas produzcan un exceso de factores supresores.
- El deterioro nutricional en los enfermos con tumores avanzados se refleja negativamente en la reactividad del sistema inmune.
- Finalmente, la quimioterapia antitumoral (y, en su caso, también la radioterapia) tiene generalmente, entre sus efectos colaterales indeseables, la inmunosupresión, dado que las células inmunitarias son sensibles a los agentes antimetabólicos. De hecho, la infección continúa siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en los enfermos que presentan neutropenia como consecuencia de terapias antitumorales y, en especial, tras los intensos tratamientos mielosupresores que se utilizan en las neoplasias hematológicas [Maertens y Boogaerts, 1998].

#### 1.3.1.6. Infecciones como causa de inmunosupresión.

Algunas infecciones cursan con una depresión transitoria, más o menos marcada, de la reactividad inmunitaria. En realidad, este es uno de los resultados posibles de la interacción entre el agente patógeno y el sistema inmune del hospedador. En el caso de infecciones bacterianas, hay que considerar la posible presencia en la bacteria de BRMs que puedan modular negativamente determinado tipo de respuestas, así como la

producción de toxinas inmunosupresoras. En cuanto a los virus, pueden afectar al sistema inmune por dos mecanismos generales [McChesney y Oldstone, 1987]:

- Replicándose en linfocitos, con lo que la depleción de células inmunocompetentes repercutirá negativamente en la capacidad de respuesta.
- Alterando la producción de citokinas reguladoras.

Los citomegalovirus (CMV) se replican en leucocitos mononucleares, incluyendo monocitos y linfocitos, y, aunque la infección no es productiva (no hay progenie viral en estas células), las funciones celulares (presentación de antígenos, coestimulación) deben verse afectadas porque tanto la linfoproliferación como la respuesta de anticuerpos se ven suprimidas de forma no específica [McChesney y Oldstone, 1987].

El virus del sarampión (*Morbillivirus*) se replica en el tejido linfoide durante la fase aguda de la infección; durante este tiempo, los linfocitos del enfermo tienen deprimida su capacidad para proliferar *in vitro* en respuesta a mitógenos, lo que se correlaciona con la negativización de las pruebas cutáneas tipo tuberculina que antes de la infección eran positivas [revisado por McChesney y Oldstone, 1987], si bien esta anergia es transitoria y en la convalecencia se recupera la reactividad normal.

Un caso especial es el del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), cuya principal célula diana es el linfocito T CD4<sup>+</sup>, que ejerce un papel crucial en la inmunidad específica, tanto humoral como celular, como célula cooperadora. La progresiva pérdida de células T CD4<sup>+</sup> en los individuos infectados conduce a un deterioro creciente de la capacidad de respuesta, que caracteriza al SIDA y que se manifiesta por toda una serie de

sobreinfecciones (en muchos casos por patógenos oportunistas), con presentaciones clínicas inusuales y cuadros de inusitada gravedad, además de la ya mencionada incidencia de ciertas neoplasias [Schüpbach, 1999].

### **1.3.2. Infecciones en individuos inmunocomprometidos.**

#### 1.3.2.1. Destrucción de las barreras físicas que limitan el medio interno.

Las lesiones traumáticas que interrumpen la continuidad de piel o mucosas y, de forma especial, las quemaduras extensas, constituyen una puerta de entrada para una diversidad de microorganismos patógenos, entre los que destacan patógenos oportunistas como *P. aeruginosa*, *S. aureus* y la levadura *Candida albicans* [Mims *et al.*, 1993].

#### 1.3.2.2. Déficits en el complemento.

El sistema del complemento interviene en la defensa frente a hongos, bacterias y virus, pero, desde el punto de vista clínico, las deficiencias en componentes de este sistema se reflejan, generalmente, en un incremento de infecciones bacterianas. En este sentido, el mayor impacto corresponde al déficit en C3 (que bloquea tanto la vía alternativa como la vía clásica), y las infecciones más frecuentes son debidas a bacterias capsuladas como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, que pueden ocasionar sepsis, meningitis, osteomielitis e infecciones respiratorias [Arnáiz *et al.*, 1997]. Los déficits restringidos a la formación del complejo de ataque a membrana (C5b6789) son causa de una mayor incidencia de infecciones graves (meningitis, sepsis) por *Neisseria meningitidis* [Arnáiz *et al.*, 1997].

#### 1.3.2.3. Defectos en la fagocitosis.

A los fallos congénitos, ya mencionados, que afectan a la fagocitosis, hay que añadir los adquiridos, que generalmente consisten en una disminución en el número de neutrófilos circulantes (neutropenia). En los individuos normales, los recuentos de neutrófilos

están en torno a un promedio de 4000/mm<sup>3</sup>, aunque sujetos a amplias variaciones. Se considera que hay neutropenia cuando los recuentos descienden por debajo de 1500 neutrófilos/mm<sup>3</sup>; el riesgo de infecciones está significativamente incrementado cuando los recuentos descienden a 1000 o menos neutrófilos/mm<sup>3</sup>, y las infecciones son severas por debajo de 500 neutrófilos/mm<sup>3</sup> [Holland, 1997]. Las infecciones bacterianas más frecuentes en los casos de neutropenia o, en general, en los déficits de fagocitosis, se deben a bacterias patógenas extracelulares, ya sean Gram-positivas, como *S. aureus* (con riesgo de "shock" debido a la sobreestimulación de la producción de citocinas por acción de los superantígenos de la bacteria), estreptococos β (*Streptococcus pyogenes*) y α hemolíticos, enterococos, o Gram-negativas, como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *P. aeruginosa* [Krcmery *et al.*, 1994; Mims *et al.*, 1993; Arnaiz *et al.*, 1997]. En algunas series de enfermos con neutropenia, las infecciones más frecuentes son las fúngicas, destacando como agentes causales *C. albicans* y *Aspergillus* [Arnaiz *et al.*, 1997]. Es interesante constatar como la presión selectiva ejercida por los tratamientos antimicrobianos ha ido modelando globalmente el espectro de agentes causales de infección en estos enfermos, que en la década de los 40 incluía mayoritariamente bacterias Gram-positivas; pero la introducción de los primeros agentes β-lactámicos determinó el predominio de bacterias Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli* y *Klebsiella* spp.) durante los años 70 y 80; sin embargo, en los últimos años se ha vuelto a invertir el panorama, con predominio de *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y estreptococos α-hemolíticos del grupo *viridans* [Glauser, 1998]. En la enfermedad granulomatosa crónica, son típicas las infecciones recurrentes por bacterias productoras de catalasa, como *S. aureus* y los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, ya que las que no producen esta enzima liberan, como resultado de su metabolismo, peróxido de hidrógeno que se acumula en los fagosomas y las intoxica [Arnaiz *et al.*, 1997].

#### 1.3.2.4. Deficiencias de células B.

Según la gravedad del déficit, estos enfermos oscilan entre la ausencia de signos clínicos (algunos casos de hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, algunas deficiencias limitadas a una subclase de IgG) hasta la elevada incidencia de infecciones crónicas o recurrentes por bacterias extracelulares, frecuentemente encapsuladas (se pone de relieve la imposibilidad de conseguir opsonizaciones específicas) [Cunningham-Rundles y Nesin, 2000]. Los enfermos con agammaglobulinemia, inmunodeficiencia común variable o síndrome de hiper-IgM padecen infecciones por bacterias como *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *P. aeruginosa*, que suelen afectar al tracto respiratorio (neumonías, sinusitis), registrándose también otitis, meningitis, septicemias y formación de forúnculos; hay también

infecciones intestinales por *Campylobacter jejuni* y por el protozoo *Giardia lamblia* [Mims *et al.*, 1993; Arnaiz *et al.*, 1997]. La inmunidad celular, intacta, asegura un buen control de las infecciones por patógenos intracelulares, entre ellos los virus, con la notable excepción de la gran susceptibilidad que los individuos con agammaglobulinemia de Bruton muestran frente a los enterovirus; estos pacientes pueden padecer infecciones sistémicas incontroladas por estos virus, y por ello no deben ser vacunados con la vacuna oral de la poliomielitis o vacuna Sabin (con virus atenuado) [Mims *et al.*, 1993; Arnaiz *et al.*, 1997]. El tratamiento de estas deficiencias incluye generalmente la administración de inmunoglobulina inespecífica y los agentes antimicrobianos. En los déficits selectivos de IgA suele registrarse una incidencia elevada de infecciones en las mucosas respiratoria, intestinal y urogenital, sin repercusiones sistémicas; no deben administrarse preparados de inmunoglobulina a estos pacientes, ya que la IgA que contienen no es secretora (y, por tanto, no protege a nivel mucosal) y, en cambio, puede actuar como antígeno y provocar reacciones de hipersensibilidad [Arnaiz *et al.*, 1997].

#### 1.3.2.5. Deficiencias de células T.

Las deficiencias primarias de células T conllevan la ausencia de citocinas que son necesarias para activar a los macrófagos y capacitarlos para la muerte de patógenos intracelulares; esto conduce a infecciones persistentes o recurrentes, frecuentemente en el tracto respiratorio [Cunningham-Rundles y Nesin, 2000], así como diarreas persistentes y candidiasis oral [Arnaiz *et al.*, 1997].

#### 1.3.2.6. Deficiencias combinadas.

Los individuos que padecen inmunodeficiencias combinadas severas son susceptibles a todos los agentes patógenos; la incapacidad para establecer una inmunidad específica eficaz hace imposible el control de las infecciones, a pesar de los tratamientos antimicrobianos, y los enfermos suelen morir antes del primer año de vida, a causa de infecciones por bacterias, hongos, protozoos y virus (diarreas, neumonías, otitis, sepsis) [Arnaiz *et al.*, 1997]. Sólo la reconstitución inmunológica (trasplante de médula ósea y, más recientemente, en ciertos casos, terapia génica) tiene éxito en estos enfermos.

### **1.3.3. Agentes antimicrobianos utilizados en individuos neutropénicos.**

La estrategia ideal en la terapéutica de un proceso infeccioso parte de la identificación del microorganismo causal y, especialmente, de la determinación de su espectro de susceptibilidad frente a los agentes antimicrobianos utilizables en clínica; a la vista de estos datos de laboratorio y de otros factores clínicos (presentación y gravedad de la infección, otras enfermedades subyacentes, estado general del enfermo, historial de alergias, etc.) y epidemiológicos (riesgos de transmisión, infecciones nosocomiales, impacto sobre la evolución de las resistencias, etc.), el médico decidirá la terapia a seguir. Sin embargo, no siempre se dispone del tiempo necesario para obtener los datos del laboratorio, y hay casos que por su gravedad o riesgo potencial requieren la instauración inmediata de una terapia empírica, que posteriormente podrá modificarse o no, de acuerdo con la información que se reciba sobre la etiología de la infección y la susceptibilidad del agente patógeno. Obviamente, los individuos inmunocomprometidos presentan este tipo de situaciones [Maschmeyer, 1999], en las que incluso pueden precisarse tratamientos de tipo preventivo. Dada la orientación del presente trabajo, se revisarán a continuación algunos aspectos de la profilaxis y tratamiento empírico de la infección en individuos con neutropenia, considerando separadamente las dos opciones posibles, la monoterapia y el tratamiento con asociaciones de agentes antimicrobianos.

#### **1.3.3.1. Monoterapia.**

Es necesario recurrir a agentes de amplio espectro, que sean activos sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, aerobias y anaerobias. Entre los posibles candidatos figuran las cefalosporinas de 4<sup>a</sup> generación (cefpiroma, cefepima), cuyo espectro de acción incluye *Pseudomonas* [Mensa



*et al.*, 1997]. También se utilizan agentes del grupo carbapenem, como el meropenem [Vandercam *et al.*, 2000]. La asociación piperacilina/tazobactam, que combina un agente  $\beta$ -lactámico con un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas, es considerada por muchos como monoterapia recomendable en sujetos neutropénicos [Mensa *et al.*, 1997], con una eficacia mayor que la combinación clásica ticarcilina/clavulánico [Perry y Markham, 1999] y similar a la obtenida con cefepima en tratamientos iniciales [Byohme *et al.*, 1998]. El amplio espectro de las fluoroquinolonas las hace también apropiadas para monoterapias, habiéndose propuesto su uso incluso con fines profilácticos [Bergh *et al.*, 1998]. Actualmente se está utilizando el levofloxacin, una nueva quinolona con mayor actividad sobre microorganismos Gram-positivos, que es efectivo en la reducción de la incidencia de la infección y el índice de hospitalización para el tratamiento con antibióticos por vía intravenosa [García *et al.*, 2003].

#### 1.3.3.2. Asociaciones de agentes antimicrobianos.

Las asociaciones pueden proponerse como tratamiento preventivo, como terapia inicial de un proceso febril o en los casos en los que una monoterapia inicial no ha conseguido eliminar la fiebre. Mayoritariamente usadas son las asociaciones de un agente  $\beta$ -lactámico y un aminoglicósido (vía parenteral), siendo frecuente combinar una cefalosporina de 3ª generación, como la ceftriaxona o la ceftazidima, y el aminoglicósido amikacina [Krcemery *et al.*, 1994; Girmenia *et al.*, 1999]. Se han propuesto alternativas; así, la asociación de ceftazidima más tobramicina ha sido evaluada como muy efectiva por Toyama *et al.* [1994]. Otras asociaciones combinan diversos agentes: así, Griggs *et al.* [1998] señalan que la eficacia de la clásica asociación piperacilina más gentamicina aumenta si el aminoglicósido se sustituye por ciprofloxacino. Perry y Markham [1999] afirman que la asociación de piperacilina/tazobactam más amikacina es más efectiva que la de ceftazidima más amikacina en los enfermos febriles

con neutropenia. La asociación de amoxicilina/clavulánico (el ejemplo clásico de  $\beta$ -lactámico e inhibidor de  $\beta$ -lactamasas) con ciprofloxacino parece ser de similar eficacia a la de cefalosporina de 3ª generación más aminoglicósido, y tiene la ventaja de poderse administrar por vía oral [Kern *et al.*, 1999]. La combinación de vancomicina más imipenem/cilastatina se ha propuesto para afrontar el grave problema que en estos enfermos suponen las infecciones por estafilococos resistentes a la meticilina [Totsuka *et al.*, 1999]. Continuamente se ensayan nuevas asociaciones a nivel experimental, utilizando modelos de animales neutropénicos; así, Mouton *et al.* [1999] han investigado las asociaciones ticarcilina más tobramicina, ceftazidima más netilmicina, ciprofloxacino más netilmicina y ciprofloxacino más ceftazidima en un modelo de ratón neutropénico por administración de ciclofosfamida.

En los casos de aparente fracaso terapéutico (persistencia de la fiebre más de tres días sin diagnóstico etiológico establecido) de las asociaciones clásicas, Mensa *et al.* [1997] recomiendan añadir vancomicina y, si la situación prosigue, anfotericina B (posible candidiasis sistémica). Salazar *et al.* [1999] han propuesto la siguiente secuencia en enfermos que recibieron altas dosis de quimioterapia mielotóxica para ser recuperados por trasplante autólogo de células madre en sangre periférica: profilaxis, con un antibacteriano de amplio espectro (ciprofloxacino), un agente antiviral (aciclovir) y un antifúngico (itraconazol); tratamiento inicial de la fiebre con imipenem/cilastatina; si tras dos o tres días persiste la fiebre, se añade vancomicina; tras cinco días, amikacina; finalmente, si prosigue el estado febril tras siete u ocho días, se añade anfotericina B. Un esquema parecido es el seguido por De Bock y Middelheim [2000] en enfermos febriles con neutropenia post-trasplante de médula ósea alogénica: cefalosporinas de 3ª o 4ª generación asociadas a un aminoglicósido o a un agente del grupo carbapenem; si la fiebre persiste cinco o más días, se adiciona anfotericina B. Recientemente se ha observado que el voriconazol es una alternativa

adecuada a las preparaciones a base de anfotericina B para la terapia antifúngica de los pacientes neutropénicos y con fiebre persistente [Walsh *et al.*, 2002].

Las asociaciones también se utilizan para la descontaminación intestinal preventiva de individuos afebriles cuya neutropenia se prevee persistente. Mensa *et al.* [1997] describen una profilaxis consistente en una fluoroquinolona (ciprofloxacino u ofloxacino) más nistatina, con la ventaja de que la administración es por vía oral; como alternativa, cotrimoxazol (asociación de dos sulfonamidas, trimetoprima y sulfametoxazol, que es activa frente a *Pneumocystis carinii*) más vancomicina y nistatina.



## 2. OBJETIVOS

El Grupo de Investigación "Inmunología Microbiana" mantiene, desde su consolidación en 1988, una temática principal de investigación sobre agentes modificadores de la respuesta biológica. Una de las líneas contenidas en esa temática se centra en el estudio de las propiedades inmunomoduladoras de los agentes antimicrobianos. Esta línea ha generado una diversidad de publicaciones y tesis doctorales.

Los ensayos sobre agentes inmunomoduladores se realizan generalmente, *ex vivo* o *in vivo*, sobre individuos inmunocompetentes. Del mismo modo, las pruebas *in vitro* se realizan con células intactas, procedentes de individuos inmunológicamente normales. Sin embargo, es de suma importancia conocer si esos mismos agentes actúan de similar manera, o de forma distinta, cuando las funciones inmunitarias están comprometidas. Según el sentido de la modulación ejercida sobre los parámetros inmunitarios en situaciones de inmunodeterioro, puede ocurrir que un agente sea capaz de paliar la inmunodeficiencia, o, por el contrario, de agravarla.

A estas consideraciones se suma el hecho de que el colectivo de enfermos inmunocomprometidos es cada vez más numeroso. A ello contribuyen varios componentes: el auge de los trasplantes alogénicos, en

los que la existencia de incompatibilidades entre el donante y el receptor impone la necesidad de un tratamiento inmunosupresor prolongado; las terapias antitumorales agresivas, con efectos colaterales de mielotoxicidad e inmunodepresión; y la pandemia mundial de SIDA, que ha acumulado enfermos con inmunodeficiencias que no siempre son totalmente restauradas por las terapias antirretrovirales combinadas de alta eficiencia.

Estos antecedentes condujeron al diseño del presente estudio, que se propone como objetivo general el estudio comparado de la actividad inmunomoduladora de agentes antimicrobianos en animales inmunocompetentes y animales inmunocomprometidos.

El objetivo planteado aborda las bases experimentales del concepto de "antibiótico adaptado". Se trataría de conocer las interacciones entre agentes antimicrobianos con propiedades inmunoduladoras y el sistema inmune en condiciones alteradas, de forma que, en cada caso concreto, se pudiese utilizar un agente quimioterápico apropiado, no solo por su espectro antimicrobiano, sino también en virtud de las citadas interacciones. Por ejemplo, en el tratamiento o prevención de infecciones en sujetos con una patología inflamatoria de base, sería apropiado utilizar agentes antimicrobianos con actividad antiinflamatoria, como es el caso de los principales miembros de la familia de los macrólidos. En el caso de enfermos sometidos a un régimen de supresión de la inmunidad específica, serían muy útiles antimicrobianos capaces de potenciar la inmunidad innata sin afectar a la específica, ya que un efecto paliativo de la inmunosupresión podría promover el rechazo del órgano transplantado o la reactivación de una patología autoinmune. Por el contrario, si se trata de sujetos neutropénicos, como consecuencia de un tratamiento antitumoral con efectos secundarios de mielotoxicidad, hay que asegurarse de que el agente antimicrobiano usado no agrave la neutropenia, sino que, más bien, contribuya a la recuperación de la leucopoyesis.

En el presente estudio, se ha recurrido a modelos de inmunosupresión experimental representativos de situaciones clínicas de inmunocompromiso: inducción de leucopenia e inmunosupresión con ciclofosfamida, azatioprina y tacrolimus. En estos modelos, se ha ensayado la actividad inmunomoduladora de agentes antimicrobianos de uso frecuente en la profilaxis y el tratamiento de enfermos inmunocomprometidos: el  $\beta$ -lactámico ceftriaxona, la fluorquinolona moxifloxacino, el agente antiviral aciclovir y el antifúngico anfotericina B.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1. ANIMALES.

Se utilizaron ratones BALB/c, hembras, de 6 a 10 semanas de edad y 18 a 22 g de peso corporal. Los ratones se obtuvieron de la Unidad de Experimentación Animal de la Universidad de Granada y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos, con libre acceso a pienso estándar y agua estériles.

### 3.2. ESTUDIOS *EX VIVO*.

#### 3.2.1. Diseños experimentales.

El diseño de los ensayos de inmunomodulación *ex vivo* por los diversos agentes antimicrobianos estudiados incluyó 4 grupos experimentales, dispuestos como se indica a continuación:

- Ratones testigos, que no recibieron ningún tratamiento.

- Ratones tratados con el agente antimicrobiano, cuya comparación con el grupo testigo permitió establecer los posibles efectos inmunomoduladores de dicho agente solo.
- Ratones tratados con el agente inmunosupresor. Este grupo es el grupo de referencia para el siguiente. Su comparación con el grupo testigo permitió constatar en cada caso la efectividad del tratamiento con el inmunosupresor.
- Ratones tratados con el agente inmunosupresor y, posteriormente, con el agente antimicrobiano. Este grupo se comparó con el anterior, para evaluar el posible efecto inmunomodulador del agente antimicrobiano sobre los parámetros deprimidos por el inmunosupresor.

### **3.2.2. Tratamientos inmunosupresores.**

#### **3.2.2.1. Tratamiento con ciclofosfamida.**

Se utilizó la ciclofosfamida comercializada por Asta Medica, Prarfarma S.A. con la denominación de Genoxal®. La administración se realizó siempre por la vía intraperitoneal (i.p.), ajustando las dosis para inyectar un volumen de 0.2 ml en un animal de 20 g de peso. Se siguió el protocolo descrito por Craig *et al.* [1991] y Sanati *et al.* [1997]. Cada animal recibió una dosis inicial de 150 mg/Kg de ciclofosfamida, y pasados tres días, se inyectó una segunda dosis de 100 mg/Kg.

#### 3.2.2.2. Tratamiento con azatioprina.

Obtuvimos la azatioprina del laboratorio Celltech, en su presentación comercializada en España denominada Imurel®. En el prospecto se indican dosis que oscilan entre 1 y 2.5 mg/Kg/día por vía intravenosa. En el caso de recurrir a la vía oral se administra como máximo 5 mg/Kg/día. En diversos trabajos publicados las dosis aplicadas van desde 1.3 a 2 mg/Kg/día [Rumbo *et al.*, 2002 y Houssiau *et al.*, 2002 respectivamente]. Normalmente, en los ensayos de inmunosupresión sobre ratones, se aplican las dosis aceptadas para humanos, aunque en un estudio de Kennedy [1999] se administraron hasta 100 mg/Kg/día i.p. Nosotros finalmente, administramos 4 mg/Kg/día por vía i.p., durante 4 días consecutivos.

#### 3.2.2.3. Tratamiento con tacrolimus.

En un estudio realizado por Moffatt y Metcalfe [2000], donde se comparaban varios inmunosupresores, la pauta de administración a ratones BALB/c fué de 1 mg/Kg/día por vía i.p. El laboratorio farmacéutico (Fujisawa) que lo comercializa con la denominación de Prograf® recomienda la administración de 0.05 a 0.15 mg/Kg/12 h vía oral o bien 0.05 a 0.1 mg/Kg/día en infusión intravenosa. Nosotros finalmente decidimos emplear una dosis de 0.1 mg/Kg/12 h durante 6 días consecutivos, por vía i.p.

### **3.2.3. Tratamientos con agentes antimicrobianos.**

#### 3.2.3.1. Ceftriaxona.

La ceftriaxona se obtuvo de los Laboratorios Normon S.A. El prospecto del medicamento indica que las dosis usadas en adultos son de 1 ó 2 g por día, pudiendo elevarse hasta 4 g por día en casos graves. También se indican dosis de 50 mg/Kg/día, en niños, aconsejando que en ciertos casos (meningitis), la dosis inicial sea de hasta 100 mg/Kg/día. Ante estos datos, se decidió ensayar la dosis de 50 mg/Kg, que equivale a 1 mg por ratón y día, en una única dosis diaria, dada por vía i.p. en un volumen de 0.2 ml para un animal de 20 g, durante tres días. En los tratamientos combinados, la administración de ceftriaxona se inició a las 24 h de la última inyección del agente inmunosupresor.

#### 3.2.3.2. Moxifloxacino.

Se administró moxifloxacino del laboratorio Bayer S.A. en una única dosis de 50 mg/Kg/día vía i.p. durante tres días consecutivos. Las dosis únicas y orales, en humanos, están entre 50-800 mg/día [Wise, 1999]. En animales normalmente se ha utilizado dosis de 100 mg/Kg/día administrado a través de cánula esofágica [Lounis *et al.*, 2001]. Cuando se administra intravenosamente se suelen emplear de 50-100 mg/Kg/día [Bermudez *et al.*, 2001].

En los tratamientos combinados, la administración de moxifloxacino se inició a las 24 h de la última inyección del agente inmunosupresor.

#### 3.2.3.3. Anfotericina B.

Se utilizó anfotericina B comercializada por Bristol Myers Squibb, con la denominación de Fungizona®. Las dosis recomendadas en infecciones sistémicas en humanos son de 0.5 mg/Kg/día. En varios estudios sobre ratones las dosis oscilan entre 0.5 y 1 mg/Kg/día [Larabi *et al.*, 2004; Takemoto *et al.*, 2004]. Nosotros utilizamos una concentración de 1

mg/Kg/día durante tres días consecutivos, iniciando el tratamiento, en los animales sometidos a inmunosupresión, 24 h después de la última inyección del agente inmunosupresor.

#### 3.2.3.4. Aciclovir.

Se utilizó el preparado comercializado por GlaxoSmithKline, denominado Zovirax® para administración parenteral. La posología utilizada es variable, ya que depende de la infección y del estado fisiológico del paciente. Como norma, se puede decir que las dosis están entre 200 y 800 mg repartidos en varias tomas al día. Nosotros decidimos utilizar una dosis de 8 mg/Kg dos veces al día, por vía intraperitoneal, durante 3 días consecutivos. En los animales sometidos a inmunosupresión, la administración de aciclovir se inició, como en los otros casos, 24 h después de la última inyección del agente inmunosupresor.

### 3.3. ESTUDIOS *IN VITRO*.

Se realizaron ensayos *in vitro* para examinar los efectos de tacrolimus y sus combinaciones con los 4 agentes antimicrobianos estudiados sobre la capacidad de respuesta de esplenocitos procedentes de animales no tratados. El tacrolimus se utilizó a un rango de concentraciones finales entre 0.005 y 5 µg/ml [Spychala y Mitchell, 2002], y, de acuerdo con ensayos previos, se eligió una concentración de 0.05 µg/ml. Los antimicrobianos se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: ceftriaxona, 100 µg/ml [Pacheco *et al.*, 1994]; moxifloxacino, 8 µg/ml [Bermúdez *et al.*, 2001]; anfotericina B, 2 µg/ml [Lewis *et al.*, 2002]; aciclovir, 10 µg/ml [Belaid *et al.*, 2002]. Se ensayaron los 5 agentes por separado y las combinaciones del tacrolimus con cada uno de ellos.

