

Bitácora@ Artículos

Efecto inmunomodulador de antibióticos macrólidos sobre células inmunes

Autores: Fernando César Boscot†, Carolina Olivera†, Gloria Janet Godoy, Florencia Celeste Salazar, Rubén Darío Motrich y Virginia Elena Rivero*.

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Haya de la Torre esq. Medina Allende (5000), Ciudad Universitaria, Córdoba Capital, Argentina.

† Ambos autores contribuyeron igualmente al trabajo.

*mail: vrivero@fcq.unc.edu.ar

RESUMEN

Los macrólidos son muy conocidos por su uso como antibióticos, sin embargo, algunos trabajos también han descripto efectos inmuno-moduladores luego de su uso. En el presente estudio examinamos los efectos de Claritromicina (CAM) sobre cultivos de células mononucleares de bazo de ratón. Para ello, células mononucleares de bazo de ratón fueron estimuladas in vitro con lipopolisacárido bacteriano (LPS) o con anticuerpos monoclonales anti-CD3/anti-CD28 junto con diferentes dosis de CAM. Luego de 24 o 48 horas de cultivo se analizaron distintos marcadores de activación celular por citometría de flujo y los niveles de las citocinas IL-10, IL-6, INF γ e IL-17 en sobrenadantes de cultivo por ELISA. La presencia de CAM junto a los estímulos, indujo una disminución significativa de distintos marcadores de activación de linfocitos T, B y macrófagos como las moléculas CD69, CD86 y CMH II. De la misma manera, los niveles de las citocinas IL-10, IL-6, INF γ e IL-17 se encontraron significativamente disminuidos en los sobrenadantes estimulados en presencia de CAM. Nuestros resultados confirman que este macrólido, además de sus acciones antimicrobianas, posee efectos anti-inflamatorios e inmuno-moduladores afectando tanto a células de la inmunidad innata como a las de la inmunidad adaptativa.

Palabras clave: Claritromicina* Efecto inmunomodulador* Macrólidos* Antibióticos* Células inmunes*

ABSTRACT

Macrolides are well known for their use as antibiotics, however, some reports have described immunomodulatory effects after their use. In the present study we examined the effects of Clarithromycin (CAM) on mouse spleen mononuclear cells cultures. For this, mouse spleen mononuclear cells were in vitro stimulated with bacterial lipopolysaccharide (LPS) or with anti-CD3 / anti-CD28 monoclonal antibodies together with different doses of CAM. After 24 or 48 hours of culture, different markers of cell activation were analyzed by flow cytometry and cytokine levels in culture supernatants examined by ELISA. A significant decrease in activation markers was observed in macrophages, T and B lymphocytes in the presence of CAM together with the stimuli. Indeed, CD69, CD86 and MHC II expression was significantly reduced in the presence of CAM together with the stimuli. In addition, IL-10, IL-6, INF γ and IL-17 cytokine levels were significantly decreased in the supernatants from cells stimulated in the presence of CAM. Our results confirm that this macrolide, in addition to its antimicrobial actions, has anti-inflammatory and immunomodulatory effects affecting cells from both innate and adaptive immunity.

Keywords: Clarithromycin * Immunomodulatory effect * Macrolides * Antibiotics * Immune cells *

INTRODUCCIÓN

Los macrólidos son una compleja y amplia familia de antibióticos derivados de las especies *Streptomyces* que se caracterizan por tener un anillo macrocíclico de lactona con 14 a 16 miembros, siendo el prototipo la Eritromicina (ERI) (1). Desde el descubrimiento de ERI, se han sumado a este grupo nuevos compuestos, hasta contar en la actualidad con más de 10 productos en el mercado. No obstante, los más representativos por su efectividad, costos y dosis lo constituyen la Claritromicina (CAM), la Azitromicina (AZT) y la Roxitromicina (2). Ellos difieren entre sí por la cantidad de átomos y su sustitución en el anillo de lactona patrón. Si bien se reconoce su amplio efecto antibiótico (generalmente bacteriostático, pudiendo ser bactericida a dosis altas) cada vez existen más estudios que revelan sus propiedades inmuno-moduladoras y anti-inflamatorias (1, 2).

Los primeros reportes que mostraron el efecto anti-inflamatorio e inmuno-modulador de los macrólidos fueron estudios con pacientes asmáticos severos, que requirieron menos dosis de esteroides luego de la administración de un antibiótico macrólido de características similares a la ERI (3). Posteriormente, se reportó el beneficio de administrar macrólidos, logrando disminuir las dosis de esteroides, en pacientes con asma infeccioso (3, 4). Se ha sugerido también un efecto inmunomodulador de los mismos, en el tratamiento de la enfermedad pulmonar panbronquiolitis difusa (PBD) (5), donde el tratamiento con ERI por períodos de 2 a 48 meses, mostró un incremento significativo de la sobrevida y mejoría en diversos parámetros clínicos (5).

Los efectos anti-inflamatorios e inmuno-moduladores de los macrólidos observados en pacientes asmáticos y con PBD han sido reproducidos en modelos murinos de asma (6). Además, diferentes estudios han demostrado efectos "*in vitro*" de estos fármacos sobre células epiteliales, células dendríticas, macrófagos y Linfocitos T (LT) (7-9). Los efectos descriptos mostraron disminución de citocinas pro-inflamatorias, disminución en la expresión de moléculas de activación (8, 9) y disminución de la proliferación de LT (9), observándose diferentes efectos con distintos macrólidos (7-9). Aunque la mayoría de los estudios "*in vitro*" han analizado los efectos de AZM, también se han reportado efectos para CAM y ERI (1). La administración de CAM en un modelo de infección murino por virus influenza produjo aumento de IgA en las secreciones (10) y disminución de los niveles séricos de metaloproteasas, modulando la inflamación y reduciendo la permeabilidad vascular en la fase temprana de la infección (11). Los resultados sugieren que los efectos inmuno-moduladores estarían limitados a los miembros del grupo lactona de 14 y 15 miembros, como la ERI, CAM y AZM (1). Aunque existe evidencia "*in vitro*" e "*in vivo*" que soporta el efecto inmunomodulador de los macrólidos; se requieren aún más estudios que permitan identificar qué efectos tienen sobre diferentes poblaciones celulares y que otros factores son modulados por estos antibióticos. En el presente estudio analizamos el efecto de CAM sobre la activación de macrófagos, linfocitos B (LB) y LT de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de células de bazo murinas

Se trabajó con ratones de la cepa C57BL/6 endocriados en el bioterio del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, de acuerdo con los requisitos del comité de ética institucional. Los mismos fueron sacrificados en una campana de extracción con campo de esterilidad, se extrajo el bazo que fue colocado sobre una malla metálica en una placa de Petri conteniendo 10 ml de solución fisiológica estéril suplementada con Suero Fetal Bovino (SBF) (Natocor) al 10% v/v estéril. Posteriormente en campana de flujo laminar clase II se procedió a la disgregación mecánica del órgano para generar una suspensión celular homogénea. Inmediatamente se centrifugó la suspensión por 5 minutos a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante y al pellet celular obtenido se le agregó 1 ml de

Buffer de Lisis (Sigma-Aldrich, pH 7,5±0,2) con el fin de eliminar los eritrocitos. Luego de 10 min se frenó la lisis agregando una solución de buffer fosfato salino (PBS) suplementada con SFB al 10%. Se realizó una segunda centrifugación y el pellet celular fue re-suspendido en 4 ml de medio de cultivo "Roswell Park Memorial Institute" Sin Rojo Fenol (RPMI SRF) 1.640 (GIBCO-Invitrogen) suplementado con SFB al 10%, L-Glutamina 2mM, 2β Mercaptoetanol 50mM y Gentamicina (50µg/mL) para evitar su posible contaminación. Finalmente se realizó un recuento de leucocitos vivos en cámara de Neubauer mediante tinción con azul de tripán