### 3.4. RECUENTO DE LEUCOCITOS PERIFÉRICOS.

Los animales se anestesiaron con éter etílico. Se heparinizó una pipeta pasteur, cuyo extremo se introdujo en el seno venoso retroorbital. En ese momento, la sangre venosa asciende por la pipeta. Cuando se obtuvo un volumen suficiente, la sangre se pasó a un tubo de hemolisis.

Para proceder a los recuentos se añadieron 20  $\mu$ l de sangre heparinizada sobre 80  $\mu$ l de líquido de Turk, se homogeneizó la suspensión y se insertó una gota en una cámara hemocitométrica de Neubauer. Los resultados se expresaron como número de leucocitos por  $\text{mm}^3$  de sangre.

### 3.5. RECUENTO DE ESPLENOCITOS.

Los animales se sacrificaron por dislocamiento cervical. Se aseptizó la superficie corporal con etanol y se dispuso el cuerpo sobre un soporte aseptizado, en el interior de una cabina de flujo laminar. Usando material quirúrgico estéril, se practicaron sucesivas incisiones en la piel, que se apartó a ambos lados, y en el peritoneo, para proceder a la extracción del bazo, que se llevó sobre una rejilla metálica estéril, depositada en una placa petri conteniendo 10 ml de medio de cultivo de células RPMI 1640, suplementado como se indica más adelante(3.7.1.). Se procedió a homogeneizar el bazo, presionándolo sobre la rejilla con el extremo ancho de una jeringa de plástico de 5 ml, estéril. Se dejaron decantar los residuos tisulares 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 estéril de 15 ml. Las células se sedimentaron en centrifuga refrigerada (10 min a 1000 rpm y 5°C) y se desechó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en 5 ml de tampón de lisis de hematíes (Sigma) y la suspensión se mantuvo 5 min a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 5 ml de medio para proteger a las células nucleadas de un posible daño hipotónico y se practicaron dos lavados por centrifugación en las condiciones descritas anteriormente, resuspendiendo cada vez las células en medio de cultivo RPMI 1640.

### 3.6. RECUENTO DE CÉLULAS NUCLEADAS EN MÉDULA ÓSEA.

Una vez sacrificado el animal, se fijó sobre la tablilla de operaciones, en posición decúbito prono. Se asepsizó la piel con etanol. Usando tijeras y pinzas de disección, se cortó la piel a lo largo de un miembro inferior, se separaron las capas musculares y se puso al descubierto el fémur. Se cortó la unión del fémur con la cadera, y se extrajo el fémur con pinzas, procurando desprender la rótula. Se perforaron ambos extremos del fémur con la aguja de una jeringa de 1 ml. Con una jeringa similar, se tomó 1 ml de PBS, se insertó la aguja en uno de los extremos perforados del fémur y se expelió la mitad del volumen, haciéndolo pasar a través del fémur para arrastrar el contenido medular. A continuación, se insertó la aguja en el otro extremo, haciendo pasar el resto del PBS por el canal medular en sentido contrario. El líquido de lavado, con el contenido medular, se recogió íntegramente en un tubo de ensayo, donde se diluyó a 1:2 ó 1:3 en líquido de Turk, para proceder al recuento de células nucleadas. Este se llevó a cabo en una cámara hemocitométrica de Neubauer. Los resultados se expresaron como número de células nucleadas por fémur.

### 3.7. LINFOPROLIFERACIÓN EN RESPUESTA A MITÓGENOS.

El procedimiento seguido, que se describe a continuación, ha sido optimizado en nuestro Laboratorio y es usado de rutina en la investigación que en él se desarrolla [Ruiz-Bravo *et al.*, 1996].

#### **3.7.1. Medio de cultivo.**

Se utilizó el medio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), suplementado con piruvato sódico (1 mM), L-glutamina (2 mM) y 2-mercaptoetanol (50  $\mu$ M). Finalmente, se adicionaron 10 ml de suero fetal de ternera (FCS) por cada 100 ml de medio. Todos los suplementos utilizados se obtuvieron de Sigma. El medio así preparado se esterilizó por filtración con presión positiva (suministrada por una bomba peristáltica) a través de membranas Millipore de 0.22  $\mu$ m de diámetro de poro. La esterilidad se comprobó manteniendo el medio a temperatura ambiente durante 24 h, tras lo cual el medio se conservó en frigorífico, usándolo en un plazo no superior a 10 días, dado que algunos componentes como la glutamina se pierden progresivamente por hidrólisis espontánea.

#### **3.7.2. Obtención de suspensiones de esplenocitos.**

El procedimiento se ha descrito en el apartado 3.5.

#### **3.7.3. Recuento de células viables y ajuste de las suspensiones.**

De la suspensión de esplenocitos se tomaron 100  $\mu\text{l}$ , que se llevaron a un tubo eppendorf sobre 500  $\mu\text{l}$  de Azul tripán (Sigma) y 400  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo celular RPMI 1640. Con esta dilución a 1:10 se llenó una cámara hemocitométrica de Neubauer, para proceder al recuento de células viables (que excluyen el colorante azul). La viabilidad de las suspensiones fue en todos los casos superior al 95% (en el caso de obtener suspensiones con porcentajes de viabilidad inferiores, deben ser eliminadas). La suspensión original se centrifugó en las condiciones descritas anteriormente, y el sedimento celular se resuspendió en un volumen apropiado de medio de cultivo, para conseguir una concentración de  $5 \times 10^6$  células viables por ml.

#### **3.7.4. Cultivo de esplenocitos.**

Los cultivos se realizaron en placas microtiter de fondo plano (Costar, Cambridge, Mass.). Se distribuyeron 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular por pocillo (es decir, cada pocillo recibió  $5 \times 10^5$  células). En los ensayos *ex vivo*, cada suspensión, procedente de un bazo, se distribuyó en columnas de 8 pocillos: una columna, cuyos pocillos sólo recibieron células, se reservó como blanco; las columnas siguientes recibieron los distintos agentes mitogénicos, a razón de 10  $\mu\text{l}$  por pocillo. En los ensayos *in vitro*, se mezclaron volúmenes iguales de suspensiones ajustadas, procedentes de tres bazos de animales no tratados, y se incubaron en ausencia ó presencia de tacrolimus, agentes microbianos y sus combinaciones, disponiendo en cada caso columnas de 8 pocillos para el blanco y para cada mitógeno. Los mitógenos probados y sus concentraciones finales fueron: LPS comercial de *Salmonella typhi* (Sigma), a 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , como mitógeno estándar de células B y concanavalina A (ConA) (Sigma), a 1  $\mu\text{g/ml}$ , como mitógeno estándar de células T. Las placas se incubaron durante 72 h a 37°C en estufa con 5% de tensión parcial de CO<sub>2</sub> y humedad ambiental a saturación.

### **3.7.5. Medida de la linfoproliferación.**

La proliferación celular se determinó por el método colorimétrico descrito por Mosmann [1983]. Concluidos los tres días de incubación, las placas se llevaron a la cabina de flujo laminar, donde se añadió a cada pocillo 10 µl de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma), al 0.5% en PBS, recién preparada (extemporánea) y esterilizada por filtración (filtro Millipore de 0.22 µm para jeringa). Las placas se reincubaron en las condiciones descritas, durante 4 h; en este tiempo, las células metabólicamente activas reducen el MTT a un derivado tetrazólico coloreado. Transcurrida esta incubación, cada pocillo recibió 100 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, con el fin de solubilizar completamente los cristales del colorante reducido. Las placas se introdujeron en un lector microELISA (Behring EL 311), previamente programado para leer absorbancias a 570 nm y 630 nm de referencia. Para los cultivos de cada suspensión, se usaron como blanco los 8 pocillos de la columna reservada para ello. Los resultados se expresaron como media aritmética de las densidades ópticas de los 8 pocillos de cada columna destinada a un agente mitógeno.

## **3.8. CULTIVO DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA.**

### **3.8.1. Obtención de factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF).**

Se utilizó como fuente de GM-CSF suero de ratones inyectados con LPS [Metcalf, 1977]. Para ello, se preparó una solución de LPS comercial, al

0.005%, en medio isotónico, que se inyectó en el seno venoso retroorbital, previa anestesia del animal con éter etílico. Cada ratón recibió un volumen de 100  $\mu$ l, lo que equivale a 250  $\mu$ g por de peso corporal. A las tres horas, se extrajo la sangre de los ratones mediante una pipeta pasteur insertada en el seno venoso retroorbital. La sangre se dejó coagular para su posterior centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos. Se separó el suero y se esterilizó por filtración (filtro Millipore de 0.22  $\mu$ m para jeringa).

### **3.8.2. Obtención de las células de médula ósea.**

Se realizó igual que en apartado 3.6, pero con las siguientes variaciones: se trabajó en el interior de la cabina de flujo laminar, en condiciones estériles; las células, no se extrajeron con PBS, sino con medio RPMI 1640 con FCS al 15%; y se contaron las células viables, por exclusión con azul tripán, para ajustar la suspensión a 10<sup>6</sup> células viables por ml.

### **3.8.3. Condiciones del cultivo de células de médula ósea.**

El cultivo se realizó en placas de poliestireno estériles de 12 pocillos, a cada pocillo se añadió 100  $\mu$ l de la suspensión de células, 100  $\mu$ l de suero fuente de GM-CSF y 1 ml de medio a sobrefusión (38°C). El medio fue RPMI 1640, suplementado con glutamina, piruvato, FCS al 15% y agarosa al 0.3%. Para su preparación, la agarosa se fundió, a doble concentración, en agua desionizada y se mantuvo a sobrefusión para añadir un volumen igual de RPMI 1640 a doble concentración (al igual que los suplementos). Las placas se incubaron 7 días a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad.

#### **3.8.4. Lectura.**

Inicialmente, cada célula madre del linaje mieloide/megacariocitoide, en presencia de GM-CSF, originará un cluster de células y, a los siete días de incubación, se deben observar ya colonias bien desarrolladas de granulocitos/monocitos (GM-CFU). Las colonias se contaron con un microscopio invertido.

### **3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

La significación estadística de las diferencias entre los grupos de datos obtenidos de animales testigos y de los animales tratados, se determinó por el test de la  $t$  de Student. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron significativos.



#### 4. RESULTADOS





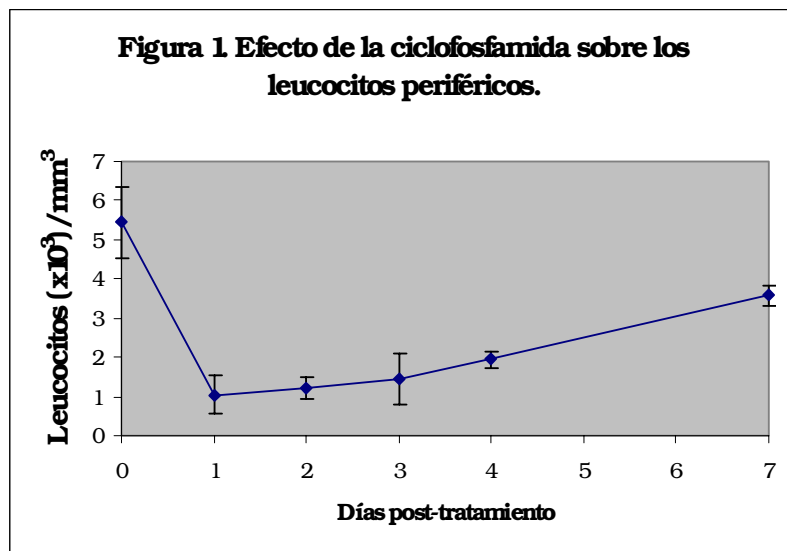
## 4.1. MODELO DE INMUNOSUPRESION CON CICLOFOSFAMIDA.

### 4.1.1. Características del modelo.

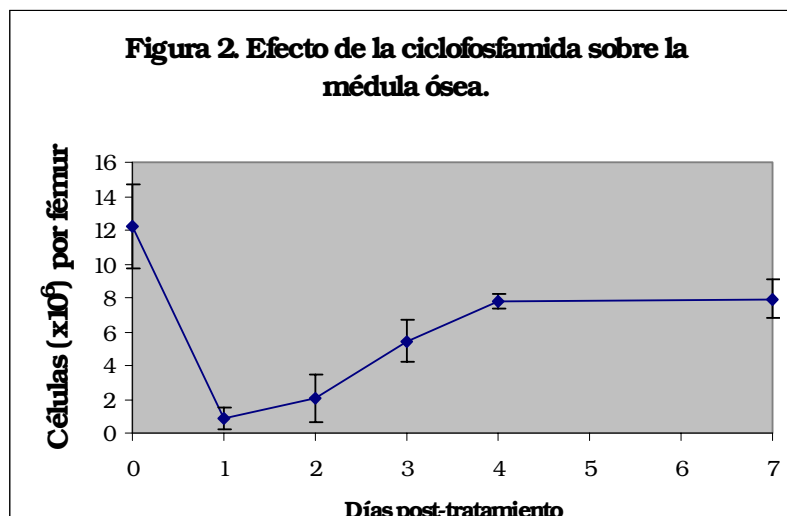
En ensayos previos, se compararon los efectos de distintos protocolos de tratamiento con ciclofosfamida [Amat, 2001; Jiménez-Valera *et al.*, 2003]. Basándose en la severidad y duración de la leucopenia inducida, se seleccionó el tratamiento descrito en Material y Métodos, cuyos efectos sobre los parámetros inmunitarios se presentan a continuación.

La **Figura 1** presenta los efectos de la ciclofosfamida sobre los niveles de leucocitos circulantes en un periodo de 7 días tras la última inyección del agente inmunosupresor. El tratamiento causó una leucopenia que se mantuvo, con cifras inferiores a 2000 leucocitos/mm<sup>3</sup>, durante al menos 4 días; los porcentajes, respecto de los recuentos en animales testigos, fueron

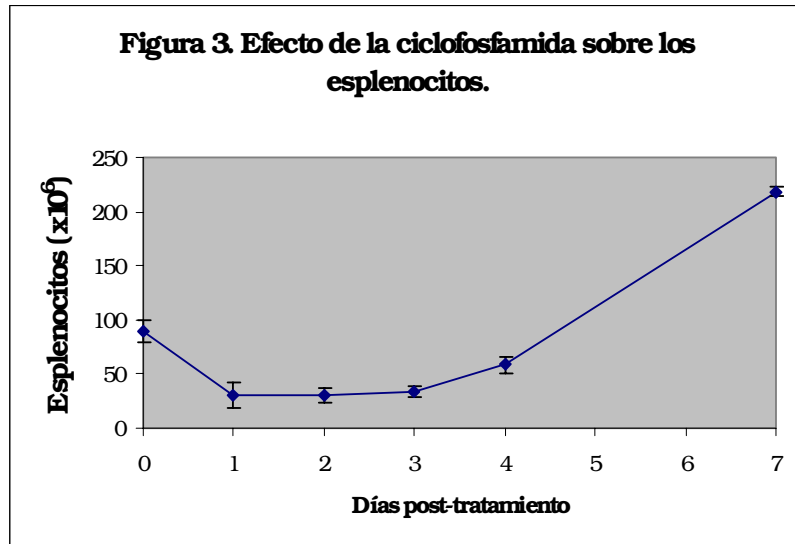
19%, 22%, 27% y 36%, respectivamente. Aunque la gráfica muestra una clara tendencia a la recuperación desde el día 1, en este experimento los niveles de los testigos no se habían alcanzado aún en el día 7 después del tratamiento, que ofreció un porcentaje del 65%.



La ciclofosfamida tuvo un efecto claramente depresor de la mielopoyesis (Figura 2). Los recuentos en los días 1 y 2 fueron muy bajos, representando el 7.2% y el 16% del tamaño de la población medular por fémur en animales testigos. A partir del día 3 se inició la recuperación de la función medular; las poblaciones medidas representaron el 44%, en el día 3; 64%, en el día 4; y 65%, en el día 7.

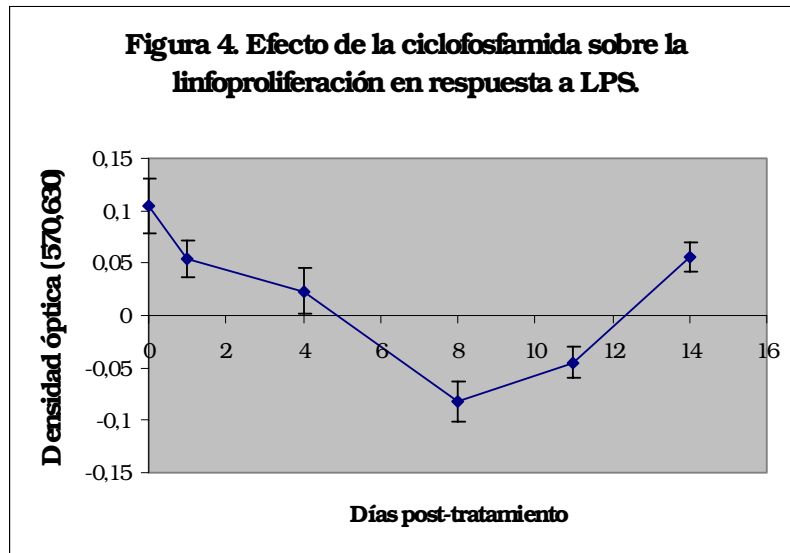


La **Figura 3** muestra un interesante efecto difásico de la ciclofosfamida sobre el número de esplenocitos: entre los días 1 y 4, se registró una disminución en el tamaño de los bazos (los recuentos de esplenocitos representaron valores del 33%, en los días 1 y 2, 37%, el día 3 y 65%, el día 4. En el día 7, este efecto se invirtió, alcanzándose recuentos del 244% respecto de los testigos, lo que se tradujo en una notable esplenomegalia.

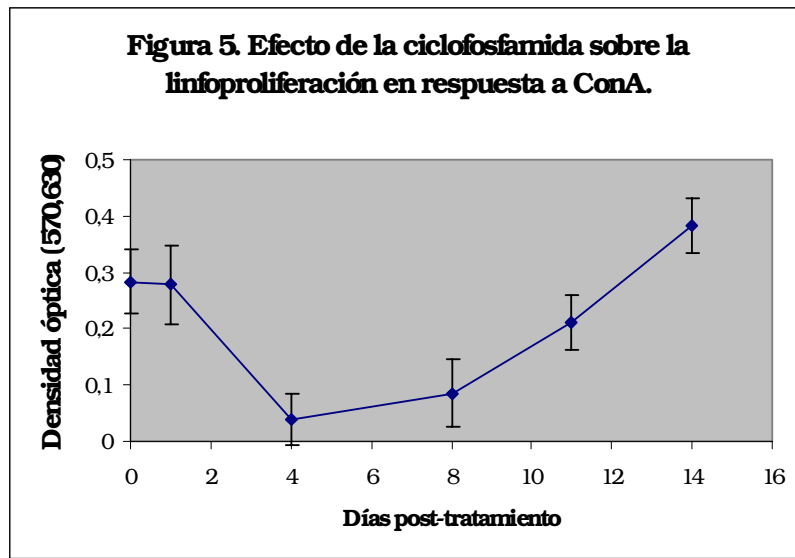


Para evaluar el efecto del tratamiento con ciclofosfamida sobre la capacidad de respuesta de los linfocitos B, se examinó la proliferación

celular en cultivos de esplenocitos estimulados con LPS. Los resultados mostrados en la **Figura 4** ponen de manifiesto un efecto supresor, que se apreció ya en el día 1, con una respuesta que representó el 52% de la obtenida con los esplenocitos de los animales testigo. En el día 4, el efecto supresor fue más acusado: la respuesta representó el 22% de la proliferación de los cultivos del grupo testigo. Los días 8 y 11, los valores de los esplenocitos de animales tratados, estimulados con LPS, fueron inferiores a la proliferación basal. El día 14 se recuperó la capacidad de proliferar en respuesta al LPS, pero el promedio (53%) siguió siendo significativamente inferior al del grupo testigo.



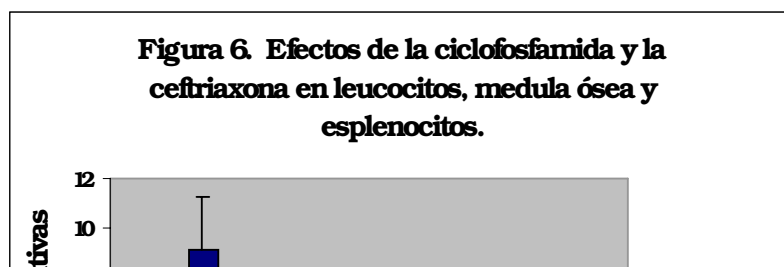
También la linfoproliferación en respuesta a ConA se vio deprimida por el tratamiento con ciclofosfamida (**Figura 5**), pero el efecto sobre las células T fue menos intenso que el observado sobre las células B. Sólo se registró supresión significativa en los días 4 y 8, con unos promedios de proliferación del 14% y 30%, respectivamente, en relación con los animales testigos.



Es interesante resaltar que, en los ensayos realizados a los 8 y 11 días post-tratamiento, se observó que los cultivos de esplenocitos de animales tratados, que no habían sido estimulados *in vitro*, tenían unos valores (basales) de absorbancia claramente superiores a los de los animales testigos (datos no mostrados). Esto revela una considerable actividad blástica en los bazo de los animales tratados, coincidente con el inicio de la fase de esplenomegalia.

#### 4.1.2. Inmunomodulación por ceftriaxona.

Los resultados presentados en la **Figura 6** revelan, en primer lugar, que el tratamiento con ceftriaxona afectó a los recuentos de esplenocitos, produciendo una reducción significativa de los mismos; en cambio, los niveles de leucocitos circulantes y de células nucleadas en médula ósea no sufrieron alteraciones significativas.



Unidades: Leucocitos x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>; células de médula x 10<sup>6</sup> /fémur;  
esplenocitos x10<sup>7</sup> /bazo. Cef: ceftriaxona. Ciclo: ciclofosfamida.  
Ciclo+Cef: ciclofosfamida+ceftriaxona.

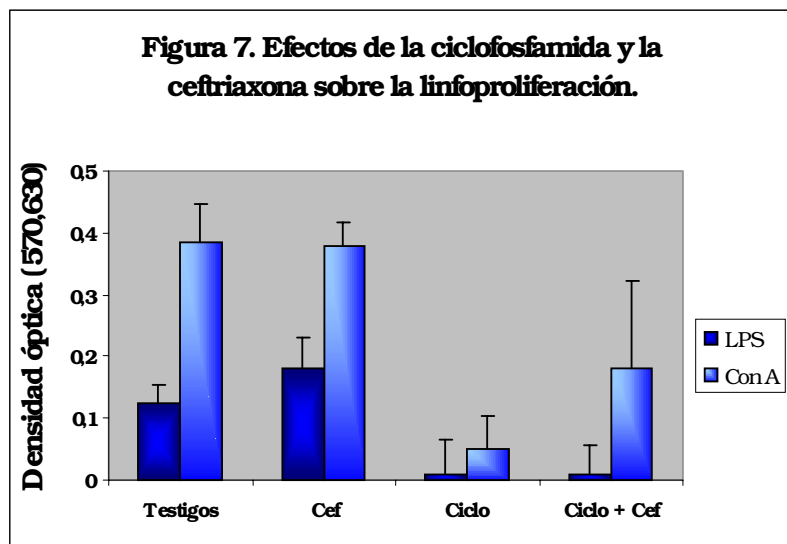
Por su parte, los animales tratados con ciclofosfamida exhibieron el patrón esperado, teniendo en cuenta que el sacrificio se realizó a los 4 días de finalizado el tratamiento inmunosupresor: se observaron leucopenia y disminución de esplenocitos significativos, siendo normales los recuentos de células nucleadas en médula ósea.

Globalmente, la ceftriaxona no modificó de forma significativa ninguno de los recuentos afectados por la ciclofosfamida. El tratamiento combinado acentuó la leucopenia causada por la ciclofosfamida sola e incrementó la celularidad medular pero sin que las diferencias entre ambos grupos llegasen a ser significativas.

La **Figura 7** muestra los resultados de los ensayos de linfoproliferación. El tratamiento con ceftriaxona sola no afectó de forma significativa a las respuestas a LPS y ConA. En concordancia con los resultados previos (establecimiento del modelo), la ciclofosfamida suprimió significativa y drásticamente la linfoproliferación en respuesta a ambos mitógenos. La administración de ceftriaxona a los animales previamente

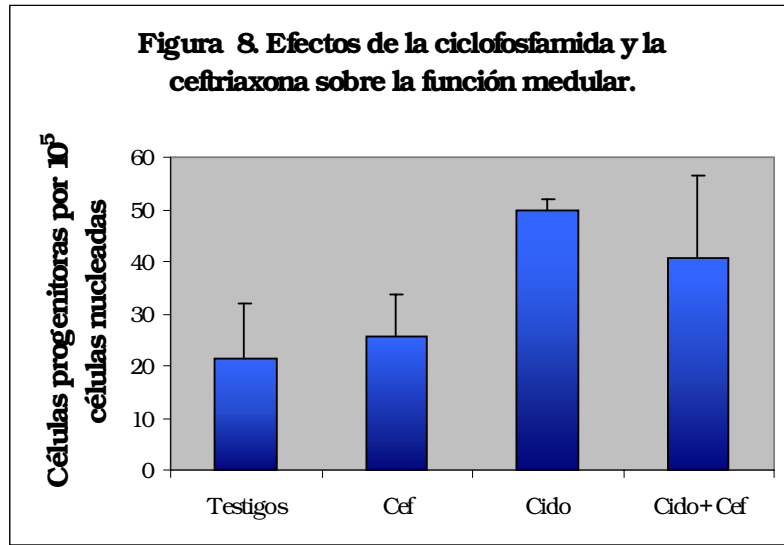
tratados con ciclofosfamida no modificó la supresión de la respuesta a LPS, pero sí afectó a la respuesta a ConA, que se recuperó considerablemente; aún cuando los niveles de proliferación siguieron estando claramente por debajo de los correspondientes a animales testigos, las diferencias ya no alcanzaron la significación estadística. La dispersión de datos en este grupo es responsable de que tampoco se obtuvieran diferencias significativas respecto del grupo que recibió ciclofosfamida sola, aunque el promedio de proliferación sea muy superior en los animales que recibieron el tratamiento combinado.

Los resultados de las medidas de células progenitoras de granulocitos y macrófagos en médula ósea, presentados en la **Figura 8**, evidenciaron un aumento significativo como consecuencia del tratamiento con ciclofosfamida ( $P < 0.01$ ). La administración de ceftriaxona no modificó sensiblemente este parámetro, ni en los animales inmunocompetentes, ni en los previamente inmunosuprimidos.



Cef: ceftriaxona. Ciclo: ciclofosfamida. Ciclo+Cef: ciclofosfamida+ceftriaxona.

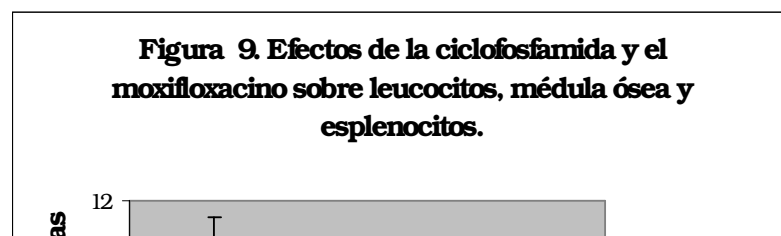




Cef: ceftriaxona. Cido: ciclofosfamida. Cido+Cef: ciclofosfamida+ceftriaxona.

#### 4.1.3. Inmunomodulación por moxifloxacino.

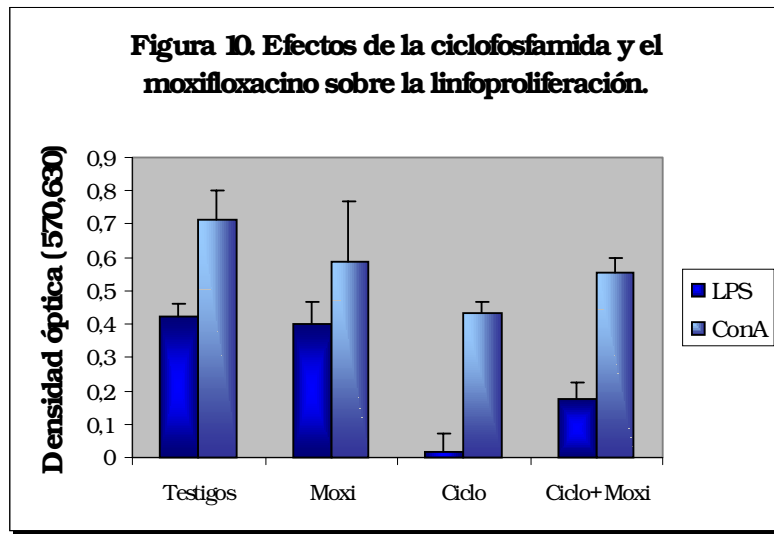
Como se aprecia en la **Figura 9**, el tratamiento con esta fluorquinolona produjo una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) del número de leucocitos circulantes, cuyo promedio bajó a un 62% del promedio obtenido para los testigos. Los valores de células en médula ósea y esplenocitos no sufrieron alteraciones significativas. El tratamiento con ciclofosfamida produjo los acostumbrados descensos en los niveles de leucocitos, células de médula ósea y esplenocitos. Respecto de este grupo, los animales que recibieron el tratamiento combinado de inmunosupresor y antimicrobiano presentaron recuentos significativamente más bajos de leucocitos y esplenocitos (promedios de 58% y 54%, respectivamente;  $P < 0.05$ ).



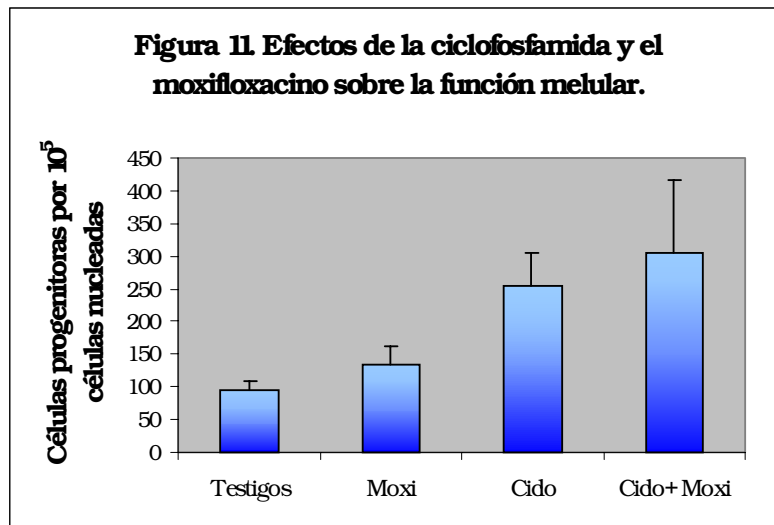
Unidades: Leucocitos x  $10^3/\text{mm}^3$ ; células de médula x  $10^6/\text{fémur}$ ;  
esplenocitos x  $10^7/\text{bazo}$ . Moxi: moxifloxacino. Ciclo: ciclofosfamida.  
Ciclo+Moxi: ciclofosfamida+ moxifloxacino.

La **Figura 10** presenta los resultados de la proliferación de esplenocitos en respuesta a los mitógenos LPS y ConA. Las respuestas de las células de ratones tratados con moxifloxacino no difirieron de forma significativa de las procedentes de animales testigos. La ciclofosfamida suprimió drásticamente ambas respuestas, supresión que fue significativamente atenuada por el tratamiento con moxifloxacino (los promedios de los animales tratados con ambos agentes representaron 1180% de la respuesta a LPS y 128% de la respuesta a ConA de los animales tratados con ciclofosfamida, con valores de  $P < 0.02$  para LPS y  $< 0.01$  para ConA).

En la **Figura 11** se muestran los resultados de medidas de células progenitoras de granulocitos y macrófagos en médula ósea. El tratamiento con moxifloxacino causó una elevación moderada (142%) pero significativa ( $P < 0.05$ ) respecto de los testigos. La ciclofosfamida elevó el recuento hasta un 268% del valor de los testigos ( $P < 0.005$ ). El tratamiento combinado elevó aún más el recuento, pero la diferencia respecto de los animales tratados solo con ciclofosfamida no fue significativa.



Moxi: moxifloxacino. Ciclo: ciclofosfamida.  
Ciclo+Moxi: ciclofosfamida+ moxifloxacino.



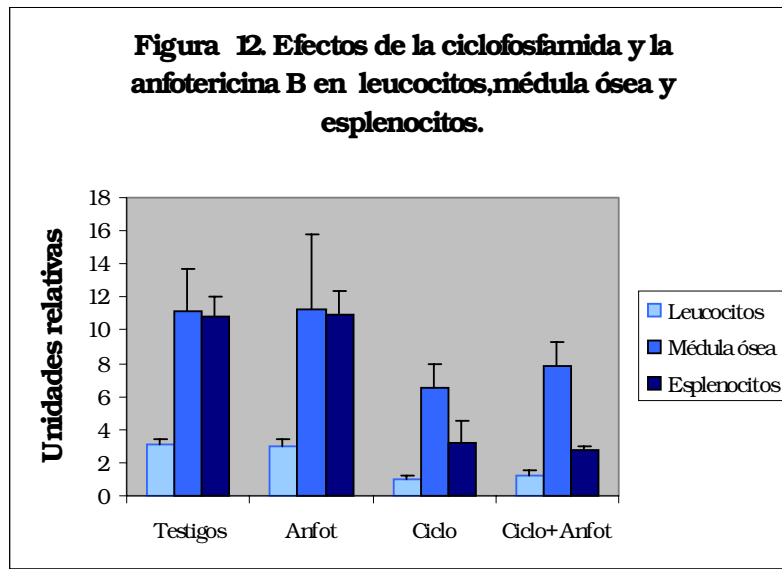
Moxi: moxifloxacino. Ciclo: ciclofosfamida.  
Ciclo+Moxi: ciclofosfamida+ moxifloxacino.

#### 4.1.4. Inmunomodulación por anfotericina B.

El tratamiento con anfotericina B no indujo cambios en los recuentos de leucocitos periféricos, células de médula ósea y esplenocitos de los

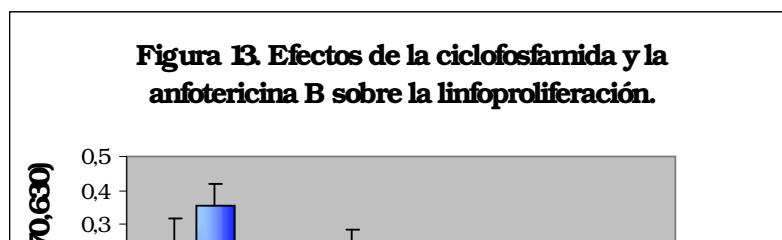
animales testigos, ni tampoco modificó los efectos de la ciclofosfamida sobre estos parámetros (Figura 12).

La proliferación de esplenocitos en respuesta a mitógenos se vio deprimida por la anfotericina B, alcanzando niveles significativos en el caso de la ConA ( $P < 0.05$ ), pero el antifúngico no modificó significativamente las respuestas suprimidas por la ciclofosfamida. Estos datos se presentan en la Figura 13.

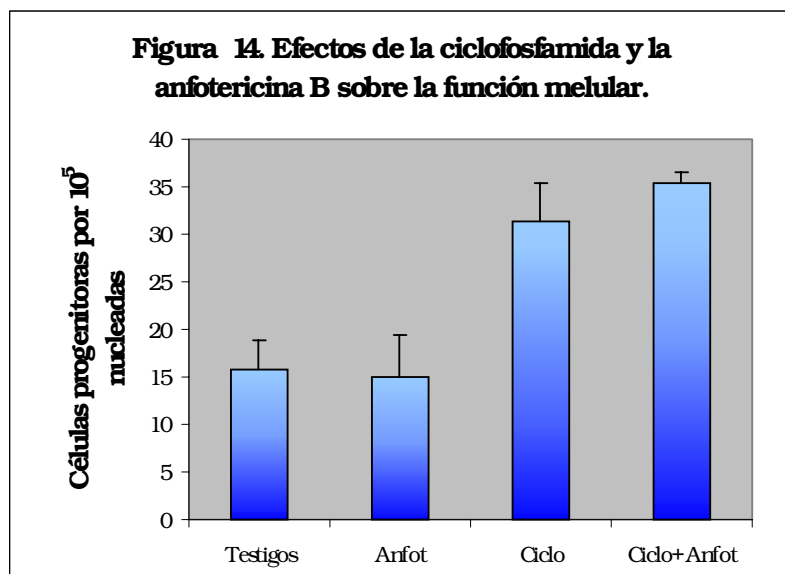


Unidades: Leucocitos  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ; células de médula  $\times 10^6/\text{fémur}$ ; esplenocitos  $\times 10^7/\text{bazo}$ . Anfot: anfotericina B. Ciclo: ciclofosfamida. Ciclo+Anfot: ciclofosfamida+anfotericina B.

En lo que se refiere a las células progenitoras de granulocitos y macrófagos, la ciclofosfamida incrementó el recuento significativamente ( $P < 0.01$ ), pero la anfotericina B no introdujo alteraciones apreciables en ningún caso (Figura 14).



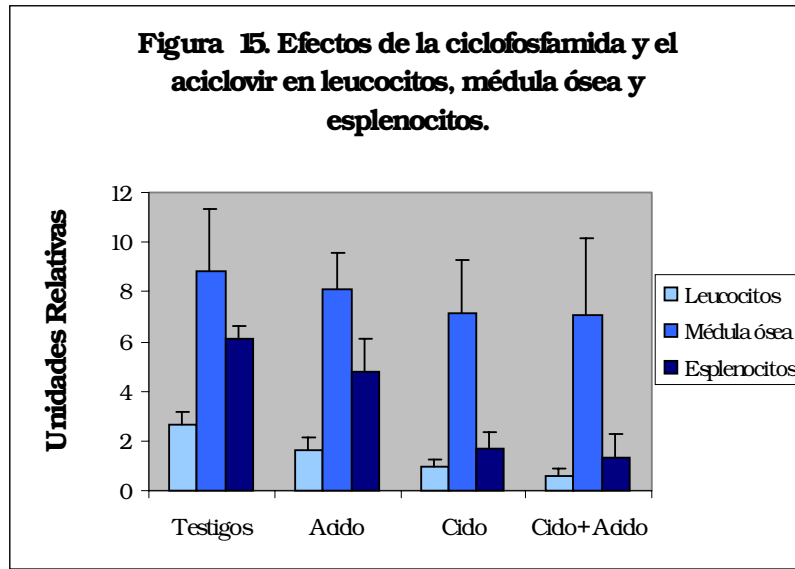
Anfot: anfotericina B. Ciclo: ciclofosfamida.  
Ciclo+Anfot: ciclofosfamida+anfotericina B.



Anfot: anfotericina B. Ciclo: ciclofosfamida.  
Ciclo+Anfot: ciclofosfamida+anfotericina B.

#### 4.1.5. Inmunomodulación por aciclovir.

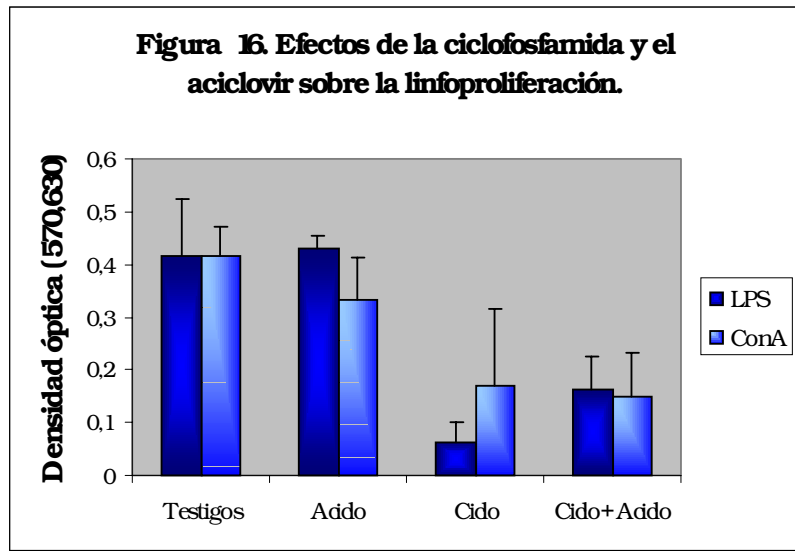
Este agente antiviral causó un significativo descenso en el recuento de leucocitos periféricos, que representó el 61% del promedio en los testigos ( $P < 0.05$ ), pero los niveles de células en médula ósea y de esplenocitos no se vieron alterados, así como tampoco se modificó el efecto de la ciclofosfamida en los tres parámetros (Figura 15).



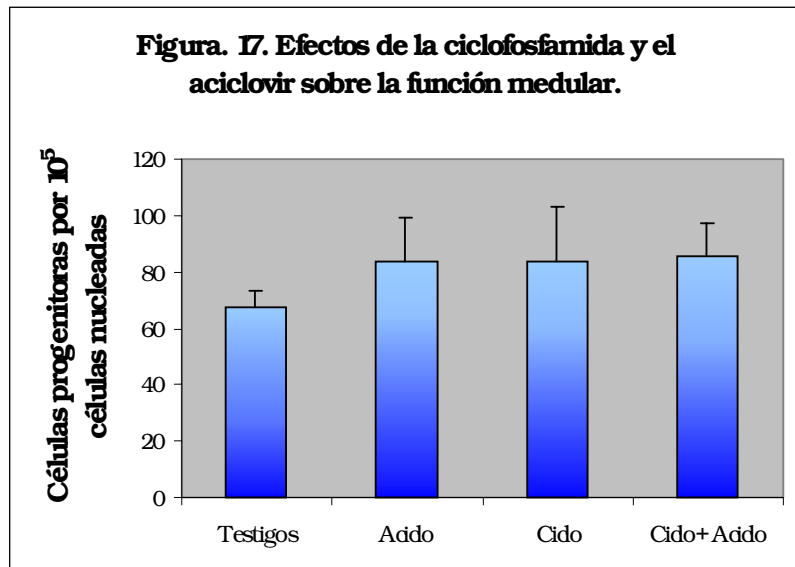
Unidades: Leucocitos  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ; células de médula  $\times 10^6$  /fémur; esplenocitos  $\times 10^7$  /bazo. Aciclo: aciclovir. Cido: ciclofosfamida. Cido+Aciclo: ciclofosfamida+aciclovir.

En la Figura 16 se muestran los datos de los ensayos de proliferación en respuesta a mitógenos. El tratamiento con aciclovir no modificó las respuestas de los esplenocitos de animales inmunocompetentes. En el caso de los suprimidos por ciclofosfamida, el aciclovir tampoco introdujo alteraciones significativas, pero es interesante señalar que la respuesta a LPS mejoró notablemente, aunque sin llegar a diferencias significativas, pero de forma consistente siempre que se repitió el ensayo.

Finalmente, la **Figura 17** muestra los datos de los cultivos de médula ósea. En este caso, ninguno de los tratamientos realizados causó modificaciones significativas.



Aciclo: aciclovir. Cido: ciclofosfamida. Cido+Aciclo: ciclofosfamida+aciclovir.



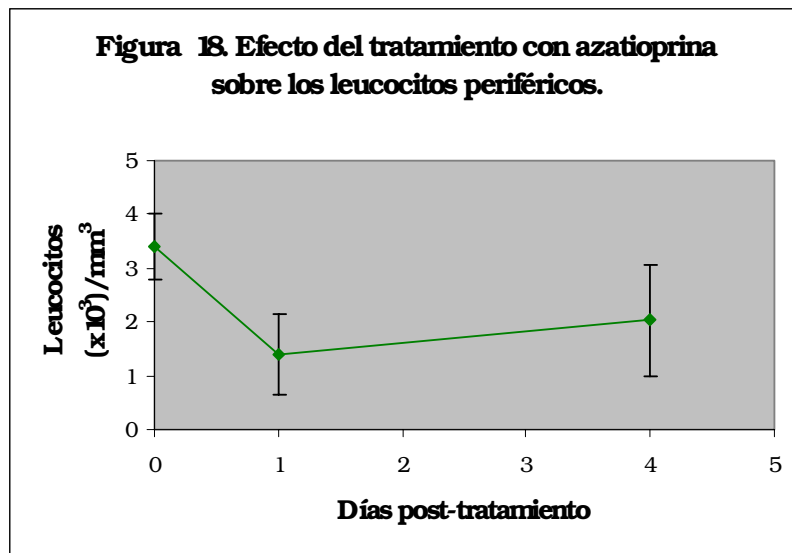
Aciclo: aciclovir. Cido: ciclofosfamida. Cido+Aciclo: ciclofosfamida+aciclovir.

## 4.2. MODELO DE INMUNOSUPRESIÓN CON AZATIOPRINA.

### 4.2.1. Características del modelo.

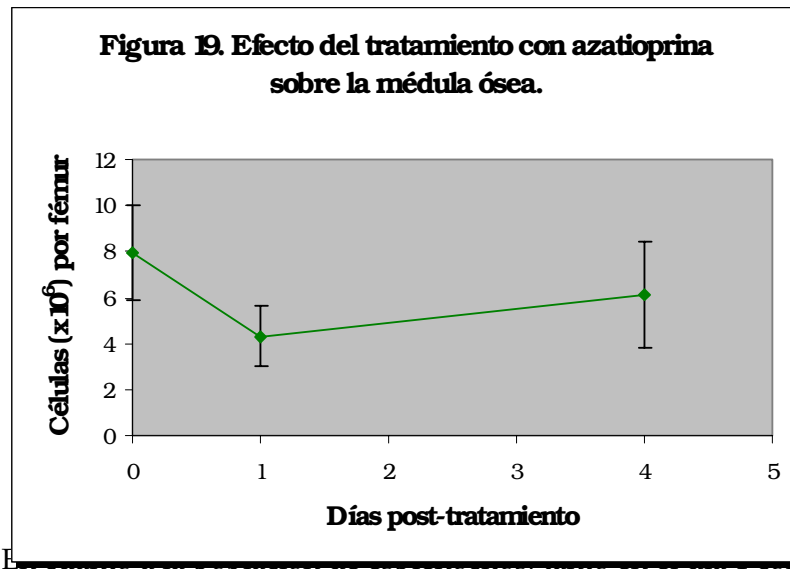
Para conocer la evolución temporal de los parámetros investigados, en el modelo de inmunosupresión con azatioprina, se realizaron medidas de leucocitos circulantes, células nucleadas de médula ósea y esplenocitos en los días 1 y 4 después de la última inyección del agente inmunosupresor.

El tratamiento indujo una significativa leucopenia en ambos días, con valores que representaron el 41% y 59% de los correspondientes a los testigos (Figura 18).

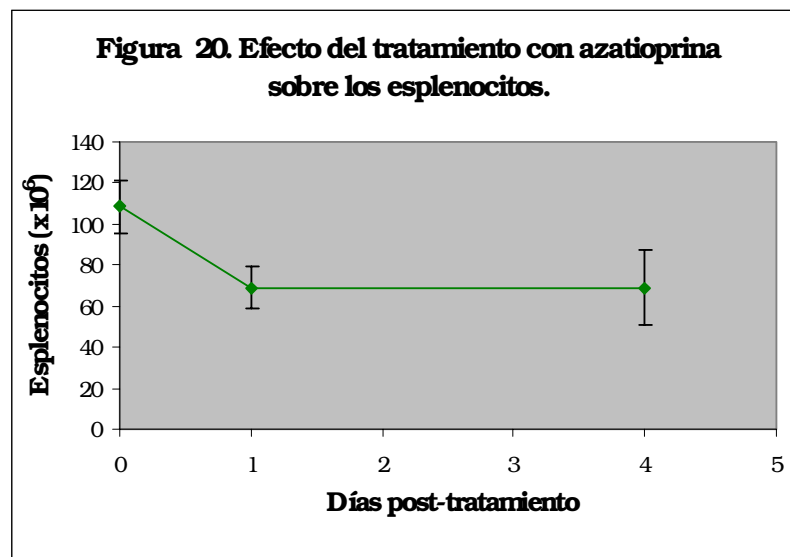




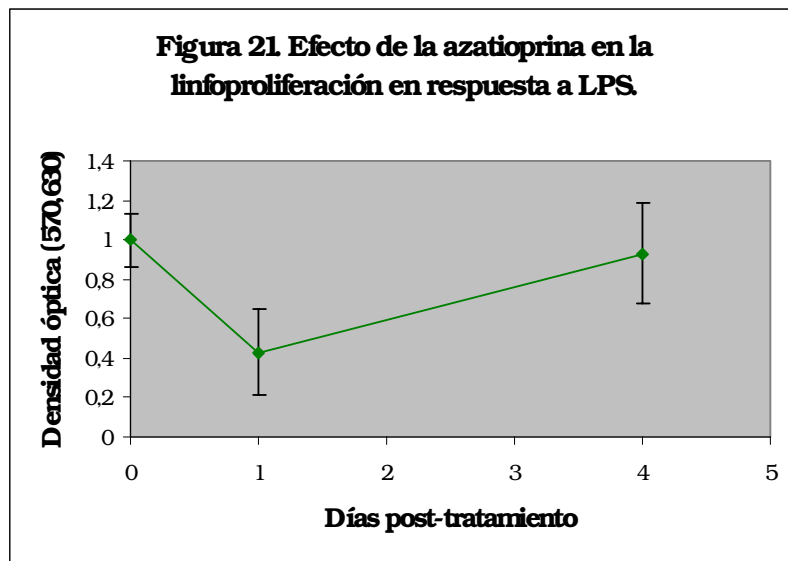
La azatioprina mostró una moderada mielotoxicidad, reduciendo el recuento de células nucleadas a un 54% de los testigos, en el día 1. Las diferencias en el día 4 no fueron significativas (Figura 19).



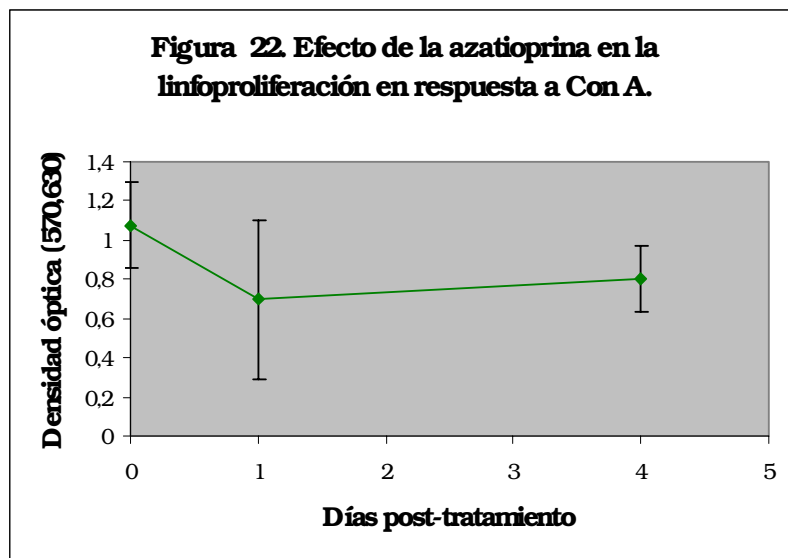
En el día 4 se obtuvieron recuentos que representaron el 63% del valor promedio en los animales testigos (Figura 20).



El tratamiento con azatioprina deprimió significativamente ( $P < 0.05$ ) la proliferación de los esplenocitos en respuesta a LPS en el día 1 post-tratamiento, rebajándola a un 43% respecto de la respuesta de los testigos (Figura 21). En el día 4 el efecto supresor se atenuó y la diferencia no fue significativa.



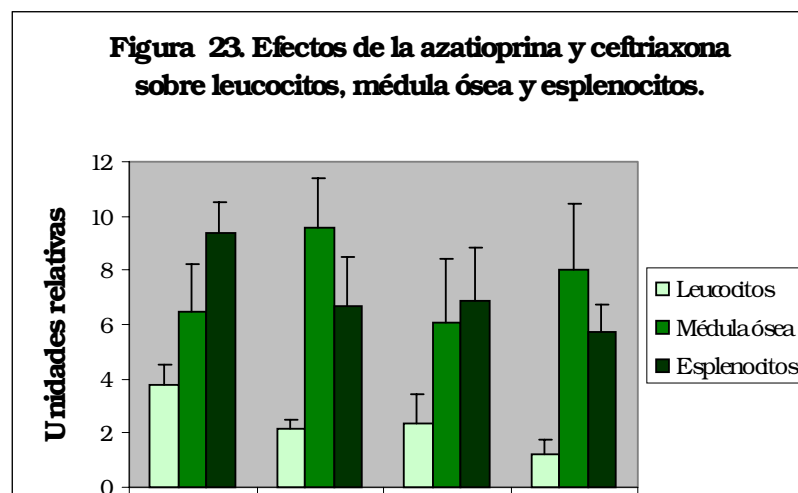
La respuesta de los esplenocitos a ConA se vio asimismo suprimida significativamente ( $P < 0.05$ ) en los días 1 y 4, representando el 65% y 75% de la respuesta de los animales testigos, respectivamente (Figura 22).