Estimulación de células de bazo en presencia de CAM

Las células obtenidas por los métodos antes descriptos fueron resuspendidas en RPMI suplementado y agregadas en una densidad de 8×10^4 células/pocillo a una placa estéril de 96 pocillos de fondo plano. Debido a que la CAM fue resuspendida en Dimetil Sulfoxido (DMSO) y que éste es tóxico para las células, se incluyó además como control células resuspendidas en RPMI completo adicionado con DMSO (0,1%). También se incluyeron células incubadas en presencia de: CAM (Parafarm lote L12002) a dos concentraciones diferentes (25 µg/mL y 50 µg/mL), LPS de *E coli* 1 µg/mL (Serotipo O55:B5, Sigma, EEUU) y CAM (25µg/ml y 50 µg/mL) + LPS. Por otro lado se incubaron células en presencia o no de CAM en una placa estéril previamente sensibilizada con anticuerpos monoclonales anti-CD3 (1µg/ml) y anti-CD28 (0,25µg/ml). En todas las condiciones mencionadas las células fueron incubadas durante 24 o 48 horas en estufa a 37°C y 5% de CO₂. Transcurridas las 24 o 48 hs. de incubación se separaron las células del sobrenadante, las células fueron utilizadas para el análisis de viabilidad y la determinación de moléculas de superficie por citometría, mientras que el sobrenadante de 48 hs. fue separado y conservado a -80°C para el posterior estudio de citoquinas.

Determinación de viabilidad

Las células incubadas en las condiciones antes mencionadas fueron recolectadas a las 24 o 48hs., se les agregó 1µl del colorante ioduro de propidio (PI, BD Pharmingen™) e inmediatamente fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Bioscience) para determinar el porcentaje de viabilidad celular. El PI tiene la propiedad de intercalarse en el DNA nuclear y colorear células cuyas membranas nucleares se encuentran dañadas, diferenciando células vivas (PI negativas) de células muertas (PI positivas). Los datos fueron analizados utilizando el programa FlowJo (Versión 7.6.2).

Determinación de moléculas de superficie por Citometría de Flujo

Luego de la estimulación con LPS o antiCD3/CD28 en presencia o no de distintas concentraciones de CAM, las células fueron recolectadas y se agregaron anticuerpos monoclonales conjugados a diferentes fluorocromos que reconocen las moléculas CD45 (marcador pan-leucocitario), CD3 (marcador de LT), CD19 (marcador de LB) y F4/80 (marcador de macrófagos). Se realizaron además combinaciones con anticuerpos monoclonales que reconocen las moléculas del CMH clase II, CD86, CD80 y CD69, cuya expresión se induce luego de la activación. Las células fueron incubadas por 30 minutos con las mezclas de anticuerpos conjugados, lavadas y resuspendidas en PBS para ser adquiridas en el citómetro FACS Canto II. Los datos se analizaron con el programa FlowJo (Versión 7.6.2).

Determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo

Los sobrenadantes de cultivo recolectados a las 48hs y conservados a -80°C, fueron utilizados para determinar las concentraciones de diferentes citocinas, utilizando kits comerciales de ELISA, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las citocinas evaluadas en este trabajo fueron IFN-γ (Kit comercial BD), IL-17A (Kit comercial Biolegend), IL-10 (Kit comercial BD) e IL-6 (Kit comercial eBioscience).

Análisis estadístico

El estudio estadístico se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA). Los experimentos fueron realizados en dos oportunidades diferentes y cada condición por duplicado. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Para analizar el efecto del macrólido CAM sobre la viabilidad celular a las dosis estudiadas, en primer lugar, se descartó el efecto de muerte celular inducido por DMSO o LPS a las concentraciones utilizadas. Como se muestra en la Figura 1, a los dos tiempos estudiados (24 y 48 hs.), no se observaron cambios importantes en la viabilidad celular en todas las condiciones de trabajo. Por otro lado al agregar los estímulos (LPS o anti-CD3/antiCD28) tampoco se observaron cambios significativos en el porcentaje de células vivas a las 24 o 48 horas. De la misma manera en presencia de los estimulantes (anti-CD3/antiCD28 o LPS) y CAM (25 o 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no se observaron efectos significativos sobre la viabilidad celular (Fig 1A y 1B).