#### 4.2.2. Inmunomodulación por ceftriaxona.

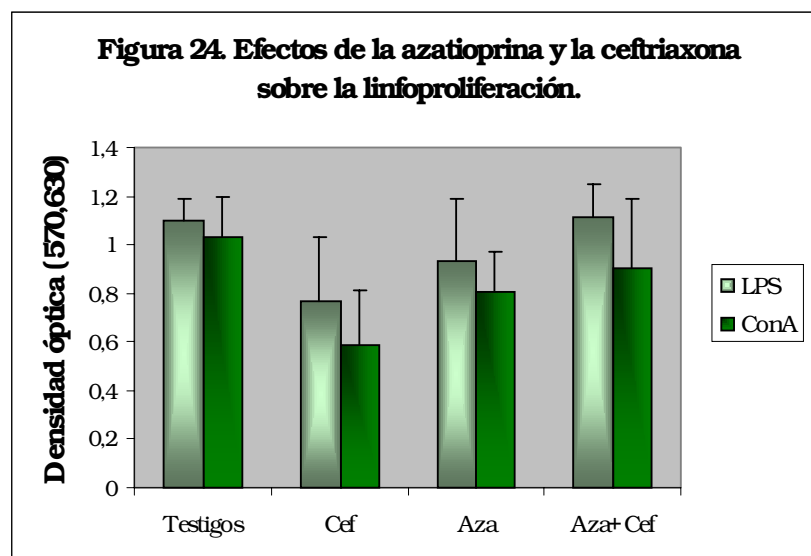
El tratamiento con ceftriaxona moduló los recuentos de leucocitos periféricos, células nucleadas de médula ósea y esplenocitos de forma cualitativamente similar a lo observado en los ensayos descritos en el apartado 4.1.2, con la salvedad de que, al ser menores las desviaciones en estas medidas, los descensos de leucocitos y esplenocitos fueron estadísticamente significativos, así como el incremento de células de médula ósea ( $P < 0.05$  en todos los casos) (Figura 23).

En la misma Figura 23 se observa que los resultados del tratamiento con azatioprina fueron consistentes con lo descrito en el estudio de evolución temporal (datos correspondientes al día 4). En los animales sujetos al tratamiento combinado, la leucopenia inducida por azatioprina fue algo más acusada, pero sin diferencias significativas; en compensación, los valores de células nucleadas de médula ósea se elevaron, pero tampoco fueron significativos respecto de los testigos ni de los tratados con azatioprina sola; finalmente, se mantuvo la disminución de esplenocitos debida a la azatioprina.



Unidades: Leucocitos x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>; células de médula x 10<sup>6</sup> /fémur;  
esplenocitos x10<sup>7</sup> /bazo. Cef: ceftriaxona. Aza: azatioprina.  
Aza+Cef: azatioprina+ceftriaxona.

Los efectos sobre la proliferación de esplenocitos en respuesta a mitógenos se muestran en la **Figura 24**. El tratamiento con ceftriaxona indujo una supresión significativa ( $P < 0.05$ ) de la respuesta a ConA. En los ensayos anteriores (apartado 4.1.2), este efecto no fue significativo; en todos los parámetros medidos, la ceftriaxona se mostró más activa en este grupo de ensayos. La combinación de azatioprina y ceftriaxona no produjo cambios significativos en ninguna de las respuestas, ni respecto de los animales tratados con azatioprina, ni de los testigos.

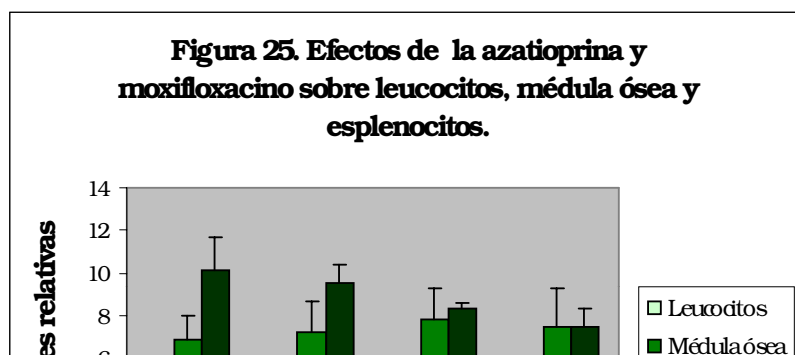


Cef: ceftriaxona. Aza: azatioprina. Aza+Cef: azatioprina+ceftriaxona.

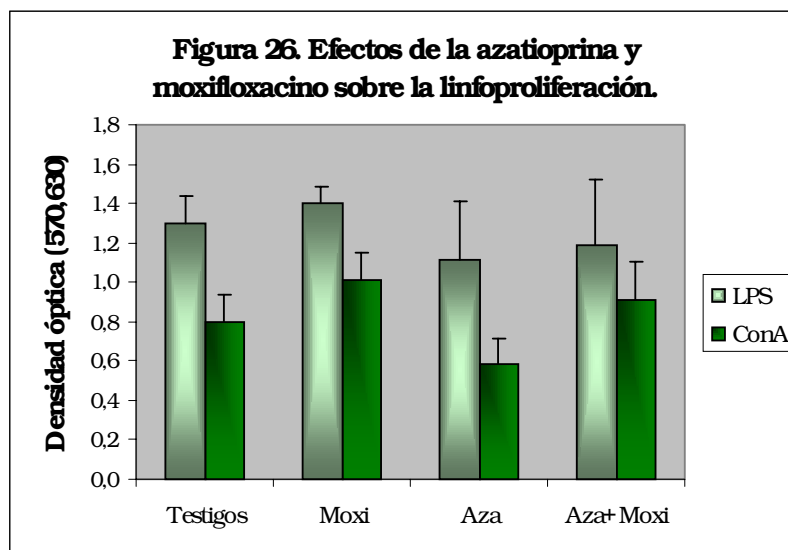
#### 4.2.3. Inmunomodulación por moxifloxacino.

Tal como se describió en el apartado 4.1.3, el tratamiento con moxifloxacino disminuyó significativamente el recuento de leucocitos periféricos, que descendió al 51% ( $P < 0.01$ ). La azatioprina también causó leucopenia significativa, como era de esperar. Cuando los ratones tratados con azatioprina recibieron moxifloxacino, no se registró ninguna modificación de interés sobre los efectos propios del tratamiento inmunosupresor. Estos resultados se presentan en la **Figura 25**.

La **Figura 26** presenta los resultados de los ensayos de respuesta a mitógenos. Como se observó en las experiencias descritas en 4.1.3, el tratamiento con moxifloxacino no alteró las respuestas a LPS ni a ConA. La respuesta a ConA de los esplenocitos de animales tratados con azatioprina representó el 73% de la de los testigos. Sin embargo, el tratamiento adicional con moxifloxacino eliminó este efecto supresor: la respuesta a ConA de los esplenocitos de animales sometidos al tratamiento combinado fué 126% de la de los animales testigos, y 173% respecto de la de los tratados con azatioprina solo; las diferencias entre los tratados con el agente supresor y los que recibieron el tratamiento combinado rozó la significación.



Unidades: Leucocitos  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ; células de médula  $\times 10^6$  /fémur;  
 esplenocitos  $\times 10^7$  /bazo. Moxi: moxifloxacino. Aza: azatioprina.  
 Aza+Moxi: azatioprina+moxifloxacino.

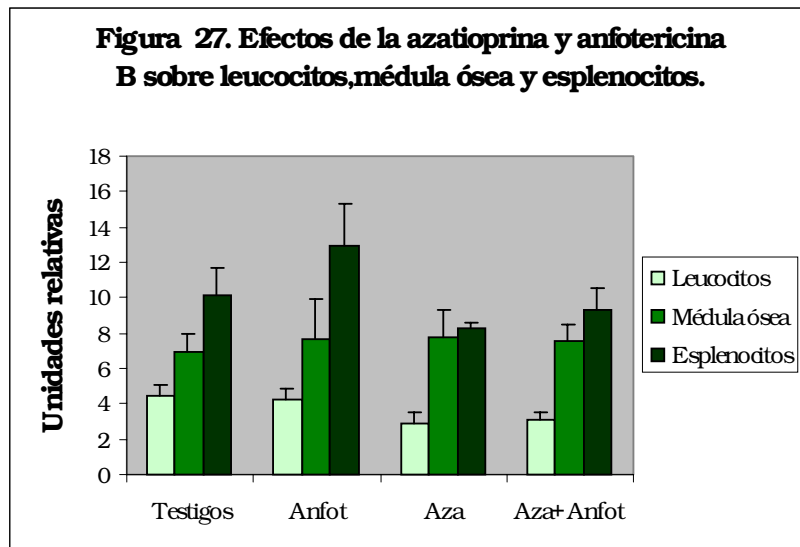


Moxi: moxifloxacino. Aza: azatioprina. Aza+Moxi: azatioprina+moxifloxacino.

#### 4.2.4. Inmunomodulación por anfotericina B.

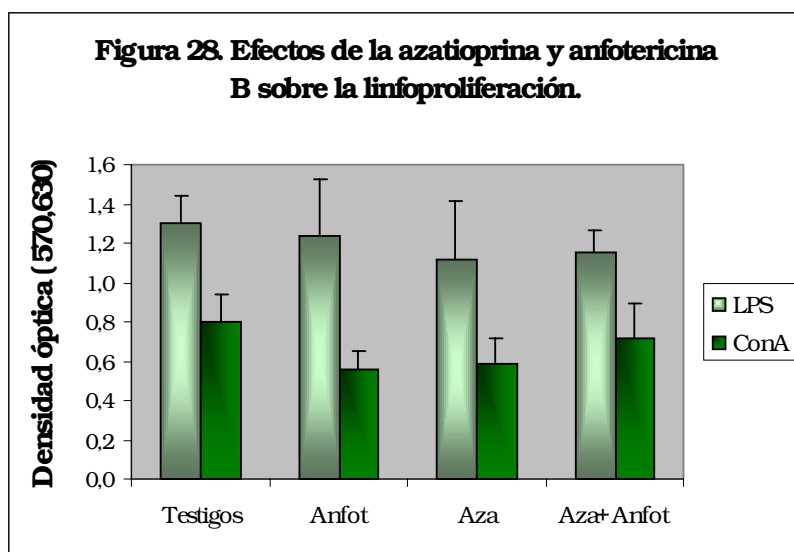
Como se aprecia en la **Figura 27**, el tratamiento con anfotericina B no modificó de forma significativa los recuentos de leucocitos circulantes, células nucleadas de médula ósea y esplenocitos. La leucopenia significativa inducida por azatioprina no fue modificada por el tratamiento

combinado (el descenso de leucocitos siguió siendo significativo respecto de los testigos, pero no hubo diferencias apreciables respecto de los que recibieron azatioprina sola); en los otros recuentos, ni azatioprina ni el tratamiento combinado introdujeron alteraciones sustanciales.



Unidades: Leucocitos  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ; células de médula  $\times 10^6$  /fémur; esplenocitos  $\times 10^7$  / bazo. Anfot: anfotericina B. Aza: azatioprina.  
Aza+Anfot: azatioprina+anfotericina B.

Las respuestas de proliferación se muestran en la **Figura 28**. El tratamiento con anfotericina B ejerció una moderada pero significativa supresión de la respuesta a ConA, comparable a la inducida por azatioprina. Este comportamiento del agente antifúngico coincidió con el observado en los ensayos anteriores (apartado 4.1.4). Curiosamente, el efecto supresor de la combinación de ambos tratamientos no alcanzó niveles significativos.



Anfot: anfotericina B. Aza: azatioprina. Aza+Anfot: azatioprina+anfotericina B.

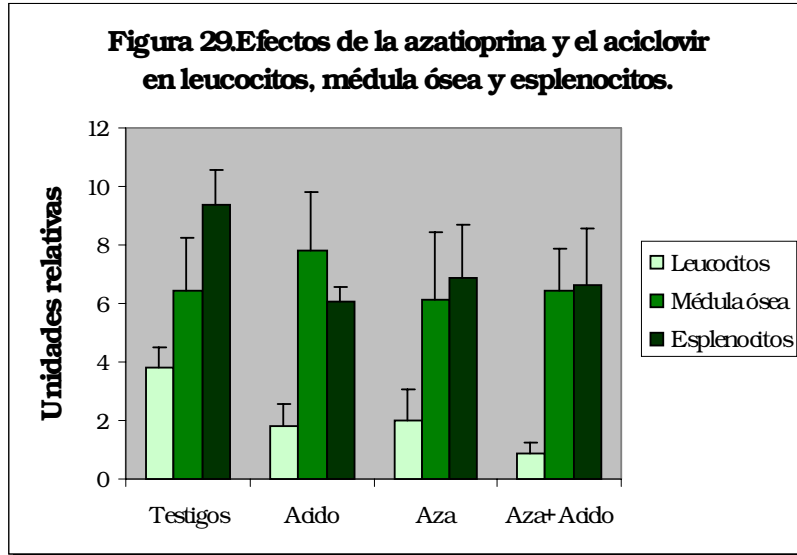
#### 4.2.5. Inmunomodulación por aciclovir.

La **Figura 29** muestra que el aciclovir indujo leucopenia significativa (representó el 39.5% respecto de los testigos,  $P < 0.01$ ), tal y como se había observado en los ensayos anteriores (apartado 4.1.5); además, en este caso, el efecto reductor sobre el número de esplenocitos (que alcanzó solo un 65% del promedio de los testigos) llegó también a la significación ( $P < 0.01$ ). El tratamiento con azatioprina redujo los leucocitos a un 53.3% respecto de los testigos ( $P < 0.05$ ); el tratamiento combinado agravó esta situación (la población representó solo un 23% de la obtenida en testigos,  $P < 0.001$ ). Las alteraciones en el resto de los parámetros no alcanzaron niveles significativos.

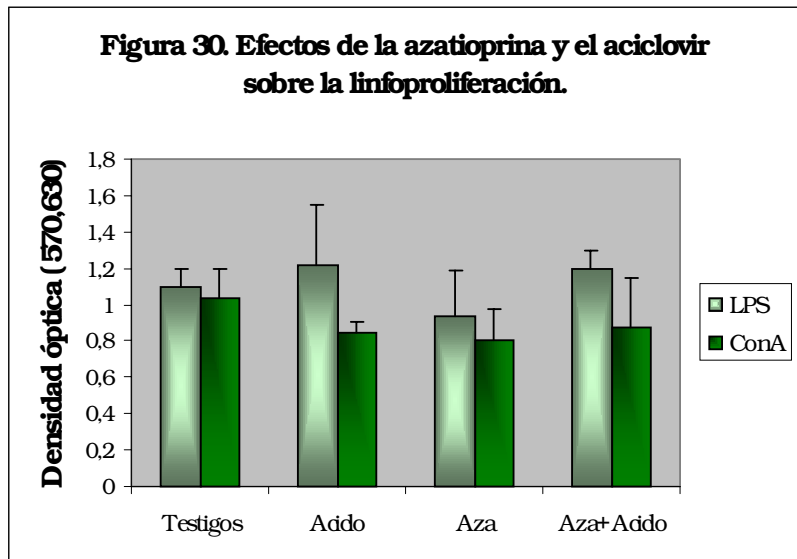
En la **Figura 30** se observa que ninguno de los tratamientos indujo cambios significativos sobre la proliferación de esplenocitos en respuesta a mitógenos. En este ensayo, el tratamiento con azatioprina deprimió la



respuesta a ConA, respecto de los testigos, pero sin alcanzar significación estadística; el tratamiento combinado se alejó de la significación.



Unidades: Leucocitos x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>; células de médula x 10<sup>6</sup> /fémur; esplenocitos x10<sup>7</sup> /bazo. Aciclo: aciclovir. Aza: azatioprina. Aza+Aciclo: azatioprina+aciclovir.

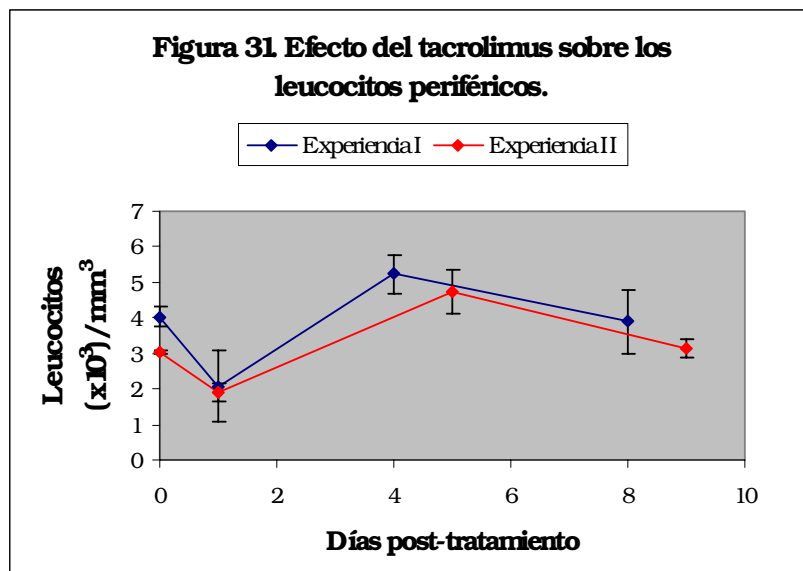


Aciclo: aciclovir. Aza: azatioprina. Aza+Aciclo: azatioprina+aciclovir.

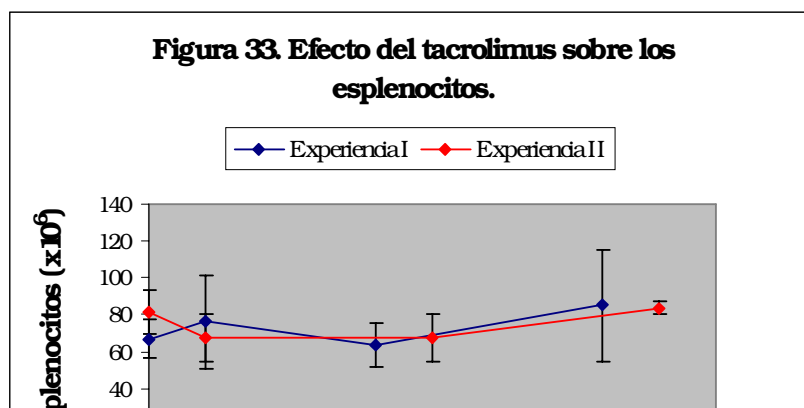
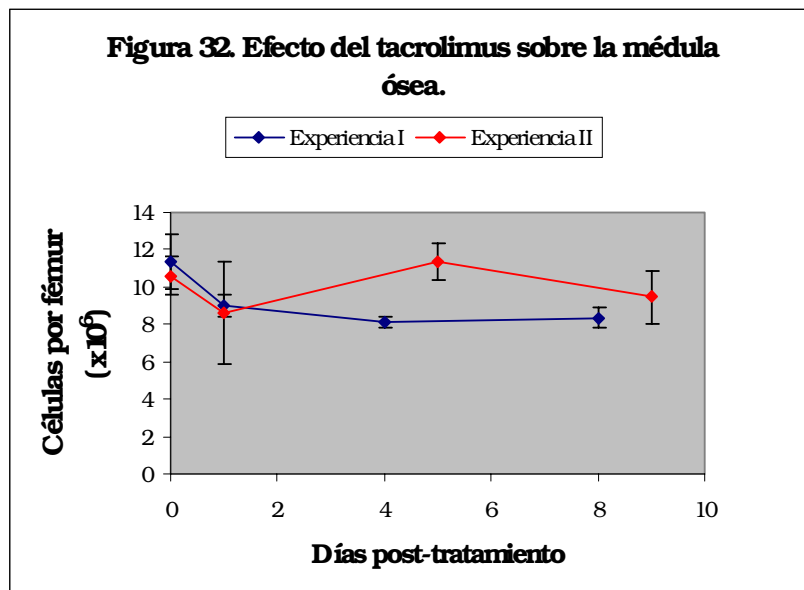
### 4.3. MODELOS DE INMUNOSUPRESIÓN CON TACROLIMUS.

#### 4.3.1. Características del modelo *ex vivo*.

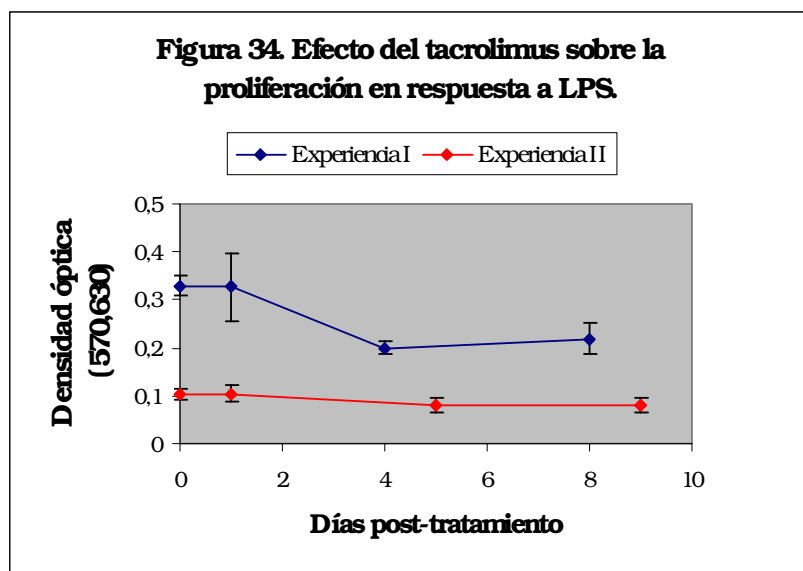
En este apartado se presentan datos de dos experimentos representativos de nuestro estudio previo de las características del modelo de supresión por tacrolimus. La **Figura 31** recoge las medidas de leucocitos circulantes: en el día 1 después de finalizado el tratamiento inmunosupresor, se observó leucopenia que en uno de los experimentos alcanzó significación ( $P < 0.005$ ), con una población que representó el 63% de los testigos, mientras que en el otro, aunque el descenso fue más pronunciado (solo persistió el 52% de la población de leucocitos), el valor de  $P$  no alcanzó la significación. En ambos experimentos, tras la leucopenia se observó leucocitosis: la población se elevó hasta un 130% en el día 4 ( $P < 0.05$ ), en un experimento, y hasta un 157% en el día 5 ( $P < 0.02$ ) en el otro. En los días 8 y 9, correspondientes a los dos experimentos, los valores no difirieron sensiblemente de los obtenidos con los testigos.



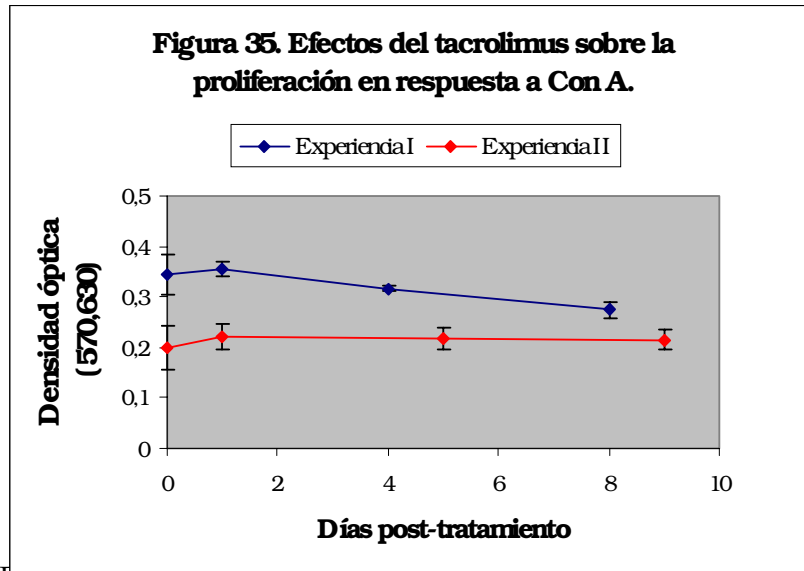
La Figura 32 presenta los recuentos de células nucleadas en médula ósea y la Figura 33 los recuentos de esplenocitos. En ninguno de los dos experimentos, se observaron alteraciones significativas de estos parámetros.



La **Figura 34** se refiere a los ensayos de proliferación de esplenocitos en respuesta a LPS. En el experimento en el cual se realizaron medidas en los días 1, 4 y 8, la respuesta a LPS se vio significativamente deprimida los dos últimos días, con valores porcentuales del 61% ( $P < 0.005$ ) en el día 4 y del 67% ( $P < 0.02$ ) en el día 8. En el otro experimento, los valores porcentuales fueron 78% en el día 5 y 77% en el día 9, rozando en ambos casos la significación estadística.



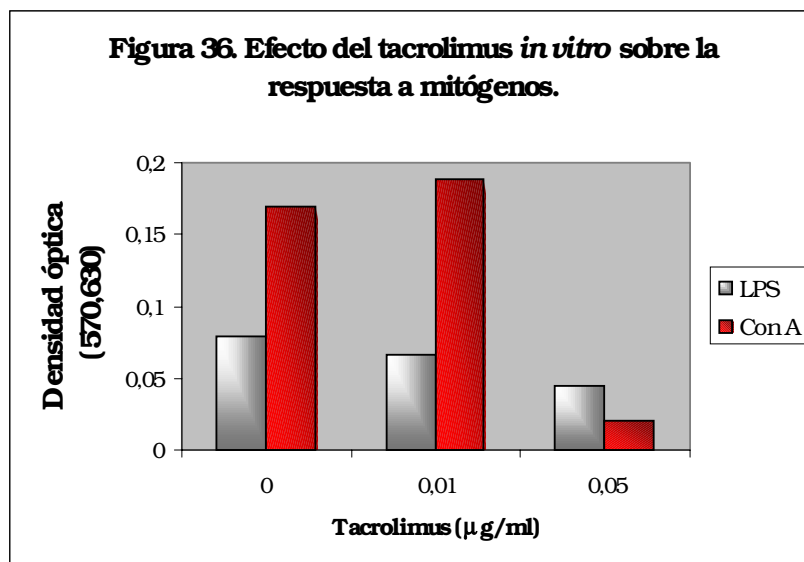
Finalmente, la proliferación en respuesta a ConA no se vio afectada sensiblemente en ninguno de los experimentos (Figura 35).