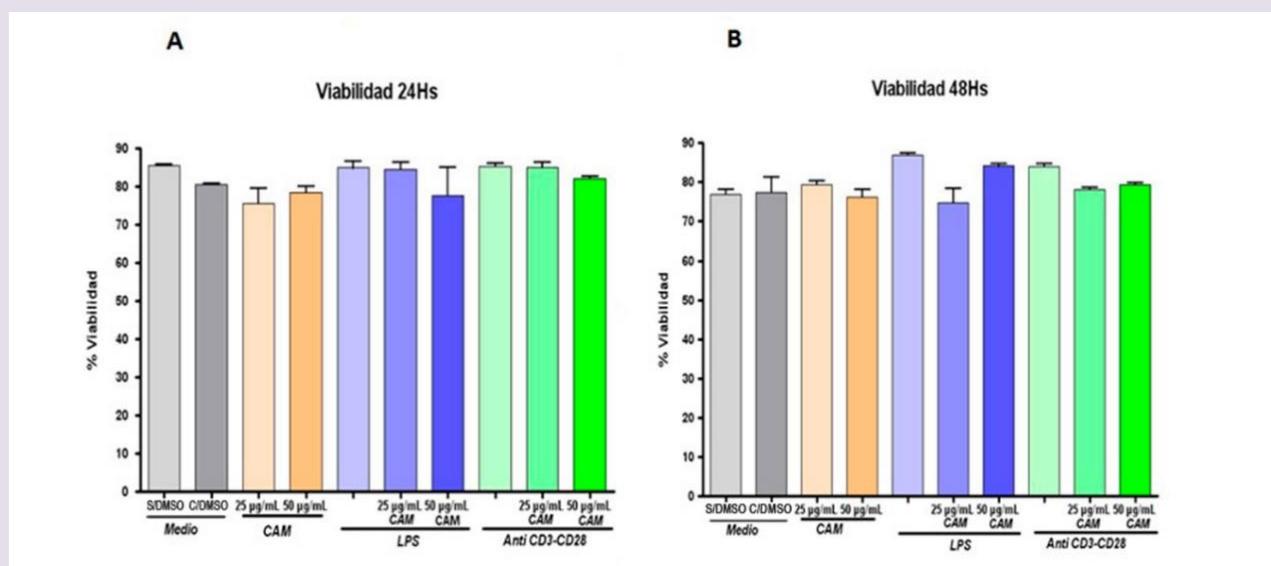


Figura 1: Efectos de CAM sobre viabilidad celular. Células de bazo murinas fueron cultivadas por 24 horas (A) o 48 horas (B) en medio con y sin DMSO, CAM (Clarithromicina), LPS (Lipopolisacárido de *E.coli*) solo y en presencia de diferentes concentraciones de CAM y un activador de células T (Anti CD3-CD28) solo y en presencia de CAM. Se determinó la cantidad de células vivas utilizando yoduro de propidio mediante citometría de flujo.

Para estudiar el posible efecto inmuno-modulador de CAM sobre los linfocitos T (CD45+/CD3+) se analizó la expresión del marcador de activación temprana CD69 en esta población, luego de la activación con anti-CD3/anti-CD28 y/o en presencia o ausencia de CAM. En la figura 2A se puede observar una escasa proporción de células CD3+CD69+ en el estado basal (células cultivadas sólo con medio, con o sin DMSO), al analizar las células CD3+ en presencia de ambas concentraciones de CAM, tampoco se observa diferencias en la expresión de esta molécula en los linfocitos T. La activación de los LT mediante el agregado de anti-CD3/anti-CD28 produjo, como era esperable, un aumento significativo de LT CD69+, pero sorpresivamente cuando los linfocitos fueron activados en presencia de CAM a 25 ó 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en ambos casos se observó una disminución significativa del porcentaje de LT CD69+ (Figura 2A). Cuando se analizó, no sólo el porcentaje de LT expresando CD69, sino también el nivel de expresión de esta molécula por célula (Intensidad de Fluorescencia Media ó MFI) se observó que el estímulo con anti CD3/anti-CD28 indujo un mayor nivel de expresión de CD69