El examen de los resultados obtenidos en el desarrollo del modelo *ex vivo* lo reveló como poco apropiado para el ensayo de la inmunomodulación por agentes antimicrobianos. La leucopenia fué moderada y fugaz, y de los otros parámetros investigados, solo la proliferación de esplenocitos en respuesta a LPS se vio afectada, lo cual pareció poco consistente, en principio, con el mecanismo de acción del tacrolimus, que actúa inhibiendo la transcripción del gen que codifica IL-2, y que, por tanto, debe actuar principalmente como un supresor de células T. Estos aspectos se considerarán con más extensión en el capítulo de Discusión; baste aquí consignar que la bibliografía recoge algunas aportaciones señalando que el efecto inmunosupresor del tacrolimus *in vivo* no siempre se manifiesta *ex vivo* [Lemster *et al.*, 1993], por lo que no insistimos en este modelo. Pero la importancia de este agente inmunosupresor, ampliamente utilizado desde los años 80 en los protocolos de control de rechazo de aloinjertos y en la terapia de algunas patologías autoinmunes, nos llevó a diseñar un modelo de estudio *in vitro*, contando con la experiencia positiva al respecto de otros autores [Andersson *et al.*, 1992; Saada *et al.*, 1996].

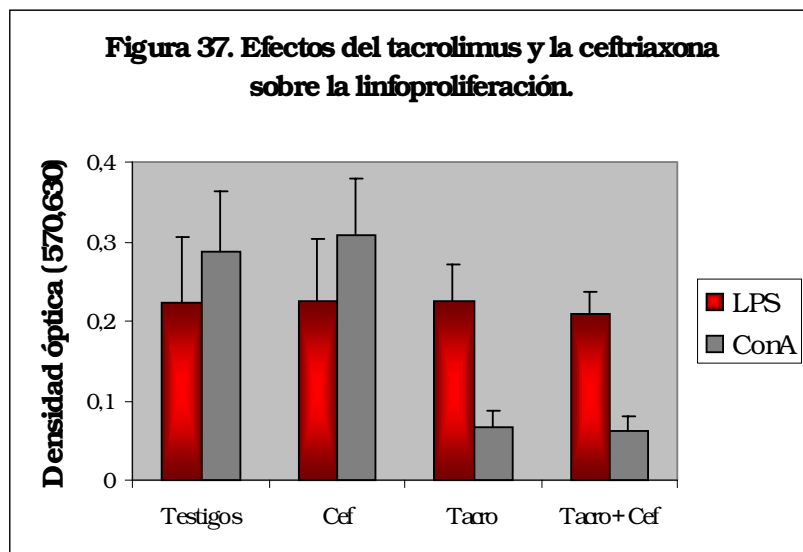
#### 4.3.2. Características del modelo *in vitro*.

En pruebas preliminares, se investigó la influencia de diversas concentraciones de tacrolimus sobre la proliferación de esplenocitos en respuesta a mitógenos. Un ensayo representativo de los realizados se muestra en la **Figura 36**, donde se comparan dos concentraciones, 0.01 y 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . En este ensayo, la concentración de 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rebajó la respuesta al LPS a un 56% y a la ConA, hasta un 12%. La drástica supresión de la proliferación en respuesta a ConA conseguida, de forma consistente, con esta dosis, nos llevó a elegirla para las posteriores pruebas con agentes antimicrobianos.

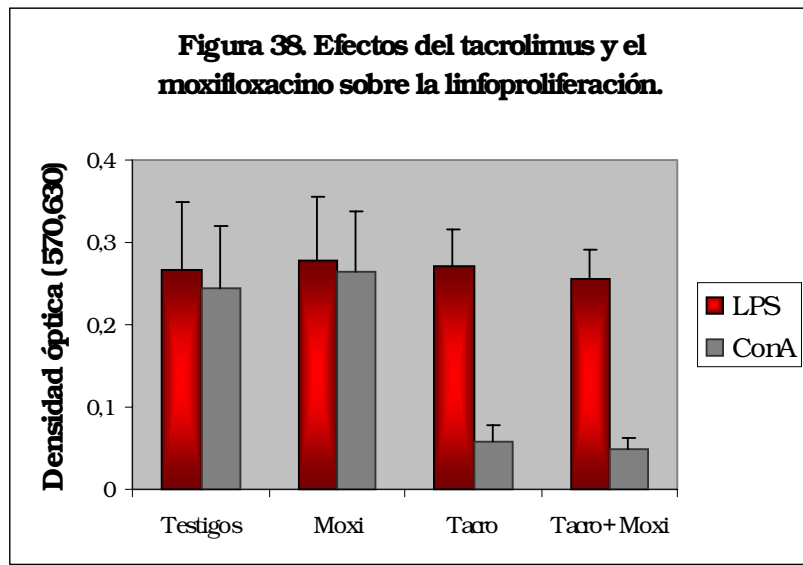


#### 4.3.3. Efectos de las combinaciones de tacrolimus y antimicrobianos *in vitro*.

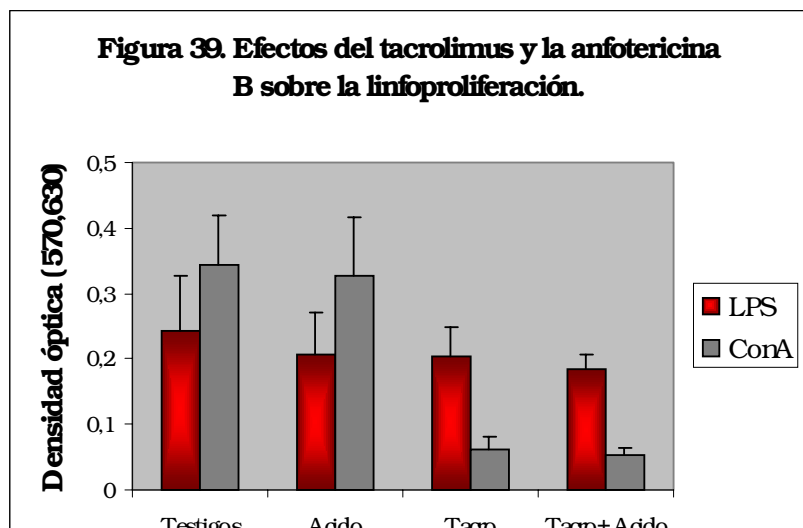
El análisis de los resultados de los ensayos *in vitro* de ceftriaxona (Figura 37), moxifloxacino (Figura 38), anfotericina B (Figura 39) y aciclovir (Figura 40) reveló, en todos los casos, el efecto supresor del tacrolimus sobre la proliferación en respuesta a ConA, siempre con valores significativos ( $P < 0.05$  para todos los experimentos). Ninguno de los agentes antimicrobianos estudiados alteró de forma significativa la proliferación frente a LPS o ConA, ni tampoco modificaron la supresión de la respuesta a ConA cuando se combinaron con tacrolimus.



Cef: ceftriaxona. Tacro: tacrolimus. Tacro+Cef: tacrolimus+ceftriaxona.

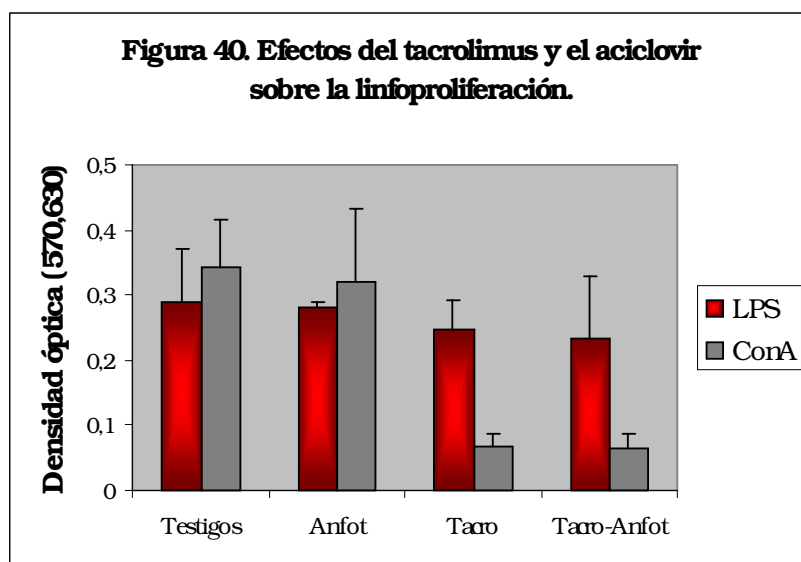


Moxi: moxifloxacino. Tacro: tacrolimus. Tacro+Moxi: tacrolimus+moxifloxacino.





Aciclo: aciclovir. Tacro: tacrolimus. Tacro+Aciclo: tacrolimus+aciclovir.



Anfot: anfotericina B. Tacro: tacrolimus. Tacro+Anfot: tacrolimus+anfotericina B.



## 5. DISCUSIÓN



En la presente Memoria de Tesis Doctoral, se ha investigado la actividad inmunomoduladora de cuatro agentes antimicrobianos, en ratones BALB/c intactos y sometidos a tratamiento inmunosupresor. Los agentes antimicrobianos se han elegido entre los que se utilizan frecuentemente en protocolos de prevención y tratamiento de infecciones en individuos inmunocomprometidos: dos antibacterianos, ceftriaxona y moxifloxacino; un antifúngico, anfotericina B; y un antiviral, aciclovir.

## 5.1. MODELOS DE INMUNOSUPRESION ESTUDIADOS.

### 5.1.1. Inmunosupresión por ciclofosfamida.

La utilización de la ciclofosfamida para conseguir modelos experimentales de neutropenia es muy frecuente, como se desprende de la numerosa bibliografía al respecto. En algunos casos, el tratamiento inmunosupresor es necesario para conseguir que un animal de experimentación se vuelva apropiadamente susceptible a un determinado agente patógeno; otras veces, se pretende reproducir situaciones clínicas de inmunocompromiso y mielosupresión. Algunos ejemplos seleccionados de la abundante bibliografía al respecto pueden ilustrar estos aspectos. Así, Denning *et al.* [1995] han descrito un modelo de aspergilosis pulmonar y diseminada en ratones neutropénicos, como consecuencia del

pretratamiento con una única dosis de ciclofosfamida (200 mg/Kg); este modelo es útil para el ensayo de la actividad terapéutica de nuevos agentes antifúngicos [Denning *et al.*, 1995; Oakley *et al.*, 1997]. La leucopenia inducida por ciclofosfamida permite producir en el ratón infecciones experimentales con diversas bacterias patógenas que plantean serios problemas en clínica humana (*E. coli*, *P. aeruginosa*, cepas meticilino-resistentes de *S. aureus*) y ensayar la eficacia de nuevos agentes antimicrobianos en comparación con otros ya establecidos (p.e., la nueva fluoroquinolona clinafloxacino comparada con ciprofloxacino o imipenem/cilastatina) [Shapiro *et al.*, 1997]. También se ha recurrido a estos modelos de mielotoxicidad inducida por ciclofosfamida en ratón para ensayar la eficacia *in vivo* de factores estimuladores de la función medular, que puedan ser útiles en clínica para acelerar la mielopoyesis y mejorar los cuadros de neutropenia [Fine *et al.*, 1997]. El protocolo de inmunosupresión utilizado en el presente trabajo, fue tomado de estudios sobre quimioterapia experimental que utilizaban la inmunosupresión como herramienta para conseguir los necesarios modelos de infección: Sanati *et al.* [1997] y Andes y Craig [1998] recurrieron a la inducción de neutropenia con dos inyecciones, de 150 mg/Kg y 100 mg/Kg, separadas por un intervalo de tres días, para estudiar la eficacia del fluconazol, comparado con anfotericina B, frente a candidiasis invasiva, y la actividad de la amoxicilina sola o combinada con clavulánico frente a la infección con *S. pneumoniae*, respectivamente.

Desafortunadamente, a efectos de comparación, este tipo de estudios no suele proporcionar información sobre las características de la inmunosupresión conseguida por los distintos tratamientos con ciclofosfamida. Según Chin *et al.* [1986], la neutropenia inducida por tres inyecciones de 150 mg/Kg de ciclofosfamida en días alternos, persistió siete días después de la última inyección, pero la publicación no suministra ningún dato numérico al respecto. En nuestras manos, el efecto de este

tratamiento fue menos persistente, ya que el día 6 post-tratamiento los niveles de leucocitos ya alcanzaban la normalidad [Amat, 2001]. Por su parte, Sanati *et al.* [1997], que utilizaron el tratamiento seguido en el presente trabajo, afirman que, al día siguiente a la última inyección, los recuentos de neutrófilos fueron inferiores a 500 células/mm<sup>3</sup>, sin señalar la duración de este efecto; en cambio, Andes y Craig [1998], usando el mismo protocolo, no indican los niveles leucocitarios pero señalan que la neutropenia duró 5 días. Estos datos son bastante aproximados a los nuestros, aunque en nuestras series, la neutropenia en el día 1 post-tratamiento, estimada a partir de nuestros datos de leucocitos totales periféricos, no alcanzó, por término medio, valores tan bajos. En su trabajo anteriormente citado, Sanati *et al.* [1997] usaron también ratones BALB/c, pero eran machos de 20 a 25 g; no puede excluirse que la diferencia de sexo y peso tenga alguna influencia en la intensidad de la neutropenia.

En términos generales, comparando las relaciones dosis/efecto descritas en la bibliografía y las observadas en nuestros propios ensayos, con las indicadas para terapia humana (incluidas en los prospectos de casas comerciales), se observa que estas son sensiblemente más reducidas, si bien los tratamientos son más prolongados. Por ejemplo, en el tratamiento de tumores humanos como linfomas, leucemias, mielomas, adenocarcinoma ovárico y otros, se recomiendan, para adultos, dosis de inducción de 40 a 50 mg/Kg en dosis divididas en un período de 2 a 5 días.

El modelo utilizado en nuestro trabajo causa leucopenia y mielosupresión de una duración suficiente (al menos cuatro días post-tratamiento) como para que, a continuación del tratamiento con ciclofosfamida, puedan realizarse tratamientos cortos con agentes antimicrobianos, a fin de ensayar sus propiedades inmunomoduladoras en situación de inmunocompromiso. Además, los efectos son relativamente moderados lo que elimina el riesgo de mortalidad en los animales tratados.

A efectos de la determinación del momento en que se puede iniciar el tratamiento con el agente problema, en animales inmunosuprimidos, pero sin que persistan niveles altos de ciclofosfamida que puedan interferir con la acción propia del agente investigado, debe tenerse presente que la vida media plasmática de la ciclofosfamida es de aproximadamente siete horas [Chabner *et al.*, 1996 ].

Entre las características interesantes del modelo seleccionado, cabe mencionar el efecto difásico sobre el número de esplenocitos. La despoblación inicial parece excesiva para atribuirla a la capacidad de la ciclofosfamida para eliminar las células linfoides en proliferación, dado que en el bazo de animales sanos, no sometidos a procesos de inmunización, no hay razón para que exista un número tan grande de células proliferativas. Pero hay que tener en cuenta la dinámica de las poblaciones linfocitarias. La vida media de los linfocitos B vírgenes en el bazo ha sido estimada en sólo 2 días (en el caso de las células B memoria es sensiblemente mayor), por lo que cualquier efecto mielotóxico, que afecte a los precursores de las células B en médula ósea, se refleja con gran rapidez en el contenido de células B en el bazo [Kincade y Gimble, 1989]. En el caso de las células T, la situación es distinta, ya que su vida media se prolonga meses [Sprent, 1989]. Por tanto, la disminución esplénica debida a ciclofosfamida debe atribuirse, principalmente, a la ausencia de reposición de las células B perdidas de forma natural; sería interesante confirmar esta hipótesis mediante un análisis citofluorimétrico de las poblaciones esplénicas en los animales tratados.

En nuestros experimentos, la esplenomegalia tardía que sobrevino como consecuencia del tratamiento con ciclofosfamida vino precedida de elevados valores basales de proliferación celular (datos no mostrados; ver Amat [2001]), reflejando la presencia de gran cantidad de células blásticas en el bazo de los animales tratados. Hay varias interpretaciones para este



hecho. En primer lugar, aunque en condiciones normales las células que abandonan el compartimento hematopoyético (médula roja) son células maduras (con la excepción de las células pre-T, que colonizan el timo), la ciclofosfamida estimula la presencia de células madre en sangre [Bezwoda *et al.*, 1994], lo que pudiera traducirse en la llegada de células blásticas a los órganos linfoides periféricos. Pero también hay que considerar que, durante la fase de leucopenia, los animales están expuestos a infecciones oportunistas, que pueden originar una intensa estimulación antigénica y la consiguiente proliferación de linfoblastos en el tejido linfoide periférico.

El efecto supresor del tratamiento con ciclofosfamida, a corto plazo, sobre la linfoproliferación en respuesta a LPS, podría achacarse claramente a la falta de células B, comentada en el apartado anterior. Sin embargo, este razonamiento no es igualmente válido para la supresión de la respuesta a Con A ni para la supresión a largo plazo de la respuesta a LPS. En estudios previos, hemos demostrado la presencia de células supresoras no específicas en los bazos de los animales tratados con ciclofosfamida [Jiménez-Valera *et al.*, 2003]. La bibliografía al respecto plantea algunas discrepancias, porque hay autores que describen la capacidad de la ciclofosfamida para inducir células supresoras, mientras otros encuentran lo contrario. Sin embargo, un examen atento de estos trabajos permite aclarar algunos aspectos. Así, en el modelo propuesto por Sy *et al.* [1977], la sensibilización cutánea con dosis supraóptimas de dinitrofluorobenceno (DNFB) causa tolerancia, por inducción de células que suprimen la respuesta de hipersensibilidad de contacto a una ulterior administración de DNFB, pero no a otro agente (oxazolona); en este modelo, el tratamiento con ciclofosfamida (200 mg/Kg) inhibe a estas células supresoras específicas, evitando la aparición de tolerancia. Investigaciones ulteriores sobre modelos de sensibilidad de contacto han establecido nuevos hechos: las células efectoras de esta respuesta son células  $T\alpha\beta$ , pero otras células T son capaces de suprimir a las células efectoras; a su vez, células  $T\gamma\delta$

reguladoras actúan protegiendo de la supresión a las células efectoras; en este complejo circuito, la administración de dosis bajas de ciclofosfamida (50 mg/Kg) inactiva a las células supresoras [Askenase *et al.*, 1995]. Según Steinbrink *et al.* [1996], la tolerancia a la sensibilidad de contacto se debe a células T CD8<sup>+</sup>, productoras de IFN- $\gamma$  e IL-2 (perfil de citocinas similar al de las células T<sub>H1</sub>), y muy sensibles al tratamiento con ciclofosfamida, por lo que este agente previene la tolerización.

Pero otros modelos han permitido establecer la capacidad supresora de la ciclofosfamida. Jin *et al.* [1999] estudian la inducción de tolerancia a células alogénicas; cuando estas se introducen en la vena porta, se reduce la respuesta de rechazo; si la transferencia intraportal va seguida de la administración de dosis altas (300 mg/Kg) de ciclofosfamida, se establece una tolerancia persistente, no achacable a delección clonal, sino a supresión. Según Greeley *et al.* [1985], el tratamiento con ciclofosfamida (200 mg/Kg) induce células supresoras no específicas, que no poseen marcadores T, capaces de modular respuestas autoinmunes. Brooks y Hoskin [1994] identifican, en el bazo de ratones tratados con ciclofosfamida (también a la dosis de 200 mg/Kg), una población de células supresoras naturales (no específicas), que suprimen la linfoproliferación en respuesta a estímulos alogénicos o a mitógenos: se trata de células MAC-1<sup>+</sup>, que se activan con IFN- $\gamma$ , por lo que, en discrepancia con nuestros datos, actúan suprimiendo más eficazmente la respuesta de las células T a la Con A que la de las células B al LPS. Por tanto, nuestra demostración de la inducción, por ciclofosfamida, de células supresoras naturales [Jiménez-Valera *et al.*, 2003], está apoyada parcialmente por varios estudios de otros autores; pero sería de gran interés acometer, en futuros trabajos, la caracterización fenotípica de dichas células, así como su capacidad para afectar a otros mecanismos inmunitarios, como las respuestas de hipersensibilidad de contacto o retardada.

### 5.1.2. Inmunosupresión por azatioprina.

Comparativamente, la azatioprina ha sido mucho menos utilizada que la ciclofosfamida en modelos experimentales de inmunosupresión. Aunque ya en los años 70 se encuentran algunos trabajos al respecto, como un estudio sobre la disminución de la resistencia adquirida a la tuberculosis en el ratón [Kvapilova *et al.*, 1975], no se ha registrado una posterior insistencia en este tipo de modelos, con alguna excepción llamativa, como es el estudio de la patogénesis de la encefalopatía post-tratamiento en un modelo murino de tripanosomiasis africana: se ha demostrado un mecanismo inmunopatogénico en esta complicación, que puede ser prevenida mediante administración de azatioprina (100 mg/Kg), aunque, una vez establecida la encefalopatía, el agente inmunosupresor tiene escaso efecto [Kennedy, 1999]. Una situación análoga parece darse en la infección experimental del ratón con otro protozoo parásito, *Trichomonas vaginalis*: el tratamiento con agentes inmunosupresores, precisamente con los tres ensayados en la presente memoria, azatioprina, ciclofosfamida y tacrolimus, redujo significativamente la patogenicidad [Nogal-Ruiz *et al.*, 2003].

En nuestro modelo experimental, el tratamiento con azatioprina tuvo efectos supresores sobre la respuesta de los esplenocitos a mitógenos, más acusadamente en la respuesta al mitógeno de células T. Entre la bibliografía representativa de estudios sobre inmunosupresión por azatioprina, no se encuentran referencias sobre la influencia del fármaco en determinaciones *ex vivo* de la actividad linfocitaria: abundan los datos sobre su uso en el control del rechazo de órganos trasplantados [Encke *et al.*, 2004] y en la terapia de enfermedades autoinmunes [Lenz y Contreras, 2004; Rutgeerts, 2004], pero la capacidad de linfoproliferación en respuesta a mitógenos no es un parámetro investigado usualmente. Se ha publicado un estudio comparativo de los efectos de varios tratamientos inmunosupresores en la

capacidad de proliferación de los linfocitos de receptores de trasplante renal, en el que las asociaciones de ciclosporina A y azatioprina, y de ciclosporina A, azatioprina y prednisolona, no suprimieron de forma significativa la respuesta al mitógeno de células T, fitohemaglutinina A, mientras que aquellos tratamientos que incluyeron mofetil-micofenolato si lo consiguieron; no se estudió el efecto de azatioprina por separado [Hutchinson *et al.*, 2004]. Si existen, en cambio, investigaciones reportando efectos supresores de azatioprina *in vitro* sobre la capacidad de proliferación de linfocitos T, incluyendo la demostración de que tanto el fármaco como su metabolito activo, 6-mercaptopurina, tienen similar actividad supresora *in vitro* [Sugiyama *et al.*, 2003]. Una revisión reciente sobre los mecanismos de acción de azatioprina concluye que tanto la actividad antimetabolito como la inducción de apoptosis contribuyen a los efectos inmunosupresores [Cara *et al.*, 2004].

La mielotoxicidad y, como consecuencia, la leucopenia, se considera una de las principales limitaciones en la dosificación de la azatioprina en humanos [Encke *et al.*, 2004]. En nuestro modelo experimental, tanto la leucopenia como la citopenia medular fueron menores que los inducidos por ciclofosfamida. El descenso temprano en células nucleadas en médula ósea, desapareció en el cuarto día post-tratamiento. Dado que este es el lapso de tiempo obligado para efectuar el tratamiento con los antimicrobianos a ensayar, sin superponerlo con el inmunosupresor, se decidió eliminar de este modelo la cuantificación de células progenitoras del linaje mieloide/monocitoide.

### 5.1.3. Inmunosupresión por tacrolimus.

Como en el caso de la azatioprina, no abundan las reseñas sobre aplicaciones del tacrolimus en modelos experimentales, ni sobre los efectos

en ensayos *ex vivo*. Estudios sobre la capacidad funcional de linfocitos de receptores de trasplante renal han mostrado que el tratamiento con tacrolimus desvía la respuesta inmune específica, de la cooperación por T<sub>H1</sub> a la cooperación por T<sub>H2</sub>, lo que puede considerarse apropiado a corto plazo pero peligroso al considerar la posibilidad de un rechazo insidioso a largo plazo debido a la estimulación de la formación de anticuerpos específicos (en este caso, específicos para los aloantígenos del tejido injertado) [Weimer et al., 2000]. Ya las investigaciones más tempranas sobre tacrolimus pusieron de manifiesto su capacidad para bloquear *in vitro* la activación de células T específicas, en respuesta a estímulos antigénicos, [Sawada et al., 1987]. Este efecto supresor se asocia con acontecimientos intracelulares llamativos, como la disminución de actividad adenosina-kinasa [Spsychala y Mitchell, 2002] y la inducción de apoptosis en células T activadas [Migita et al., 1999]. Algunos autores han demostrado que el tratamiento con tacrolimus de enfermos trasplantados inhibe la producción de IL-2 por linfocitos T periféricos [Härtel et al., 2004]. Sin embargo, en nuestros ensayos *ex vivo*, solo la respuesta de proliferación de los linfocitos B se vio deprimida. Estos resultados discrepan con los ensayos *in vitro* publicados, en los cuales tacrolimus inhibió la proliferación de los linfocitos B en menor extensión que la de los linfocitos T [Saada et al., 1996]. Pero la discrepancia había sido observada anteriormente por los escasos autores que han publicado ensayos de linfoproliferación *ex vivo*: Lemster et al. [1993] concluyeron que la inmunosupresión obtenida con tacrolimus *in vivo* es rápidamente reversible *ex vivo*, sugiriendo que en la supresión obtenida con este agente *in vivo* intervienen mecanismos distintos al bloqueo de la activación de células T. Ante nuestros propios datos, sostenidos por la mencionada publicación, decidimos abandonar el modelo *ex vivo* y establecer uno nuevo *in vitro*, adaptado a este agente inmunosupresor. Los resultados que se obtuvieron confirmaron la actividad supresora *in vitro* de la respuesta al mitógeno de células B y, de forma más acusada, al de células T.

#### 5.1.4. Comparación de los tres modelos.

Los tres modelos propuestos tienen el interés de afectar al sistema inmune de formas diferentes: ciclofosfamida es un clásico agente mielotóxico, inductor de neutropenia; el antiproliferativo azatioprina, con distinto mecanismo de acción, es, a la dosis usada en este estudio, sensiblemente menos mielosupresor, mientras que resultó más activo en la supresión de la proliferación de linfocitos B y T en respuesta a mitógenos. Finalmente, el modelo de tacrolimus aporta las ventajas y las limitaciones de los ensayos *in vitro*: el número de factores a controlar es menor, pero, ¿hasta que punto es representativo de los efectos a nivel del organismo entero?. El uso combinado de los tres modelos proporciona una visión más amplia y completa de los efectos inmunomoduladores de los agentes antimicrobianos a ensayar.

## 5.2. INMUNOMODULACION POR LOS ANTIMICROBIANOS INVESTIGADOS.

### 5.2.1. Inmunomodulación por ceftriaxona.

Este agente  $\beta$ -lactámico no mostró actividad inmunomoduladora consistente. En animales inmunocompetentes, el tratamiento con ceftriaxona tendió a disminuir los recuentos de esplenocitos y de leucocitos circulantes, mientras que se elevaron los de células nucleadas en médula ósea. Estos efectos se mantuvieron en torno al nivel de significación estadística, que se alcanzó en algunos ensayos y en otros no: no se trata, pues, de un efecto claramente definido. De forma similar, la capacidad de proliferación de linfocitos B no se vio modificada por el tratamiento

antibiótico, y la de linfocitos T fue suprimida, pero de forma inconsistente. Tampoco en nuestros ensayos *in vitro*, el antibiótico modificó la capacidad de proliferación de los esplenocitos, en ausencia o en presencia de tacrolimus.

En general, la poca bibliografía existente al respecto confirma la escasa o nula actividad de ceftriaxona sobre los parámetros inmunitarios, en comparación con otras cefalosporinas inmunológicamente más activas, como cefodizima, tanto *in vitro* [Meloni *et al.*, 1995] como *in vivo* [Auer *et al.*, 1992; Karakaya *et al.*, 1995].

Sobre animales inmunosuprimidos, la ceftriaxona no mostró tampoco una actividad notable. Curiosamente, la supresión causada por ciclofosfamida en la proliferación en respuesta a ConA se vio atenuada por el tratamiento con ceftriaxona: este efecto, que tuvo la entidad suficiente como para abolir la significación estadística de la supresión, parece contradictorio con la supresión que la propia ceftriaxona ejerció sobre la misma respuesta, en animales inmunológicamente intactos, si bien esta actividad supresora solo fue significativa en uno de los ensayos realizados.

No encontramos actividad significativa sobre la población de células de médula ósea progenitoras de neutrófilos y monocitos, tanto en animales intactos como en inmunosuprimidos. En la bibliografía consultada solo hay una referencia a la capacidad de cefodizima para incrementar la liberación de GM-CSF por células epiteliales humanas *in vitro*, en contraposición con la ausencia de actividad en ceftriaxona [Pacheco *et al.*, 1994].

### **5.2.2. Inmunomodulación por moxifloxacino.**

En una reciente revisión sobre las propiedades inmunomoduladoras de las quinolonas, *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, Dalhoff y Shalit [2003] concluyen que algunos miembros de esta importante familia de agentes antibacterianos ejercen efectos inhibidores de la producción de citocinas y estimuladores de la leucopoyesis. En concreto, moxifloxacino es una de las quinolonas con actividad inmunomoduladora: diversos estudios *in vitro* han puesto de manifiesto su capacidad para inhibir la producción de quimiocinas [Uriarte *et al.*, 2004] y citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 [Choi *et al.*, 2003]; estos efectos antiinflamatorios se atribuyen a la inhibición de la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  [Choi *et al.*, 2003], lo que tiene como consecuencia la disminución de los niveles del factor de transcripción NF- $\kappa$ B activado por la respuesta a estímulos en monocitos [Weiss *et al.*, 2004] y células epiteliales humanas [Werber *et al.*, 2005].

En nuestro estudio, moxifloxacino reveló actividades interesantes en los ensayos *ex vivo*, no así en las pruebas *in vitro*. Administrado a ratones inmunocompetentes, moxifloxacino redujo en todos los ensayos, de forma significativa, los recuentos de leucocitos periféricos, aunque sin efectos significativos sobre células nucleadas de médula ósea ni sobre esplenocitos. La inducción de leucopenia se acompañó de un incremento en los niveles de células progenitoras de neutrófilos y monocitos. En nuestro laboratorio, un estudio de la inmunomodulación por ciprofloxacino reveló también inducción de leucopenia, aunque en este caso asociada con una elevación en el número de células nucleadas de médula ósea [Jiménez-Valera *et al.*, 1995]. Estos resultados sugieren que algunas quinolonas reducen el número de leucocitos circulantes, pero estimulan la función leucopoyética medular, seguramente como resultado de un mecanismo compensador de la homeostasis.

En los animales inmunosuprimidos con ciclofosfamida, moxifloxacino incrementó significativamente la leucopenia debida al



agente mielotóxico, no así en los inmunosuprimidos con azatioprina; por tanto, el antimicrobiano evidenció su efecto reductor del recuento de leucocitos solo con el tratamiento más tóxico para la función medular. Esta potenciación de la leucotoxicidad se acompañó de una potenciación significativa del recuento GM-CFU: el tratamiento con moxifloxacino tiene el doble efecto de agravar la leucopenia inducida por ciclofosfamida y de acelerar la entrada de las células madre de médula ósea en el ciclo celular y en el camino de diferenciación mieloide/monocitoide. Contamos con un trabajo de referencia, en el que se investigaron los efectos de ciprofloxacino y moxifloxacino sobre los niveles de leucocitos y la función leucopoyética en ratones tratados con ciclofosfamida [Shalit *et al.*, 2001]. Estos autores administraron una única dosis de ciclofosfamida (250 mg/Kg) 24 h antes de inyectar las quinolonas, y con este tratamiento encontraron un modesto efecto protector, ya que ambos antimicrobianos incrementaron moderadamente los recuentos de leucocitos periféricos, drásticamente reducidos como consecuencia de la acción de la ciclofosfamida. Sin embargo, la recuperación de los niveles de leucocitos periféricos se vió ligeramente retrasada por acción del moxifloxacino, hecho que no concuerda con el hallazgo importante de que ambas quinolonas incrementaron la producción de GM-CSF y los recuentos de GM-CFU en médula ósea. Los autores concluyen que ciprofloxacino y moxifloxacino pueden revertir algunos efectos inmunosupresores de la ciclofosfamida [Shalit *et al.*, 2001]. Aunque hay que reconocer algunas limitaciones en el citado estudio, como el hecho de que las modificaciones de los recuentos de leucocitos periféricos inducidas por las dos quinolonas fueron demasiado pequeñas, la falta de datos sobre la acción de ambas en animales inmunológicamente intactos y la discrepancia mencionada sobre el retraso en la recuperación de los niveles leucocitarios en los animales inmunosuprimidos tratados con moxifloxacino, se trata de una aportación que confirma la capacidad de moxifloxacino para estimular la leucopoyesis.

En nuestros ensayos, las respuestas de los esplenocitos de los animales inmunológicamente intactos a LPS y ConA no se vieron afectadas por el tratamiento con moxifloxacino. Sin embargo, este tratamiento redujo de forma significativa la supresión de la capacidad de proliferación de los linfocitos B y T causada por ciclofosfamida; también la supresión que azatioprina ejerció sobre linfocitos T fue parcialmente contrarrestada por la quinolona. No hemos encontrado estudios paralelos con los que confrontar estos resultados, que insisten en la actividad inmunomoduladora de moxifloxacino y su capacidad para revertir algunos de los efectos *ex vivo* de los tratamientos inmunosupresores.

Nuestros ensayos *in vitro* no revelaron actividad modificadora de la proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos. Otros investigadores han encontrado que las quinolonas pueden modular la producción de citocinas por leucocitos *in vitro*; la síntesis de citocinas proinflamatorias es inhibida, pero la de IL-2 puede verse superinducida [datos recogidos por Dalhoff y Shalit, 2003]. Si el estímulo de la producción de IL-2 puede extrapolarse al modelo *ex vivo*, suministraría una explicación para la reversión del efecto supresor de la ciclofosfamida en la proliferación de linfocitos. Pero, hasta el presente, los mecanismos de la acción inmunomoduladora de las quinolonas no son bien conocidos. En su revisión, Dalhoff y Shalit [2003] proponen la modulación de los niveles intracelulares de cAMP y de factores de transcripción activados y la inducción de una respuesta equivalente al sistema SOS de procariontes. Sin subvalorar estas explicaciones, hay que considerar que la ausencia de efectos significativos en nuestro modelo *in vitro* apoya el posible papel de un mecanismo indirecto, a través de la liberación de fracciones con actividad BRM por microorganismos indígenas susceptibles a la acción antimicrobiana del moxifloxacino, de forma semejante a lo propuesto anteriormente para explicar algunos efectos inmunomoduladores del ciprofloxacino [Jiménez-Valera *et al.*, 1995]. Cabe recordar aquí que la

contribución de este mecanismo indirecto a la inmunomodulación por agentes antimicrobianos ha recibido recientemente el apoyo de evidencias experimentales [Leiva *et al.*, 2005].

### 5.2.3. Inmunomodulación por anfotericina B.

La larga trayectoria de uso terapéutico de este antifúngico ha propiciado bastantes estudios sobre su actividad inmunomoduladora. Los primeros trabajos al respecto establecieron un efecto estimulador sobre la respuesta de anticuerpos [Blanke *et al.*, 1977], la inmunidad celular [Shirley y Little, 1979] y la actividad microbicida de los macrófagos [Bistoni *et al.*, 1985]. La visión actual ha cambiado algo, ya que se reconoce una actividad inmunomoduladora, con efectos potenciadores y supresores que dependen de las dosis utilizadas. Globalmente, anfotericina B estimula algunos componentes de la reacción inflamatoria, como la producción de quimiocinas y la expresión de moléculas de adhesión por monocitos humanos [Rogers *et al.*, 2000], y los mecanismos microbicidas dependientes de óxido nítrico en macrófagos [Tohyama *et al.*, 1996], y deprime otros de la inmunidad celular, como la función de las células T CD8<sup>+</sup> [Geginat *et al.*, 1999] y la hipersensibilidad retardada [Roselle y Kauffman, 1980]. Sin embargo, no hemos localizado publicaciones que experimenten modelos *ex vivo* similares a los utilizados en nuestro estudio, en los cuales el antifúngico ha mostrado poca actividad: los recuentos de leucocitos periféricos, de células nucleadas en médula ósea y de esplenocitos, la proliferación de linfocitos B estimulados con LPS, y los niveles de GM-CFU en médula ósea no fueron modificados por el tratamiento con anfotericina B; tan solo, aunque de forma consistente, se observó una supresión significativa de la proliferación de linfocitos T, procedentes de animales inmunológicamente intactos, en respuesta a ConA. Los parámetros

suprimidos por tratamientos con ciclofosfamida o azatioprina no se vieron modificados por el antifúngico.

La capacidad de respuesta de los linfocitos B y T, incubados en presencia de anfotericina B, no se vió modificada; tampoco se modificó la supresión ejercida por tacrolimus en el modelo *in vitro*. Un trabajo pionero de Roselle y Kauffman [1978] estableció que la adición de anfotericina B a cultivos de linfocitos humanos no afecta a la proliferación en respuesta a mitógenos de células T (PHA, ConA), aunque sí es capaz de suprimir la respuesta a un antígeno específico.

Respecto de los mecanismos de acción, se ha postulado la interacción de esta molécula poliénica con la membrana citoplásmica, causando alteraciones en el potencial de membrana de los linfocitos [Henry-Toulme *et al.*, 1989].

#### **5.2.4. Inmunomodulación por aciclovir.**

La bibliografía sobre interacciones entre aciclovir y mecanismos de la inmunidad se puede resumir en dos efectos globales del agente antiviral: depresión de la función medular (en tratamientos prolongados) [Grella *et al.*, 1998] e inmunotoxicidad, especialmente sobre las células T [Poluektova *et al.*, 1996]. En nuestros ensayos *ex vivo*, el tratamiento con aciclovir solo demostró capacidad para inducir leucopenia significativa en los animales inmunológicamente intactos y agravarla en los ratones tratados previamente con azatioprina.

Los ensayos *in vitro* tampoco evidenciaron ninguna actividad de interés.

### 5.3. CONSIDERACIONES FINALES.

En esta Memoria de Tesis Doctoral se proponen dos modelos *ex vivo* y uno *in vitro* para estudiar las interacciones de agentes antimicrobianos con el sistema inmune deteriorado por un tratamiento inmunosupresor previo. *A priori*, los modelos *ex vivo* representan mejor las interacciones que pueden ocurrir en el organismo, mientras que un modelo *in vitro* tiene la ventaja de su sencillez y de revelar mecanismos de acción directa sobre las células de la inmunidad. Sin embargo, los resultados obtenidos evidencian una mayor utilidad de los modelos *ex vivo*, que han puesto de manifiesto actividad inmunomoduladora en agentes que no han mostrado ninguna actividad *in vitro*. Por otra parte, la comparación de nuestros resultados con los presentados en numerosas publicaciones consultadas, indica que el ensayo que mide la capacidad de proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos, que evalúa una función efectora, es más exigente que otros ensayos que cuantifican la producción de citokinas, la cual se puede ver moderadamente modificada sin que ello repercuta de forma significativa en las funciones efectoras.

Los cuatro agentes antimicrobianos estudiados mostraron alguna actividad inmunomoduladora en los modelos *ex vivo*. De ellos, moxifloxacino fue el más activo, tanto sobre el sistema inmune intacto como en la reversión de los efectos supresores de ciclofosfamida y azatioprina. Sin embargo, hay que tener presente que tanto moxifloxacino como aciclovir fueron capaces de agravar, en algunos casos, la leucopenia causada por los agentes inmunosupresores, si bien moxifloxacino, paralelamente, ejerció un efecto estimulante sobre la leucopoyesis.



## 6. CONCLUSIONES

1ª. Los tratamientos con los agentes antiproliferativos ciclofosfamida y azatioprina proporcionan modelos apropiados para el ensayo *ex vivo* de la actividad inmunomoduladora de agentes antimicrobianos en individuos inmunocomprometidos; contrariamente el tacrolimus, agente inhibidor de la calcineurina, no ejerce una supresión aprovechable en ensayos *ex vivo*, y, alternativamente, ofrece la posibilidad de realizar evaluaciones de inmunomodulación *in vitro*.



2<sup>a</sup>. El tratamiento con ceftriaxona, en animales inmunológicamente intactos, no ejerció una inmunomodulación consistente, pero, en términos generales, tendió a disminuir el recuento de leucocitos circulantes, a elevar el número de células nucleadas en médula ósea y suprimió la proliferación de esplenocitos en respuesta a concanavalina A

3<sup>a</sup>. El tratamiento con ceftriaxona, en animales inmunocomprometidos, no modificó los efectos supresores de la ciclofosfamida y la azatioprina.

4<sup>a</sup>. El tratamiento de animales inmunológicamente intactos con moxifloxacino causó leucopenia e incrementó el recuento de células progenitoras del linaje mieloide/monocitoide en médula ósea.

5<sup>a</sup>. El tratamiento con moxifloxacino agravó la leucopenia causada por la ciclofosfamida, pero revertió el efecto supresor de la ciclofosfamida y la azatioprina sobre la capacidad de proliferación de los esplenocitos en respuesta a mitógenos.

6<sup>a</sup>. El tratamiento de animales inmunológicamente intactos con anfotericina B deprimió la capacidad de proliferación de los esplenocitos en respuesta a concanavalina A, pero no afectó a los otros parámetros estudiados.

7<sup>a</sup>. El tratamiento con anfotericina B, en animales inmunocomprometidos, no modificó los efectos supresores de la ciclofosfamida y la azatioprina.

8<sup>a</sup>. El tratamiento con aciclovir solamente causó leucopenia en animales inmunológicamente intactos.

9<sup>a</sup>. El tratamiento con aciclovir no modificó los efectos supresores de la ciclofosfamida, pero agravó la leucopenia en animales tratados con azatioprina.

10<sup>a</sup>. Los modelos *ex vivo* permitieron detectar actividades inmunomoduladoras en los cuatro agentes antimicrobianos estudiados, que no se manifestaron en el modelo *in vitro*.

7. BIBLIOGRAFÍA.



**Abe, S., Nakamura, H., Inoue, S., Takeda, H., Saito, H., Kato, K., 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.

**Abdelghaffar, H., Vazifeh, D. y Labro M.T. 1996.** Comparison of various macrolides for stimulation of human neutrophil degranulation. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**:81-93.

**Abdelghaffar, H., Vazifeh, D. y Labro M.T. 1997.** Erythromycin A-derived macrolides modify the functional activities of human neutrophils by altering the phospholipase D-phosphatidate phosphohydrolase transductional pathway. L-Cladinose is involved both in alteration of neutrophil function and modulation of this transductional pathway. *J. Immunol.* **159**:3995-4005.

**Aderem, A. y Ulevitch, R.J. 2000.** Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**:782-787.

**Adu, D., Cockwell, P., Ives, N., Shaw, J. y Wheatley, K. 2003.** Interleukin-2 receptor monoclonal antibodies in renal transplantation: meta-analysis of randomised trials. *BMJ*.**326**:789.

**Allison, A. C. 1994.** Inmunopotenciación, p. 28.1-28.10. En J. Brostoff, G.K. Scadding, D. Male y I. M. Roitt (eds.), *Inmunología clínica*. Mosby/Doyma, Barcelona.

**Amat, M.A. 2001.** Inmunomodulación por agentes antimicrobianos en animales inmunocomprometidos. Tesina de Licenciatura. Universidad de Granada, Facultad de Farmacia.

**Andersson, J., Nagy, S., Groth, C.G. y Andersson, U. 1992.** Effects of FK506 and cyclosporin A on cytokine production studied *in vitro* at a single-cell level. *Immunology* **75**:136-142.

**Anderson, R., Theron, A.J. y Feldman, C. 1996.** Membrane-stabilizing, anti-inflammatory interactions of macrolides with human neutrophils. *Inflammation*. **20**:693-705.

**Andes, D. y Craig, W.A. 1998.** *In vivo* activities of amoxicillin and amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae*: application to breakpoint determinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2375-2379.

**Anónimo. 2000.** Nuevos medicamentos en España en 1999. Panorama actual del medicamento. **24**:5-30.

**Anónimo. 2003.** Nuevos medicamentos comercializados en España. Panorama actual del medicamento. **27**: 1089-1104.

**Arikan, S. y Rex, J.H. 2003.** Antifungal agents, p. 1859-1868. En Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A. y Tenover, R.C. (eds.), *Clinical microbiology*, 8ª edición. ASM Press, Washington.

**Arnáiz, A., Pérez, M., Subiza, L. y Paz, E. 1997.** Inmunopatología. Editorial Síntesis, Madrid.

**Asahina, A., Tada, Y., Nakamura, K. y Tamaki, K. 2001.** Griseofulvin has a potential to modulate the expression of cell adhesion molecules on leukocytes and endothelial cell. *Int. Immunopharmacol.* **1**:75-83.

**Askenase, P.W., Szczepanik, M., Ptak, M., Paliwal, V. y Ptak, W. 1995.** Gamma delta T cells in normal spleen assist immunized alpha beta T cells in the adoptive cell transfer of contact sensitivity. Effect of *Bordetella pertussis*, cyclophosphamide, and antibodies to determinants on suppressor cells. *J. Immunol.* **154**:3644-3653.

**Attur, M.G., Patel, R.N., Patel, P.D., Abramson, S.S. y Amin, A.R. 1999.** Tetracycline up-regulates COX-2 expression and prostaglandin E-2 production independent of its effect on nitric oxide. *J. Immunol.* **162**:3160-3167.

**Auer, I.O., Hardorfer, C. y Zimmermann I. 1992.** Cefodizime stimulates subpopulations of cell mediating spontaneous or antibody-dependent cytotoxicity in patients with bacterial infections. *Infection* **20**:s54-s57.

**Azuma, Y., Shinohara, M., Murakawa, N., Endo, M. y Ohura, K. 1999.** Possible interaction between new quinolones and immune functions in macrophages. *Gen. Pharmacol.* **32**:609-614.

**Baldrige, J.R., McGowan, P., Evans, J.T., Cluff, C., Mossman, S., Johnson, D. y Persing, D. 2004.** Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther.* **4**:1129-1138.

**Baltch, A.L., Smith, R.P., Franke, M.A., Ritz, W.J., Michelsen, P.B. y Bopp L.H. 2001.** Effects of cytokines and fluconazole on the activity of human monocytes against *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:96-104.

**Baronia, A., Tufano, M.A., Bolognino, P., Buttini, G. y Catalanotti, P. 1998.** Effects of a new topic amikacin formulation on chemotaxis and release of profibrotic factors by human monocytes. *Chemotherapy* **44**:397-404.

**Batchelor, J. R. 1994.** Trasplante, p. 3.1-3.13. En J. Brostoff, G.K. Scadding, D. Male y I. M. Roitt (eds.), *Inmunología clínica*. Mosby/Doyma, Barcelona.

**Belaid, A., Aouni, M., Khelifa, R., Trabelsi, A., Jemmali, M. y Hani, K. 2002.** *In vitro* antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *J. Med. Virol.* **66**:229-234.

**Bergh, J., Wiklund, T., Erikstein, B., Fornander, T., Bengtsson, N.O., Malmstrom, P., Kellokumpu-Lehtinen, P., Anker, G., Bennmarker, H. y Wilking, N. 1998.** Dosage of adjuvant G-CSF (filgrastim) supported FEC polychemotherapy based on equivalent haematological toxicity in high-risk breast cancer patients. *Ann. Oncol.* **9**:403-411.



**Bermudez, L.E., Inderlied, C.B., Kolonoski, P., Petrofsky, M., Aralar, P., Wu, M. y Young, L.S. 2001.** Activity of moxifloxacin by itself and in combination with ethanbutol, rifabutin, and azithromycin *in vitro* and *in vivo* against *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:217-222.

**Bessler, H., Gurary, N., Aloni, D., Vishne, T.H. y Sirota, L. 2000.** Effect of cefotaxime on cytokine production in newborns and adults *in vitro*. *Biomed. Pharmacother.* **54**:410-414.

**Beutler, E., Gelbart, T. y West, C. 2001.** Synergy between TLR2 and TLR4: a safety mechanism. *Blood Cells Mol. Dis.* **27**:728-30.

**Bezwoda, W.R., Dansey, R., Seymour, L. y Glencross, D. 1994.** Noncryopreserved, limited number (1 or 2) peripheral-blood progenitor-cell collections following G-CSF administration provide adequate hematologic support for high-dose chemotherapy. *Hematol. Oncol.* **12**:101-110.

**Bistoni, F., Vecchiarelli, A., Mazzolla, R., Puccetti, P., Marconi, P. y Garaci, E. 1985.** Immunoadjuvant activity of Amphotericin B as displayed in Mice infected with *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:625-631.

**Blanke, T.J., Little, J.R., Shirley, S.F. y Lynch, R.G. 1977.** Augmentation of murine immune responses by amphotericin B. *Cell. Immunol.* **33**:180-190.

**Bohle, A. y Brandau, S. 2003.** Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J. Urol.* **170**:964-969.

**Bonnet, M. y Van der Auwer, P. 1993.** Preincubation of *Haemophilus influenzae* with subinhibitory concentrations of macrolides. Influence on human neutrophil chemiluminescence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1015-1024.

**Braga, P.C., Sala, M.T., Mancini, L. y Dal Sasso, M. 1998.** Phagocytosis and intracellular killing of rokitamycin-exposed staphylococci by human polymorphonuclear leukocytes. *Chemotherapy* **44**:42-49.

**Brooks, J.C. y Hoskin, D.W. 1994.** The inhibitory effect of cyclophosphamide-induced MAC-1<sup>+</sup> natural suppressor cells on IL-2 and IL-4 utilization in MLR. *Transplantation* **58**:1096-1103.

**Byohme, A., Shah, P.M., Sille, W. y Hoelzer, D. 1998.** Piperacillin/tazobactam versus cefepime as initial empirical antimicrobial therapy in febrile neutropenic patients: a prospective randomized pilot study. *Eur. J. Med. Res.* **3**:324-330.

**Cara, C.J. Pena, A.S., Sans, M., Rodrigo, L., Guerrero-Esteo, M., Hinojosa, J., Garcia-Paredes, J. y Guijarro, L.G. 2004.** Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice. *Med. Sci. Monit.* **10**:RA247-RA254.

**Carretero, M., 2000.** Medicamentos de vanguardia. Azatioprina. *Offarm* **19**:182-186.

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2004.** Tuberculosis associated with blocking agents against tumor necrosis factor-alpha - California, 2002-2003. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **53**:683-686.

**Chabner, B.A., Allegra, C.J., Curt, G.A. y Calagresi, P. 1996.** Farmácos antineoplásicos, p. 1309-1367. En J.G. Hardman, L. E. Limbrid, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon y A Goodman (eds.), Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Mc. Graw-Hill Interamericana, México.

**Cherikh, W.S., Myron kauffman, H., Maghirang, J., Bleyer, A.J. y Johnson, C.P. 2003.** A comparison of discharge immunosuppressive drug regimens in primary cadaveric kidney transplantation. *Transplantation*. **76**: 463-470.

**Chiller, T., Farrokhshad, K., Brummer, E. y Stevens, D.A. 2001.** The interaction of human monocytes, monocyte-derived macrophages, and polymorphonuclear neutrophils with caspofungin (MK-0991), an echinocandin, for antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **39**:99-103.

**Chin, N.X., Jules, K. y Neu, H.C. 1986.** Synergy of ciprofloxacin and azlocillin *in vitro* and in a neutropenic mouse model of infection. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **5**:23-28.

**Choi, J.H., Song, M.J., Kim, S.H., Choi, S.M., Lee, D.G., Yoo, J.H. y Shin, W.S. 2003.** Effect of moxifloxacin on production of proinflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3704-3707.

**Choy, E.H.S. y Scott, D.L. 1997.** Drug treatment of rheumatic diseases in the 1990s. Achievements and future developments. *Drugs* **53**:337-348.

**Clotet, B., Labarga, P., Portilla, J. y Echevarria, S. 1996.** Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa. *Enferm. Infec. Microbiol. Clín.* **14**: 15-20.

**Cocude, C., Truong, M.J., Billaut-Mulot, O., Delsart, V., Darcissac, E., Capron, A., Mouton, Y. y Bahr, G.M. 2003.** A novel cellular RNA helicase, RH116, differentially regulates cell growth, programmed cell death and human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Gen. Virol.* **84**(Pt 12):3215-3225.

**Conte, P.F., Bruzzone, M., Gadducci, A., Rubagotti, A., Catsafados, E., Carnino, F., Ferrari, I., Foglia, G., Chiara, S., Mammoliti, S., Muttini, M.P., Rugiati, S., Boccardo, F., Rosso, R., Ragni, N. y G.O.N.O. 1994.** A randomized trial comparing higher versus standard doses of cisplatin in combination with epidoxorubicin and cyclophosphamide in advanced ovarian cancer patients with bulky residual disease, p. 1037-1038. En J. Einhorn, C. E. Nord y S. R. Norrby (eds.), *Recent advances in chemotherapy*. ASM, Washington.

**Cooper, S.M., Sheridan, A. y Burge, S. 2003.** Mycosis fungoides responding to systemic itraconazole. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **17**: 588-590.

**Craig, W.A., Redington, J. y Ebert, S.C. 1991.** Pharmacodynamics of amikacin *in vitro* and in mouse thigh and lung infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**(Suppl. C):29-40.