en las células CD3+, evidenciado por valores de MFI mayores. La activación de los LT en presencia de CAM resultó en una expresión significativamente menor de CD69 sobre los LT (Figura 2B).

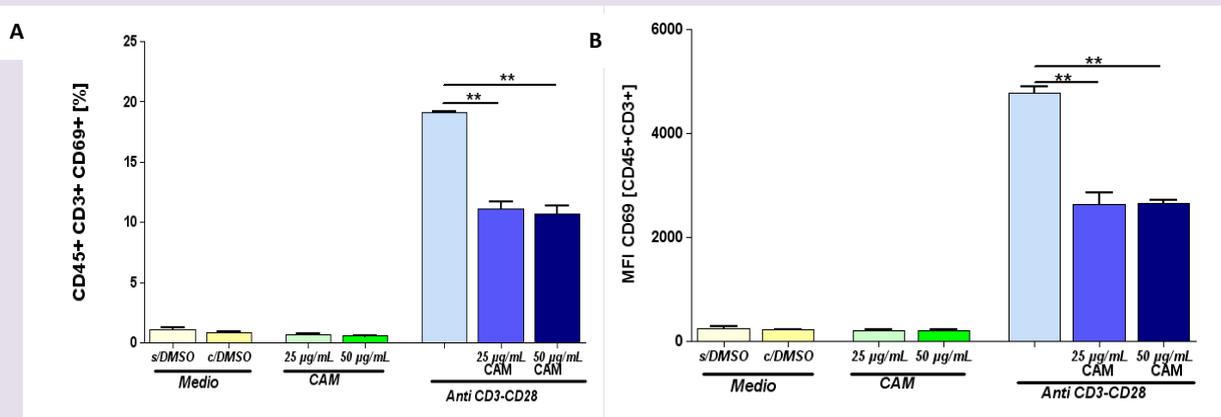


Figura 2: Efecto de CAM sobre células T. Células de bazo murinas fueron cultivadas en presencia de medio solo, con estímulo anti CD3/antiCD28 y/o con CAM a dos concentraciones distintas durante 24 horas. La suspensión celular fue luego marcada con anticuerpos anti-CD45, anti-CD3 y anti-CD69. **A)** Porcentaje de células CD45+CD3+ que expresan CD69, en cada condición. **B)** Nivel de expresión de CD69 en la superficie de cada célula CD45+CD3+, expresado como MFI, para cada condición. Las células fueron adquiridas en el citómetro FACS Canto II y analizadas con el programa FlowJo. El experimento fue realizado en dos oportunidades. * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$.

Para estudiar el posible efecto inmuno-modulador de CAM sobre los Linfocitos B (CD45+/CD19+), las células fueron estimuladas con LPS, un conocido activador policlonal de LB. Debido a que los LB cuando se activan de esta manera aumentan la expresión de moléculas del CHM clase II y de moléculas co-estimuladoras, se analizó la expresión de estas moléculas en la población CD45+/CD19+ luego de la activación en presencia o ausencia de CAM. En cuanto al porcentaje de células CD45+/CD19+ que expresaban CMH II o CD86, no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes condiciones estudiadas y el estado basal (datos no mostrados). En cuanto a las células activadas con LPS se observaron mayores valores de MIF para CMH II y CD86, sin embargo, no se observaron cambios significativos en el nivel de expresión de CMH II en los LB estimulados con LPS en