**Criqui, G.I., Solomon, C., Welch, B.S., Ferrando, R.E., Boushey, H.A. y Balmes, J.R. 2000.** Effects of azithromycin on ozone-induced airway neutrophilia and cytokine release. *Eur. Resp. J.* **15**:856-862.

**Cuenca, M. y Rodríguez-Tudela, J.L. 2002.** Antifúngicos de uso sistémico y tópico. Nuevas moléculas antifúngicas. *Medicine* **68**: 3651-3660

**Cuffini, A.M., Tullio, V., Palarchio, A.I., Bonino, A., Paizis, G. y Carlone, N.A. 1998.** Enhanced effects of amoxicillin/clavulanic acid compared with amoxicillin and clavulanic acid alone on the susceptibility to immunodefenses of a penicillin-resistant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Drug Exp. Clin. Res.* **24**:173-184.

**Cunningham-Rundles, S. y Nesin, M. 2000.** Bacterial infections in the immunocompromised host, p. 145-163. En J.P. Nataro, M.J. Blaser y S. Cunningham-Rundles (eds.), *Persistent bacterial infections*. ASM Press, Washington.

**Dalhoff, A. y Shalit, I. 2003.** Immunomodulatory effects of quinolones. *Lancet Infect. Dis.* **3**:359-371.

**Darcissac, E.C., Truong, M.J., Dewulf, J., Mouton, Y., Capron, A. y Bahr, G.M. 2000.** The synthetic immunomodulator murabutide controls human immunodeficiency virus type 1 replication at multiple levels in macrophages and dendritic cells. *J. Virol.* **74**:7794-7802.

**Davis, B.D. 1990.** Chemotherapy, p. 201-228. En B.D. Davis, R. Dulbecco, H.N. Eisen y H.S. Ginsberg (eds.), *Microbiology*. Lippincott, Philadelphia.

**De Bock, R. y Middelheim, A.Z. 2000.** Febrile neutropenic in allogeneic transplantation. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **16**:177-180.

**De La Tribonniere, X., Mouton, Y., Vidal, V., Darcissac, E., Sissoko, D., Fontier, C., Douadi, Y., Dewulf, J., Amiel, C. y Bahr, G.M. 2003.** A phase I

study of a six-week cycle of immunotherapy with Murabutide in HIV-1 patients naive to antiretrovirals. *Med. Sci. Monit.* **9**:PI43-PI50.

**Del Valle, M., Poyato, A., Gomez, F. y Vignote, M.L. 2001.** Hepatitis aguda grave por azatioprina. *Med. Clín.* **117**:78-78.

**Denning, D.W., Hall, L., Jackson, M. y Hollis, S. 1995.** Efficacy of D0870 compared with those of itraconazole and amphotericin B in two murine models of invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1809-1814.

**Drachenberg, K.J., Wheeler, A.W., Stuebner, P. y Horak, F. 2001.** A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy* **56**:498-505.

**Edinger, M., Bessler, W.G. y Kleine, B. 1994.** Synergistic stimulation of human B lymphocytes by anti-CD40 monoclonal antibodies and synthetic lipopeptide analogues from *Escherichia coli* lipoprotein. *Immunology* **81**:205-210.

**Eisen, H. y Ross, H. 2004.** Optimizing the immunosuppressive regimen in heart transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* **23**:S207-S213.

**Equils, O., Shapiro, A., Madak, Z., Liu, C. y Lu, D. 2004.** Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors block toll-like receptor 2 (TLR2)- and TLR4-Induced NF-KappaB activation. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **48**:3905-3911.

**Encke, J., Uhl, W., Stremmel, W. y Sauer, P. 2004.** Immunosuppression and modulation in liver transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**:iv22-iv25.

**Eriksson, E., Forsgren, A. y Riesbeck, K. 2003.** Several gene programs are induced in ciprofloxacin-treated human lymphocytes as revealed by microarray analysis. *J. Leukoc. Biol.* **74**:456-463.

**Ferris, J., Tortajada, I., Garcia, J., Castell, I. y López Andreu, J.A. 1998.** Radiaciones electromagnéticas y cáncer. Conceptos básicos. *Rev. Esp. Ped.* **54**:37-46.

**Fine, J.S., Cai, X.Y., Justice, L., Gommoll, C.P., Hamilton, L.D., Waters, T.A., Narula, S.K., Bober, L.A. y Grace, M.J. 1997.** A specific stimulator of granulocyte colony-stimulating factor accelerates recovery from cyclophosphamide-induced neutropenia in the mouse. *Blood* **90**:795-802.

**Flórez, J., Armijo, J.A. y Mediavilla, A. 1999.** *Farmacología Humana.* Editorial Masson.

**Fonseca, E. 2003.** Inhibidores tópicos de la calcineurina. *Med. Clin.* **120**: 255-256

**Forsgren, A., Bergh, A.K., Brandt, M. y Hansson, G. 1986.** Quinolones affect thymidine incorporation into the DNA of human lymphocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:506-508.

**Forsgren, A., Bredberg, A., Pardee, A.B., Schlossman, S.T. y Tedder, T.F. 1987<sup>a</sup>.** Effects of ciprofloxacin on eucaryotic pyrimidine nucleotide biosynthesis and cell growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:774-779.

**Forsgren, A., Schlossman, S.T. y Tedder, T.F. 1987<sup>b</sup>.** 4-quinolone drugs affect cell cycle progression and function of human lymphocytes *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:768-773.

Frieling, J.T.M., Mulder, J.A., Hendriks, T., Curfs, J.H.A.J., Vanderlinden, C.J. y Sauerwein, R.W. 1997. Differential induction of pro- and anti-inflammatory cytokines in whole blood by bacteria. Effects of antibiotic treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1439-1443.

Gavilán, F., Caballero, J., Cárdenas, M., Moreno, J., Martínez, L., Gallego, C., Sanchez-Guijo, P. y Torre- Cisneros, J. 1999. El aciclovir puede modular la expansión clonal de los linfocitos CD8+ inducida por antígeno de citomegalovirus. *Enferm. Infec. Microbiol. Clín.* **17**: 390-395.

Garcia, A., Marin, M., Jiménez, F., Clavero, C., Garcia, M.J., Alvarez, G., Reyes, A., Villegas, G. y Rodríguez, A. 2003. Estudio prospectivo y controlado, no aleatorizado, de tres cohortes sobre la efectividad de dos pautas antibióticas, levofloxacino y contrimoxazol, en profilaxis antibacteriana de pacientes neutropénicos. *Med. Clin.* **120**: 321-325.

Gerinat, G., Kretschmar, M., Walter, S., Junker, D., Hof, H. y Nichterlein, T. 1999. Suppression of acquired immunity against *Listeria monocytogenes* by anphotericin B-mediated inhibition of CD8 T cell funcion. *J. Infect. Dis.* **180**: 1186-1194.

Gershanovich, M.L., Moiseyenko, V.M., Vagner, R.I. y Orlova, R. V. 1994. Cardioxane as an effective protector against cardiotoxicity of doxorubicin in combination chemotherapy of advanced breast cancer, p. 946-947. En J. Einhorn, C. E. Nord y S. R. Norrby (eds.), *Recent advances in chemotherapy*. ASM, Washington.

Gillissen, G.J. 1982. Influence of cephalosporins on humoral immune response, p. 5-15. En H.V. Eickenberg, H. Hahn y W. Opferkuch (eds.), *The*



influence of antibiotics on the host-parasite relationship. Springer-Verlag, Berlin.

**Girmenia, C., Alimena, C., Latagliata, R., Morano, S.G., Celesti, F., Coppola, L., Spadea, A., Tosti, S., Mecarocci, S., D'Elia, G.M., Tafuri, A., Cimino, G. y Mandelli, F. 1999.** Out-patient management of acute myeloid leukemia after consolidation chemotherapy. *Haematologica* **84**:814-819.

**Gisbert, J.P., Gomollón, F., Maté, J. y Pajares, JM. 2002.** Preguntas y respuestas sobre el papel de la azatioprina y la 6-mercaptopurina en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol. Hepatol.* **25**: 401-415.

**Glauser, M. 1998.** Empiric therapy of bacterial infection in patients with severe neutropenia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **3**:467-472.

**Gobernado, M. y Santos, M. 1988.** Fluoroquinolonas: estructura, actividad *in vitro*, mecanismo de acción y resistencia, p. 33-40. En C. Roy (ed.), Tratado de medicina interna. Fluorquinolonas en terapéutica infecciosa. Idepsa, Madrid.

**Gootz, T.D., Barrett, J.F. y Sutcliffe, J.A. 1990.** Inhibitory effect of quinolone antibacterial agents on eucaryotic topoisomerases and related test systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:8-12.

**Greeley, E.H., Segre, M. y Segre, D. 1985.** Modulation of autoimmunity in NZB mice by cyclophosphamide-induced, nonspecific suppressor cells. *J. Immunol.* **134**:847-851.

**Grella, M., Ofosu, J.R. y Klein, B.L. 1998.** Prolonged oral acyclovir administration associated with neutropenia and trombocytopenia. *Am. J. Emerg. Med.* 4: 396-398.

**Griggs, J.J., Blair, E.A., Norton, J.R., Rowe, J.M., Flesher, W.R. y Betts, R.F. 1998.** Ciprofloxacin plus piperacillin is an equally effective regimen for empiric therapy in febrile neutropenic patients compared with standard therapy. *Am. J. Hematol.* 4:293-297.

**Guillén, M.V., Ogayar, A. y Sánchez-Pérez, M. 1997.** Generación de diversidad y respuesta adaptativa, p. 281-301. En M. Sánchez-Pérez (ed.), *Introducción a la inmunología humana*. Editorial Síntesis, Madrid.

**Hardinger, K.L., Koch, M.J. y Brennan, D.C. 2004.** Current and future immunosuppressive strategies in renal transplantation. *Pharmacotherapy* 24:1159-1176.

**Härtel, C., Schumacher, N., Fricke, L., Ebel, B., Kirchner, H. y Müller-Steinhardt, M. 2004.** Sensitivity of whole-blood T lymphocytes in individual patients to tacrolimus (FK-506): impact of interleukin-2 mRNA expresión as surrogate measure of immunosuppressive effects. *Clin. Chemist.* 50:141-151.

**Hayward, A.R. 1994.** Síndromes de inmunodeficiencia congénita, p. 23.1-23.10. En J. Brostoff, G.K. Scadding, D. Male e I.M. Roitt (eds.), *Inmunología clínica*. Mosby/Doyma, Barcelona.

**Heather, L., Epps, V., Feldmesser, M. y Pamer, E.G. 2003.** Voriconazole inhibits fungal growth without impairin antigen presentation or T-cell activation. *Antimicrob. Agent Chemother.* 47: 1818-1823.

**Henry-Toulme, N., Sarthou, P., Seman, M. y Bolard, J. 1989.** Membrane effects of the polyene antibiotic amphotericin B and of some of its derivatives o lymphocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **91**:39-44.

**Herman, A., Kappler, J.W., Marrack, P. y Pullen, A.M. 1991.** Superantigens: mechanisms of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:745-772.

**Holland, S. M. 1997.** Neutropenia and neutrophil defects, p. 855-863. En N.R. Rose, E. Conway, J.D. Folds, H.C. Lane y R.M. Nakamura (eds.), *Manual of clinical laboratory immunology*. ASM Press, Washington.

**Houssiau, F.A., Vasconceles, C., D`Cruz, D., Garrido, E., Daniel, M.G., Adramovicz, D., Blockmans, D., Mathieu, A., Direskeneli, H., Galeazzi, M., Gul, A., Levy, Y., Petera, P., Popovic, R., Petrovic, R., Sinico, R.A., Cattaneo, R., Font, J., Depresseux, G., Cosyns, J.P. y Cervera, R. 2002.** Immunosuppressive therapy in lupus nephritis: Euro-lupus nephritis trial, a randomized trial of low-dose versus hig-dose intravenous cyclophosphamide. *Arthritis Rheum.* **46**:2121-2131.

**Hutchinson, C.R. y Fujii, I. 1995.** Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:201-238.

**Hutchinson, P., Jose, M., Atkins, R.C. y Holdsworth, S.R. 2004.** *Ex vivo* lymphocyte proliferative function is severely inhibited in renal transplant patients on mycophenolate mofetil treatment. *Transpl. Inmmunol.* **13**:55-61.

**Iino, Y., Toriyama, M., Natori, Y., Kudo, K. y Yuo, A. 1992.** Erythromycin inhibition of lipopolysaccharide-stimulated tumor-necrosis-factor-alpha

produced by human monocytes *in vitro*. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. **101**:16-20.

**Ishihara, K. y Hirano, T. 2002.** Molecular basis of the cell specificity of cytokine action. Biochim. Biophys. Acta. **1592**:281-296.

**Jacobs, S., Price Evans, D.A., Tariq, M. y Al Omar, NF. 2003.** Fluconazole improves survival in septic shock: a randomised double blind prospective study. Crit. Care Med. **31**: 1938-1946.

**Janeway, C.A. y Medzhitov, R. 1998.** Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. Semin. Immunol. **10**:349-350.

**Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. y Shlomchik, M.J. 2003.** Inmunobiología (2ª edición). Masson, Barcelona.

**Jimenez, P., Real, L.M., Lopez, M.A. y Ruiz, F. 1998.** Inmunodeficiencias congénitas y síndromes linfoproliferativos, p. 163-186. En M. Sánchez-Pérez (ed.), Inmunología aplicada y técnicas inmunológicas. Editorial Síntesis, Madrid.

**Jimenez-Valera, M., Sampedro, A., Moreno, E. y Ruiz-Bravo, A. 1995.** Modification of immune response in mice by ciprofloxacin. Antimicrob. Agents Chemother. **39**:150-154.

**Jimenez-Valera, M., Moreno, E. y Ruiz-Bravo, A. 1997.** Immunomodulation by antimicrobial agents. Recent Res. Devel. Antimicrob. Agents Chemother. **2**:83-94.

**Jimenez-Valera, M., Moreno, E., Amat, M.A. y Ruiz-Bravo, A. 2003.** Modification of mitogen-driven lymphoproliferation by ceftriaxone in

normal and immunocompromised mice. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:607-612.

**Jin, T.N., Sugiura, K., Ishikawa, J., Lee, S., Morita, H., Nagahama, T. e Ikehara, S. 1999.** Persistent tolerance induced after portal venous injection of allogeneic cells plus cyclophosphamide treatment. *Immunobiology* **200**:215-226.

**Kadir, T., Izzetin, F.V., Cevikbas, A., Johansson, C.B. y Clark, P. 2000.** *In vitro* effects of clarithromycin on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Chemotherapy* **46**:198-203.

**Kallstrom, T.J. 2004.** Evidence-based asthma management. *Respir. Care.* **49**:783-792.

**Kanda, N., Enomoto, U. y Watanabe. S. 2001.** Anti-mycotics suppress interleukin-4 and interleukin-5 production in anti-CD3 plus anti-CD28-stimulated T cells from patients with atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **117**:1635-1646.

**Kandimalla, E.R., Bhagat, L., Zhu, F.G., Yu, D., Cong, Y.P., Wang, D., Tang, J.X., Tang, J.Y., Knetter, C.F., Lien, E. y Agrawal, S. 2003.** A dinucleotide motif in oligonucleotides shows potent immunomodulatory activity and overrides species-specific recognition observed with CpG motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**:14303-14308.

**Karakaya, A., Gumusay, S., Yucesoy, B. y Hengirmen, S. 1995.** Effect of short-term therapy with ceftizoxime and ceftriaxone on human peripheral WBC, serum immunoglobulins and lymphocyte subpopulations. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **17**:775-781.

**Karima, R., Matsumoto, S., Higashi, H. y Matsushima, K. 1999.** The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol. Med. Today.* 5:123-32.

**Katz, L. y Donadio, S. 1993.** Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:875-912.

**Kawasaki, S., Takizawa, H., Ohtoshi, T., Takeuchi, N., Kohyama, T., Nakamura, H., Kasama, T., Kobayashi, K., Nakahara, K., Morita, Y. y Yamamoto, K. 1998.** Roxithromycin inhibits cytokine production by and neutrophil attachment to human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1499-1502.

**Kennedy, P. 1999.** The pathogenesis and modulation of the post-treatment reactive encephalopathy in a mouse model of human african tripanosomiasis. *J. Neuroimmunol.* 100:36-41.

**Kern, W.V., Cometta, A., De Rock, R., Langenaeken, J. y Gaya, H. 1999.** Oral versus intravenous empirical antimicrobial therapy for fever in patients with granulocytopenia who are receiving cancer chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 341:312-318.

**Khan, A.A., Slifer, T.R. y Remington, J.S. 1998.** Effect of trovafloxacin on production of cytokines by human monocytes. *Antimicrob. Agent Chemother.* 42:1713-1717.

**Kincade, P.W. y Gimble, J.M. 1989.** B lymphocytes, p. 41-67. En W.E. Paul (ed.), *Fundamental immunology*. Raven Press, New York.

Kloppenburger, M., Breedveld, F.C., Miltenburg, A.M. y Dijkmans, B.A. 1993. Antibiotics as disease modifiers in arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **11** (suppl 8):S113-S115.

Kloppenburger, M., Verweij, C.L., Miltenburg, A.M., Verhoeven, A.J., Daha, M.R., Dijkmans, B.A. y Breedveld, F.C. 1995. The influence of tetracyclines on T cell activation. *Clin. Exp. Immunol.* **102**:635-641.

Kloppenburger, M., Brinkman, B.M., De Rooij-Dijk, H.H., Miltenburg, A.M., Daha, M.R., Breedveld, F.C., Dijkmans, B.A. y Verweij, C. 1996. The tetracycline derivative minocycline differentially affects cytokine production by monocytes and T lymphocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:934-940.

Kohyama, T., Takizawa, H., Kawasaki, S., Akiyama, N., Sato, M. e Ito, K. 1999. Fourteen-member macrolides inhibit interleukin-8 release by human eosinophils from atopic donors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:907-911.

Konno, S., Adachi, M., Asano, K., Kawazoe, T., Okamoto, K. y Takahashi, T. 1992. Influences of roxithromycin on cell-mediated immune-responses. *Life Sci.* **51**:107-112.

Konno, S., Adachi, M., Asano, K., Okamoto, K. y Takahashi, T. 1993. Antiallergic activity of roxithromycin. Inhibition of interleukin-5 production from mouse lymphocyte-T. *Life Sci.* **52**:25-30.

Konno, S., Asano, K., Kurokawa, M., Ikeda, K., Okamoto, K. y Adachi, M. 1994. Antiasthmatic activity of a macrolide antibiotic, roxithromycin. Analysis of possible mechanisms *in vitro* and *in vivo*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **105**:308-316.

Krcmery, V., Trupl, I., Studena, V., Fuchsberger, P., Sufliarsky, I., Danisovicova, A., Krcmeryova, M. y Krak, E. 1994. Ceftriaxone plus amikacin versus ceftazidime plus amikacin in therapy of infections in patients with neutropenia without and with venous catheters, p. 530-531. En J. Einhorn, C. E. Nord y S. R. Norrby (eds.), Recent advances in chemotherapy. ASM, Washington.

Kretzmar, M., Gerinat, G., Bertsch, T., Walter, S., Hof, H. y Nichterlein, T. 2001. Influence of liposomal amphotericin B on CD8 T-cell function. Antimicrob. Agents Chemother. 45:2383-2385.

Kropec, A., Lemmen, S.W., Grundmann, H.J., Engels, I. y Dashner, F. 1995. Synergy of simultaneous administration of ofloxacin and granulocyte-colony-stimulating factor in killing of *Escherichia coli* by human neutrophils. Infection 23:298-300.

Kubo, S., Matsumoto, T., Takahashi, K., Haraoka, M., Tanaka, M., Sakamoto, M., Sakamoto, Y. y Kumazawa, J. 1994. Enhanced chemiluminescence response of polymorphonuclear leukocytes by new quinolone antimicrobials. Chemotherapy 40:333-336.

Kvapilova, M., Trnka, L., Svejcar, J. y Pekarek, J. 1975. Specific acquired resistance and activity of migration inhibition factor (MIF) in spleens of mice with chronic tuberculosis. Scand. J. Respir. Dis. 56:305-311.

Labro, M.T. 1998. Immunological effects of macrolides. Curr. Opin. Infect. Dis. 11:681-688.



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

**Lagothu, C., Bastard, J.P., Auclair, M., Maachi, M., Kornprobst, M., Capeau, J. y Caron, M. 2004.** Antirretroviral drugs with effects on adipocyte lipid metabolism and survival alter the expression and secretion of proinflammatory cytokines and adiponectin *in vitro*. *Antivir. Ther.* **9**:911-920.

**Lamster, I.B., Pullman, J.R., Celenti, R.S. y Grbic, J.T. 1996.** The effect of tetracycline fiber therapy on beta-glucuronidase and interleukin-1 beta in crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.* **23**:816-822.

**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.

**Lemster, B., Woo, J. y Thomson, A.W. 1993.** Blood lymphocytes of autoimmune diseases patients receiving FK506 exhibit normal *ex vivo* cytokine gene expression and proliferative responses. *Immunol. Lett.* **38**:179-183.

**Lenhoff, S. y Olofsson, T. 1996.** Effects of immunosuppressive drugs and antibiotics on GM-CSF and G-CSF secretion *in vitro* by monocytes, T lymphocytes and endothelial cells. *Br. J. Haematol.* **95**:33-38.

**Lenz, O. y Contreras, G. 2004.** Treatment options for severe lupus nephritis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **52**:356-365.

**Lewis, R., Kontoyiannis, D.P., Darouiche, R.O., Raad, I.I. y Prince, R.A. 2002.** Antifungal activity of anphotericin B, fluconazole and voriconazole in an *in vitro* model of *Candida* catheter-related bloodstream infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3499-3505.

**Liebowitz, D. 1998.** Pathogenesis of Epstein-Barr virus, p. 175-199. En D. J. McCance (ed.), *Human tumor viruses*. ASM Press, Washington.

**Liu, J., Kuszynski, C.A. y Baxter, B.T. 1999.** Doxycycline induces Fas Fas ligand-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**:562-567.

**Lounis, N., Bentoucha, A., Truffot-Pernot, C., Ji, B., O'Brien, RJ., Vernon A., Roscigno, G. and Grosset, J. 2001.** Effectiveness of once-weekly rifapentine and moxifloxacin regimens against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **12**: 3482-3486.

**Lumbreras, C., Lizasoain, M. y Aguado, JM. 2003.** Antifúngicos de uso sistémico. *Enferm. Infec. Microbiol. Clín.* **21**:366-380.

**Lundberg, I.E., Grundtman, C., Larsson, E. y Klareskog, L. 2004.** Corticosteroids: from an idea to clinical use. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **18**:7-19.

**Macneil, M., Haase, D.A., Tremaine, R. y Marrie, T.J. 1997.** Fever, lymphadenopathy, eosinophilia, lymphocytosis, hepatitis, and dermatitis. A severe adverse reaction to minocycline. *J. Amer. Acad. Dermatol.* **36**:347-350.

**Maertens, J. y Boogaerts, M.A. 1998.** Anti-infective strategies in neutropenic patients. *Acta Clin. Belg.* **53**:168-177.

**Mandell, L.A. 1982.** Effects of antimicrobial and antineoplastic drugs on the phagocytic and microbicidal function of the polymorphonuclear leukocytes. *Rev. Infect. Dis.* **4**:683-697.

**Margreiter, R. for the European tacrolimus vs ciclosporin microemulsion renal transplantation study group. 2002.** Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study. *Lancet* **359**: 741-746.

**Martín, J.C., Fernández, P., Soriano, V., Martínez, P. y González-Lahoz, J. 2000.** Carga viral y valores de linfocitos CD4+ en la era de la terapia antirretroviral altamente potente. *Med. Clín.* **115**: 118-118.

**Martorell, J. 1998.** Inmunología del trasplante, p. 271-287. En M. Sánchez-Pérez (ed.), *Inmunología aplicada y técnicas inmunológicas*. Editorial Síntesis, Madrid.

**Maschmeyer, G. 1999.** Interventional antimicrobial therapy in febrile neutropenic patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **34**:205-212.

**Matsumoto, T., Nagafuji, T., Takahashi, K., Kubo, S., Sakumoto, M., Mizunoe, Y. y Kumazawa, J. 1995.** Ofloxacin and fleroxacin enhance superoxide production in human polymorphonuclear leukocytes by increasing phosphorylation in the signal transduction pathway. *Int. J. Antimicrob. Agents* **6**:85-89.

**McChesney, M.B. y Oldstone, M.B.A. 1987.** Viruses perturb lymphocyte functions: selected principles characterizing virus-induced immunosuppression. *Annu. Rev. Immunol.* **5**:279-304.

**Meloni, F., Ballabio, P., Bianchi, L., Grassi, F.A. y Gialdroni Grassi, G.G. 1995.** Cefodizime modulates in vitro tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interleukin-8 release from human peripheal monocytes. *Chemotherapy* 41:289-295.

**Mensa, J., Gatell, J.M., Jimenez de Anta, M.T., Prats, G., Corachan, M., Escofet, M.C., Martinez, J.A. y Zamora, L. 1997.** Guía de terapéutica antimicrobiana 1997. Masson, Barcelona.

**Metcalf, D. 1977.** Hematopoietic colony. Springer-Verlag, Berlin.

**Migita, K., Origuchi, T., Kawabe, Y., Tominaga, M., Ida, H., Kawakami, A. y Eguchi, K.1999.** FK-506 markedly enhances apoptosis of antigen-stimulated peripheral T cell by down-regulation of Bcl-xL. *Transplantation* 68:1018-1023.

**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.* 41:117-121.

**Miller, S.I., Ernst, R.K. y Bader, M.W. 2005.** LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:36-46.

**Mims, C.A., Playfair, J.H.L., Roitt, I.M., Wakelin, D. y Williams, R. 1993.** Medical microbiology. Mosby, St. Louis.

**Miyake K. 2003.** Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int. Immunopharmacol.* 3:119-28.

**Mofatt, S.D. y Metcalfe, S.M. 2000.** Comparison between tacrolimus and cyclosporine as immunosuppressive agents compatible with tolerance induction by CD4/CD8 blockade. *Transplantation* **69**:1724-1726.

**Mora-Duarte, J., Betts, R., Rostein, C., Lopes, A., Thompson-Moya, L., Smietana, J., et al, for the caspofungin invasive candidiasis study group. 2002.** Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* **347**: 2020-2029.

**Morikawa, K., Oseko, F., Morikawa, S. e Iwamoto, K. 1994.** Immunomodulatory effects of three macrolides, midecamycin acetate, josamycin, and clarithromycin, on human T-lymphocyte function *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2643-2647.

**Morikawa, K., Zhang, J., Nonaka, M. Y Morikawa, S. 2002.** Modulatory effect of macrolide antibiotics on the Th<sub>1</sub>- and Th<sub>2</sub>-type cytokine production. *Int. J. Antimicrob. Agents* **19**:53-59.