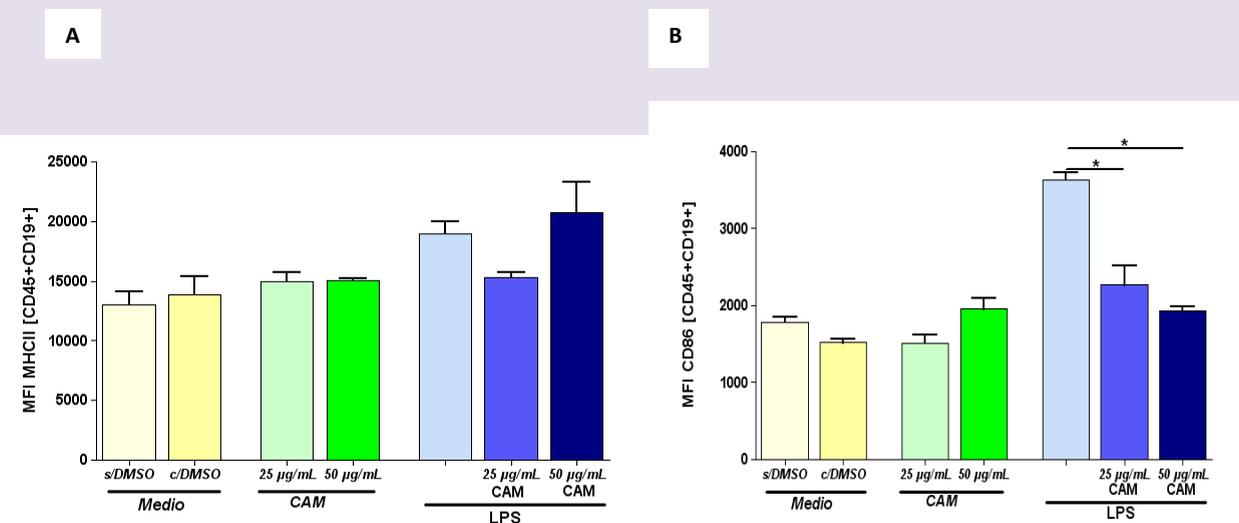
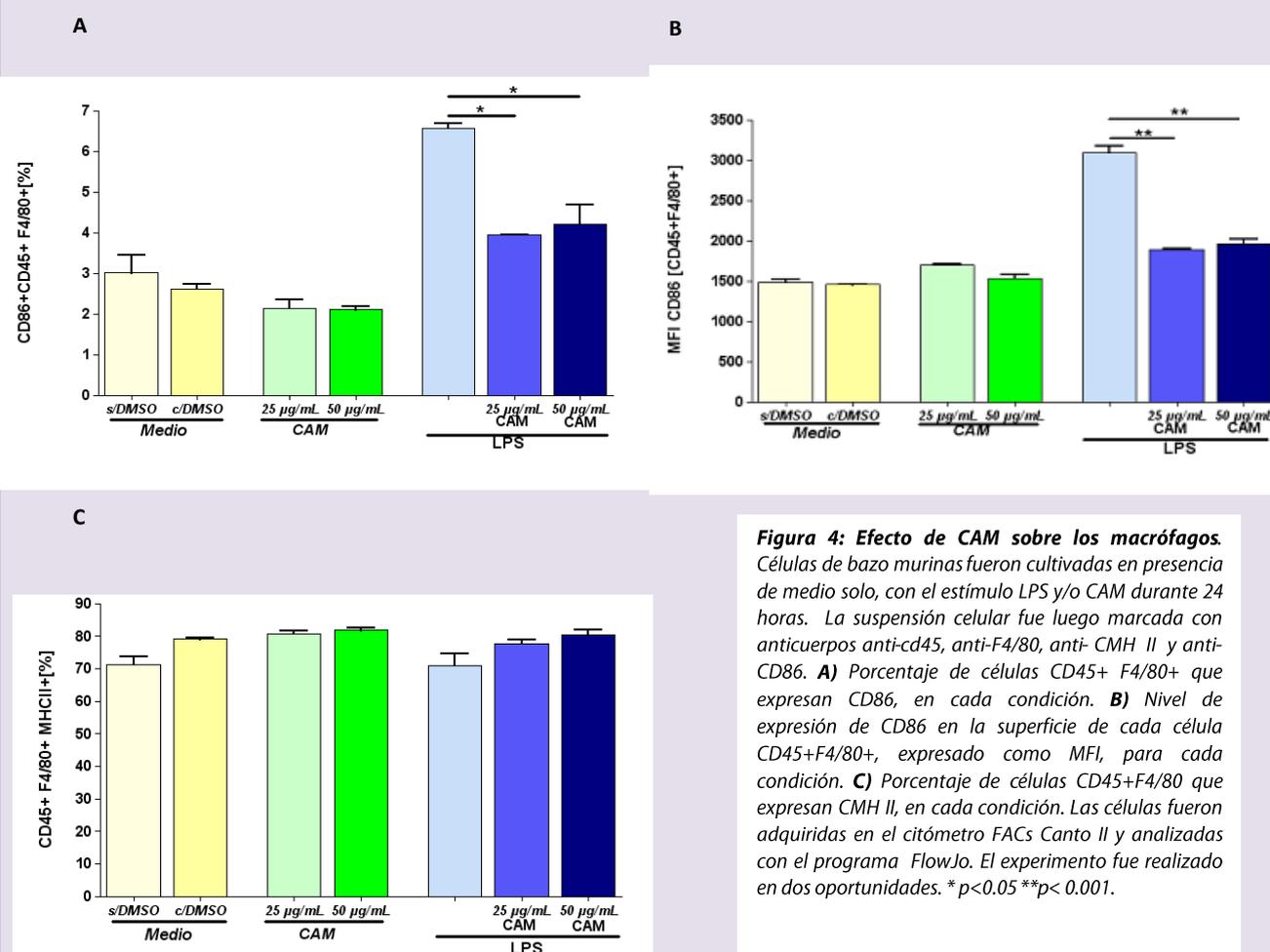