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

**Mouton, J.W., Van Ogtrop, M.L., Andes, D. y Craig, W.A. 1999.** Use of pharmacodynamic indices to predict efficacy of combination therapy *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2473-2478.

**Murray, R., Mayes, P., Rodwell, V. y Granner, K. 2003.** *Harper's Biochemistry.*

Nagafuji, T., Matsumoto, T., Takahashi, K., Kubo, S., Haraoka, M., Tanaka, M., Ogata, N. y Kumazawa, J. 1993. Enhancement of superoxide production of polymorphonuclear neutrophils by ofloxacin and the effects of the inhibition of protein kinase C. *Chemotherapy* 39:70-76.

Nogal-Ruiz, J.J., Gomez-Barrio, A., Escario, J.A. y Martinez-Fernandez, A.R. 2003. Effect of Anapso in a murine model of experimental trichomoniasis. *Parasite* 10:303-308.

Núñez, R.M., Rodríguez, A.B., Garriga, C. y De la Fuente, M. 1989. *In vitro* and *in vivo* effects of imipenem on phagocytic activity of murine peritoneal macrophages. *APMIS* 97:879-886.

Oakley, K.L., Morrissey, G. y Denning, D.W. 1997. Efficacy of SCH-56592 in a temporarily neutropenic murine model of invasive aspergillosis with an itraconazole-susceptible and an itraconazole-resistant isolate of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1504-1507.

Ogayar, A. y Sánchez-Pérez, A. 1997. Algunos hitos conceptuales en la historia de la inmunología, p. 21-72. En M. Sánchez-Pérez (ed.), *Introducción a la inmunología humana*. Editorial Síntesis, Madrid.

O'Grady, J.G., Burroughs, A., Hardy, P., Elbourn, D., Truesdale, A. y The UK and Republic of Ireland liver transplant study group. 2002. Tacrolimus versus microemulsified ciclosporin in liver transplantation: the TMC randomised controlled trial. *Lancet* 360:1119-1125.

Ortega, E., De Pablo, M.A., Gallego, A.M., Alvarez, C., Pancorbo, P.L., Ruiz-Bravo, A. y Alvarez de Cienfuegos, G. 1997. Modification of natural immunity in mice by imipenem/cilastatin. *J. Antibiot.* 50:502-508.

Ortega, E., De Pablo, M.A., Gallego, A.M., Alvarez, C., Pancorbo, P.L., Ruiz-Bravo, A. y Alvarez de Cienfuegos, G. 1999. Effects of aztreonam on natural immunity in mice. *Int. J. Antimicrob. Agents* 13:41-46.

Ortega, E., De Pablo, M.A., Gaforio, J.J., Gallego, A.M., Alvarez, C., Ruiz-Bravo, A., Alvarez de Cienfuegos, G. 2000. Modification of acquired immunity in BALB/c mice by aztreonam. *Int. J. Antimicrob. Agents* 15:193-199.

Pacheco, Y., Hosni, R., Dagrosa, E.E., Gormand, F., Guibert, B., Chabannes, B., Lagarde, M. y Perrin-Fayolle, M. 1994. Antibiotics and production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human bronchial epithelial cells *in vitro*. A comparison of cefodizime and ceftriaxone. *Arzneimittelforschung* 44:559-563.

Perry, C.M. y Markham, A. 1999. Piperacillin/tazobactam. An updated review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs* 57:805-843.

Pierce, L.A., Tarnow-Mordi, W.O. y Cree, I.A. 1995. Antibiotic effects on phagocyte chemiluminescence *in vitro*. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 25:93-98.

Poluektova, L., Krzystyniak, K., Desjardins, D., Flipo, D. y Fournier, M. 1996. *In vitro* lymphotoxicity and selective T cell immunotoxicity of high doses of acyclovir and its derivatives in mice. *Int. J. Immunopharmac.* 18:429-438.

Popovic, N., Schubart, A., Goetz, B.D., Zhang, S.C., Linington, C. y Duncan, I.D. 2002. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline, *Ann. Neurol.* 51:215-223.

**Reato, G., Cuffini, A.M., Tullio, V., Palarchio, A., Bonino, A., Foa, R, y Carlone, M.A. 1999.** Co-amoxiclav affects cytokine production by human polymorphonuclear cells. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:715-718.

**Resino, S., Bellón, J.M., Gurbindo, D., Ramos, J.R., León, J.A. y Muñoz-Fernández, M.A. 2002.** Respuesta del tratamiento antirretroviral en niños infectados verticalmente por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. *Med. Clín.* **119**: 725-729.

**Reyes, E., Cardona, J., Prieto, A., Bernstein, E.D., Rodriguez-Zapata, M., Pontes, M.J. y Alvarez-Mon, M. 2000.** Liposomal amphotericin B and amphotericin B- deoxycholate show different immunoregulatory effects on human peripheral blood mononuclear cells. *J. Infect. Dis.* **181**: 2003-2010.

**Rogers, P.D., Stiles, J.K., Chapman, S.W. y Cleary, J.D. 2000.** Amphotericin B induces expression of genes encoding chemokines and cell adhesion molecules in human monocyte cell line THP-1. *J. Infect. Dis.* **182**:1280-1283.

**Riesbeck, K. 2002.** Immunomodulating activity of quinolones: a review. *J. Chemother.* **14**:3-12.

**Riesbeck, K., Forgren, A., Henriksson, A. y Bredberg, A. 1998.** Ciprofloxacin induces an immunomodulatory stress response in human T lymphocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1923-1930.

**Rogers, P.D., Stiles, J.K., Chapman, S.W. y Cleary, J.D. 2000.** Amphotericin B induces expression of genes encoding chemokines and cell adhesion molecules in the human monocytic cell line THP-1. *J. Infect. Dis.* **182**:1280-1283.



**Romero, E., Martin, M., Simarro, C. y Brime, J.I. 2002.** Hipertrofia cardiaca en pacientes con trasplante renal en tratamiento con tacrolimus. *Med Clin.* **119:** 715-715.

**Roselle, G.A. y Kauffman, C.A. 1978.** Amphotericin B and 5-fluorocytosine: *in vitro* effects on lymphocyte function. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14:**398-402.

**Roselle, G.A. y Kauffman, C.A. 1980.** Amphotericin B and 5-fluorocytosine: effects on cell-mediated immunity. *Clin. Exp. Immunol.* **40:**186-192.

**Roszkowski, W., Ciborowski, P., Ko, H.L., Schumacher-Perdreau, F., Roszkowski, K., Jeljaszewicz, J. y Pulverer, G. 1985<sup>a</sup>.** The effect of subinhibitory concentrations of selected antibiotics on bacteria-phagocyte interaction, p. 179-187. En D. Adam, H. Hahn y W. Opferkuch (eds.), *The influence of antibiotics on the host-parasite relationship. II.* Springer-Verlag, Berlin.

**Roszkowski, W., Ko, H.L., Roszkowski, K., Jeljaszewicz, J. y Pulverer, G. 1985<sup>b</sup>.** Effects of selected antibiotics on the cellular and humoral immune response in mice, p. 59-70. En G. Pulverer y J. Jeljaszewicz (eds.), *Chemotherapy and immunity.* Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.

**Roszkowski, W., Ko, H.L., Roszkowski, K., Ciborowski, P., Jeljaszewicz, J. y Pulverer, G. 1986.** Effects of ciprofloxacin on the humoral and cellular immune response in BALB/c-mice. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. Reihe A* **262:**396-402.

**Roth, J.A. 1988.** Enhancement of nonspecific resistance to bacterial infection by biological response modifiers, p. 329-342. En J.M. Roth (ed.), *Virulence*

mechanisms of bacterial pathogens. American Society for Microbiology, Washington.

**Ruiz-Bravo, A., Jimenez-Valera, M. y Roman, S.M. 1996.** Nonspecific modification of cellular immunity by *Yersinia enterocolitica*. *Immunol. Lett.* **49**:57-61.

**Ruiz-Bravo, A. 1997.** Inmunidad innata: complemento e inflamación, p. 121-146. En M. Sánchez-Pérez (ed.), *Introducción a la inmunología humana*. Editorial Síntesis, Madrid.

**Ruiz-Bravo, A. y Sánchez-Pérez, M. 1997.** Células, tejidos y órganos linfoides, p. 73-112. En M. Sánchez-Pérez (ed.), *Introducción a la inmunología humana*. Editorial Síntesis, Madrid.

**Ruiz-Bravo, A., Rotger, R. y Sánchez-Pérez, M. 1998.** Modificación de la respuesta inmunitaria e inmunización, p. 209-270. En M. Sánchez-Pérez (ed.), *Inmunología aplicada y técnicas inmunológicas*. Editorial Síntesis, Madrid.

**Rumbo, C., Emerick, K.M., Emre, S. y Shneider, B.L. 2002.** Azathioprine metadolite measurements in the treatment of autoimmune hepatitis in pediatric patients: a preliminary report. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **35**:391-398.

**Rutgeerts, P.J. 2004.** An historical overview of the treatment of Crohn's disease: why do we need biological therapies?. *Rev. Gastroenterol. Disord.* **4**: s3-s9.

**Saada, V., Pham-Huy, C., Voisin, J., Righenzi, S., Rucay, P., Claude J.R. y Duc, H.T. 1996.** Comparative evaluation of *in vitro* and *in vivo*

immunosuppressive potential of cyclosporin G with cyclosporin A and FK506. *Int. J. Immunopharmac.* **18**:79-87.

**Salazar, R., Sola, C., Maroto, P., Tabernero, J.M., Brunet, J., Verger, G., Valentí, V., Cancelas, J.A., Ojeda, B., Mendoza, L., Rodríguez, M., Montesinos, J. y Lopez-Lopez, J.J. 1999.** Infectious complications in 126 patients treated with high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **23**:27-33.

**Salkowski, C.A., Detore, G.R. y Vogel, S.N. 1997.** Lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A differentially regulate interleukin-12, gamma interferon, and interleukin-10 mRNA production in murine macrophages. *Infect. Immun.* **65**:3239-3247.

**Sainte-Marie, I., Tenaud, I., Jumbou, O. y Dreno, B. 1999.** Minocycline modulation of alpha-MSH production by keratinocytes *in vitro*. *Acta Derm. Venereol.* **79**:265-267.

**Sanati, H., Ramos, C.F., Bayer, A.S. y Ghannoum, M.A. 1997.** Combination therapy with amphotericin B and fluconazole against invasive candidiasis in neutropenic-mouse and infective-endocarditis rabbit models. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1345-1348.

**Sarthou, P., Primi, D. y Cazenave, P.A. 1986.** B cell triggering properties of nontoxic derivative of anphotericin B. *J. Immunol.* **137**:2156-2161.

**Sato, Y., Shishido, H., Kobayashi, H., Takeda, J., Irisawa, A., Miyata, M., Nishimaki, T., Fujita, T. y Kasukawa, R. 1999.** Adjuvant effect of a 14-member macrolide antibiotic on DNA vaccine. *Cell. Immunol.* **197**:145-150.

**Sawada, S., Suzuki, G., Kawase, Y. y Takaku, F. 1987.** Novel immunosuppressive agent, FK-506. *In vitro* effects on the cloned T cell activation. *J. Immunol.* **139**: 1797-1803.

**Sawitzke, A.D., Knudtson, K.L. y Cole, B.C. 1995.** Bacterial superantigens in disease, p. 145-169. En J.A. Roth, C.A. Bolin, K.A. Brogden, F.C. Minion y M.J. Wannemuehler (eds.), *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. ASM Press, Washington.

**Schultz, M.J., Speelman, P., Zaat, S., Van Deventer, S.J.H. y Van der Poll, T. 1998.** Erythromycin inhibits tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by heat-killed *Streptococcus pneumoniae* in whole blood. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1605-1609.

**Schultz, M.J., Speelman, P., Hack, C.E., Buurman, W.A., Van Deventer, S.J.H. 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.

**Schulz, T.F., Chang, Y. y Moore, P.S. 1998.** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8), p. 87-134. En D. J. McCance (ed.), *Human tumor viruses*. ASM Press, Washington.

**Schüpbach, J. 1999.** Human immunodeficiency viruses, p. 847-870. En P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover y R.H. Tenover (eds.), *Manual of Clinical Immunology*. ASM Press, Washington.

**Shaheen, F. y Collman, R.G. 2004.** Co-receptor antagonists as HIV-1 entry inhibitors. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **17**:7-16.

**Shalit, I., Kletter, Y., Halperin, D., Waldman, D., Vasserman, E., Nagler, A. Y Fabian, I. 2001.** Immunomodulatory effects of moxifloxacin in comparison to ciprofloxacin and G-CSF in a murine model of cyclophosphamide-induced leukopenia. *Eur. J. Haematol.* **66**: 287-296.

**Shapiro, M.A., Dever, J.A., Sesnie, J.C. y Vanderroest, S.R. 1997.** Comparative therapeutic efficacy of clinafloxacin in leucopenic mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:273-276.

**Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T.E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., Grant, F.J., Tackett, M., Krivan, W., McKnight, G., Clegg, C., Foster, D. y Klucher, K.M. 2003.** IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunol.* **4**:63-68.

**Shirley, S.F. y Little, J.R. 1979.** Immuopotentiating effects of amphotericin B. I. Enhanced contact sensitivity in mice. *J. Immunol.* **123**: 2878-2882.

**Siddiqui, J. 2004.** Immunomodulatory effects of macrolides: implications for practicing clinicians. *Am. J. Med.* **117**:26S-29S.

**Sin, D.D., Man, J., Sharpe, H., Gan, W.Q. y Man, S.F. 2004.** Pharmacological management to reduce exacerbations in adults with asthma: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* **292**:367-376.

**Sprent, J. 1989.** T lymphocytes and the thymus, p. 69-93. En W.E. Paul (ed.), *Fundamental immunology*. Raven Press, New York.

**Spychala, J. y Mitchell, B. 2002.** Cyclosporin A and FK506 decrease adenosine kinase activity and adenosine uptake in T-lymphocytes. *J. Lab. Clin. Med.* **140**:84-91.

**Steinbrink, K., Sorg, C. y Macher, E. 1996.** Low zone tolerance to contact allergens in mice: a functional role for CD8<sup>+</sup> T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* **183**:759-768.

**Sugiyama, K., Satoh, H. y Hirano, T. 2003.** Comparison of suppressive potency between azathioprine and 6-mercaptopurine against mitogen-induced blastogenesis of human peripheral blood mononuclear cell *in vitro*. *J. Pharm. Pharmacol.* **3**:393-398.

**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*. *Mediat. Inflamm.* **8**:199-204.

**Swierkosz, E. M. 2003.** Antiviral agents, p. 1607-1624. En Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.C. y Tenover, R.H. (eds.), *Clinical microbiology*, 8<sup>a</sup> edición. ASM Press, Washington.

**Sy, M.S., Miller, S.D. y Claman, H.N. 1977.** Immune suppression with supraoptimal doses of antigen in contact sensitivity. I. Demonstration of suppressor cells and their sensitivity to cyclophosphamide. *J. Immunol.* **119**:240-244.

**Tai, K.F., Ma, Y. y Weis, J.J. 1994.** Normal human B lymphocytes and mononuclear cells respond to the mitogenic and cytokine-stimulatory

activities of *Borrelia burgdorferi* and its lipoprotein OspA. *Infect. Immun.* **62**:520-528.

**Tamaki, K., Sayito, A. y Masaka, N. 1992.** Differential effect of griseofulvin on interferon-gamma-induced HLA-DR and intercellular adhesion molecule-1 expression of human keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* **127**:258-261.

**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.

**Tamaoki, J. 2004.** The effects of macrolides on inflammatory cells. *Chest* **125**:41S-51S.

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

**Thomas, D., Michou, V., Patargias, T., Moustakarias, T., Kanakas, N., Mantzavinos, T., Apostolidis, C., Salamalekis, E., Kalofoutis, A. y Tsilivakos, V. 2004.** The effect of valacyclovir treatment on natural killer of infertile women. *Am. J. Reprod. Immunol.* **51**:248-255.

**Tohyama, M., Kawakami, K. y Saito, A. 1996.** Anticryptococcal effect of anfotericin B is mediated through macrophage production of nitric oxide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1919-1923.

**Totsuka, K., Shiseki, M., Kikuchi, K. y Matsui, Y. 1999.** Combined effects of vancomycin and imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *in vitro* and *in vivo*. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:455-460.

**Toyama, K., Yaguchi, M., Onozawa, Y. y Aoki, I. 1994.** Clinical evaluation of combination therapy of tobramycin and ceftazidime for treatment of severe infections in patients with hematological diseases, p. 531-532. En J. Einhorn, C. E. Nord y S. R. Norrby (eds.), Recent advances in chemotherapy. ASM, Washington.

**Tribl, G.G., Wöber, Ch., Schönborn, V., Brücke, T., Deecke, L. y Pnazer, S. 2001.** Amantadine in parkinson´s disease: lymphocyte and IĒ2 secreting T cell precursor frequencies. *Exp. Gerontol.* **36**:1761-1771.

**Tsytsykova, A.V. y Goldfeld, A.E. 2000.** Nuclear factor of activated T cells transcription factor NFATp controls superantigen-induced lethal shock. *J. Exp. Med.* **192**:581-586.

**Tufano, M.A., Cipollaro, G., Ianniello, R., Baroni, A. y Galdiero, F. 1992.** Antimicrobial agents induce monocytes to release IL-1 alpha, IL-6, and TNF, and induce lymphocytes to release IL-4 and TNF tau. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **14**:769-782.

**Uriarte, E. 2001.** Farmacología. Quimioterapia antiviral a comienzos del siglo XXI. *Offarm* **20**:80-104.

**Uriarte, S.M., Molestina, R.E., Miller, R.D., Antimicrob. Agents Chemother. Bernabo, J., Farinati, A., Eiguchi, K., Ramírez, J.A. y Summergill, J.T. 2004.** Effects of fluorquinolones on the migration of human phagocytes through *Clamydia pneumoniae*-infected and tumor necrosis factor alpha-stimulated endotelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2538-3543.

**Vandercam, B., Gerain, J., Humblet, Y., Ferrant, A., Wauters, G., Moreau, M., Longueville, J., Symann, M. y Straetmans, N. 2000.** Meropenem versus



ceftazidime as empirical monotherapy for febrile neutropenic cancer patients. *Ann. Hematol.* **79**:152-157.

**Van Langevelde, P., Van Dissel, J.T., Ravensbergen, E., Appelmelk, B.J., Schrijver, I.A. y Groeneveld, P.H.P. 1998.** Antibiotic-induced release of lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*: quantitative measurements and biological reactivities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:3073-3078.

**Van Rensburg, C.E.J., Jooné, G. y Anderson, R. 1990.** Interactions of the oxygen-dependent antimicrobial system of the human neutrophil with difloxacin, ciprofloxacin, pefloxacin and fleroxacin in the intraphagocytic eradication of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **32**:15-17.

**Van Vlem, B., Vanholder, R., De Paepe, P., Vogelaers, D. y Ringoir, S. 1996.** Immunomodulating effects of antibiotics: literature review. *Infection* **24**:275-291.

**Vazifeh, D., Bryskier, A. y Labro, M.T. 2000.** Effect of proinflammatory cytokines on the interplay between roxithromycin, HMR 3647, or HMR 3004 and human polymorphonuclear neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:511-521.

**Vélez, A. y Moreno, J.C. 2002.** Novedades en el tratamiento de la dermatitis atópica. *Piel* **17**:239-241.

**Walker, C., Thomas, J., Nango, S., Lennon, J., Wetzell, J. y Powala, C. 2000.** Long-term treatment with subantimicrobial dose doxycycline exerts no antibacterial effect on the subgingival microflora associated with adult periodontitis. *J. Periodontol.* **71**:1465-1471.

Walsh, T.J., Lee, J. y Dismukes, W.E. 2002. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N. Engl. J. Med.* **346**:225-234

Wandinger, K.P., Hagenah, J.M., Klüter, H., Rothermundt, M., Peters, M. y Vieregge, P. 1999. Effects of amantadine treatment on *in vitro* production of interleukin-2 in de-novo patients with idiopathic Parkinson's disease. *J. Neuroimmunol.* **98**:214-220.

Wang, S.H. 1994. Response of non-Hodgkin's lymphoma to a new protocol, COP-PYAM regimen, p. 1039-1040. En J. Einhorn, C. E. Nord y S. R. Norrby (eds.), *Recent advances in chemotherapy*. ASM, Washington.

Weimer, R., Melk, A., Daniel, V., Friemann, S., Padberg, W. y Opelz, G. 2000. Switch from cyclosporine A to tacrolimus in renal transplant recipients: impact on T<sub>H1</sub> T<sub>H2</sub> and monokine responses. *Hum. Immunol.* **61**:884-897.

Weiss, T., Shalit, I., Blau, H., Werber, S., Halperin, D., Levitov, A. y Fabian, I. 2004. Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on activated human monocytic cells: inhibition of NF- $\kappa$ B and mitogen-activated of proinflammatory cytokines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1974-1982.

Werber, S., Shalit, I., Fabian, I., Steuer, G., Weiss, T. y Blau, H. 2005. Moxifloxacin inhibits cytokine-induced MAP kinase and NF- $\kappa$ B activation as well as nitric oxide synthesis in a human respiratory epithelial cell line. *J. Antimicrob. Chemother.* (on line). DOI:101093/jac/dkh525.

Williams, R.C., Paquette, D.W., Offenbacher, S., Adams, D.F., Armitage, G.C., Bray, K., Caton, J., Cochran, D.L., Drisko, C.H., Fiorellini, J.P., Giannobile, W.V., Grossi, S., Guerrero, D.M., Johnson, G.K., Lamster, I.B., Magnusson, I., Oringer, R.J., Persson, G.R., Van Dyke, T.E., Wolff,

**L.F., Santucci, E.A., Rodda, B.E. y Lessem, J. 2001.** Treatment of periodontitis by local administration of minocycline microspheres: a controlled trial. *J. Periodontol.* **72**:1535-1544.

**Wise, R. 1999.** Revisión de la farmacología clínica de moxifloxacino, una nueva 8-metoxiquinolona, y su potencial relación con la eficacia terapéutica. *Clin. Drug invest.* **17**: 365-388.

**Woo, P.C.Y., Chow, L.W.C., Ma, E.S.K. y Yuen, K.Y. 1999<sup>a</sup>.** Clarithromycin attenuates the inflammatory response induced by surgical trauma in a guinea pig model. *Pharmacol. Res.* **39**:49-54.

**Woo, P.C.Y., Tsoi, H.W., Wong, L.P., Leung, H.C.H. y Yuen, K.Y. 1999<sup>b</sup>.** Antibiotics modulate vaccine-induced humoral immune response. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**:832-837.

**Yamaguchi, H., Abe, S. y Tokuda, Y. 1993.** Immunomodulating activity of antifungal drugs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **685**:447-457.

**Yao, J.D.C. y Moellering, R.C. 1999.** Antibacterial agents, p. 1474-1504. En Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. y Tenover, F.C. y Tenover, F.C. y Tenover, F.C. y Tenover, F.C. y Tenover, F.C. y Tenover, F.C. y Tenover, F.C. y Tenover, F.C. y Tenover, F.C. y Tenover, F.C. (eds.), *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington.

**Yokochi, I., Narita, K., Morikawa, A., Takahashi K., Kato, Y., Sugiyama, T., Koide, N., Kawai, M., Fukada, M. y Yoshida, T. 2000.** Morphological change in *Pseudomonas aeruginosa* following antibiotic treatment of experimental infection in mice and its relation to susceptibility to phagocytosis and to release of endotoxin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:205-206.

**Yoshimura, T., Kurita, C., Usami, E., Nakao, T., Watanabe, S., Kobayashi, J., Yamazaki, F. y Nagai, H. 1996.** Immunomodulatory action of levofloxacin on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Chemotherapy* **42**:459-464.

**Zervos, E.E., Bass, S.S., Robson, M.C. y Rosemugry, A.S. 1996.** Fluconazole increases bactericidal activity of neutrophils. *J. Trauma.* **41**: 10-14.



8. GLOSARIO.



**ALG:** anti-lymphocyte globulin, inmunoglobulina antilinfocitos.

**ALS:** anti-lymphocyte serum, suero antilinfocitos.

**BRM:** biological response modifier, modificador de la respuesta biológica.

**cAMP:** cyclic AMP, AMP cíclico.

**CMI:** concentración mínima inhibitoria del crecimiento bacteriano.

**ConA:** concanavalina A, lectina, mitógeno de células T.

**CSF:** colony stimulating factor, factor estimulador de colonias.

**CTL:** cytotoxic T lymphocytes, células T citotóxicas.

**EPS:** extracellular polymeric substance, polisacáridos extracelulares.

**FCS:** fetal calf serum, suero fetal de ternera.

**FKBP:** FK506 binding proteins, proteínas que unen FK506 (tacrolimus).

**G-CSF:** granulocyte colony stimulating factor, factor estimulador de colonias de granulocitos.

**GM-CSF:** granulocyte-macrophage colony stimulating factor, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

**HAART:** highly active antiretroviral therapy, terapia antirretroviral de alta eficacia.

**ICAM:** intercellular adhesion molecule, proteína de adhesión celular.

**IFN:** interferón.



- IL:** interleukin, interleukinas (citokinas producidas por leucocitos).
- ISCOM:** immunostimulating **complexes**, complejos que estimulan la respuesta inmune frente a antígenos incorporados en ellos.
- LPS:** lipopolisacárido (endotoxina de bacterias Gram-negativas), mitógeno de células B.
- MDP:** muramil **dipéptido**.
- MHC:** major histocompatibility complex, complejo principal de histocompatibilidad.
- MPL:** mono-phosphoril-lípido A, derivado atóxico del lípido A.
- MTT:** methylthiazoletetrazolium, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
- Multi-CSF:** multi colony stimulating factor, factor multifuncional (IL-3).
- NF-AT:** nuclear factor of activated T cells, factor de transcripción que participa en la activación de células T.
- NF- $\kappa$ B:** nuclear factor  $\kappa$ B, factor de transcripción importante en la activación de células inflamatorias.
- NK:** natural killer, células citotóxicas naturales.
- PHA:** phytohemagglutinin A, fitohemaglutinina A, lectina, mitógeno de células T.
- PAMPs:** pathogen-associated molecular patterns, perfiles moleculares asociados a patógenos.
- PBPs:** penicillin-binding proteins, proteínas de superficie de la penicilina.
- PKC:** proteín-kinasa C.
- PRRs:** pattern recognition receptors, receptores que reconocen PAMPs.
- SCID:** severe combined immunodeficiency disease, inmunodeficiencia severa combinada.
- TGF- $\beta$ :** transforming growth factor beta, factor de crecimiento transformante beta.
- TLRs:** Toll-like receptors, PRRs con homología con la proteína Toll de *Drosophila*.
- TNF:** tumor necrosis factor, factor de necrosis tumoral.