Figura 3: Efecto de CAM sobre Células B. Células de bazo murinas fueron cultivadas en presencia de medio solo, con el estímulo LPS y/o con CAM durante 24 horas. La suspensión celular fue marcada con anticuerpos anti-CD45, anti-CD19, anti-MHC II y anti-CD86. En los gráficos se observan el nivel de expresión de CMH II (**A**) y CD86 (**B**) en la superficie de cada célula CD45+CD19+, expresado como MFI, para cada condición. Las células fueron adquiridas en el citómetro FACS Canto II y analizadas con el programa FlowJo. El experimento fue realizado en dos oportunidades. * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$.

presencia de ambas concentraciones de CAM (Figura 3A). En cuanto a la expresión de la molécula CD86 en las células CD19+ estimuladas, se observó una disminución de la misma en presencia de CAM a ambas concentraciones. (Figura 3B).

Para analizar el efecto de CAM sobre los macrófagos (CD45+/F480+), también se utilizó como estímulo LPS. Los macrófagos estimulados de esta manera incrementan su capacidad fagocítica como así también su acción como célula presentadora de antígeno (CPA) (5). Se analizó la expresión CMH II, CD80 y CD86 en la población CD45+/F480+ luego de la activación con LPS en presencia o ausencia de CAM. En la figura 4A se puede observar el porcentaje de macrófagos que expresan CD86, y en la figura 4B el nivel de expresión de dicha molécula en la superficie celular (MIF). Al comparar el estado basal con la condición en la cual se exponía las células únicamente a la presencia de CAM, no se observó una variación significativa ni en el porcentaje de macrófagos que expresan CD86 (Fig. 4A), ni en los niveles de MIF de la misma (Fig. 4B). Ante la presencia únicamente de LPS tanto el porcentaje de células F480+CD86+ como el nivel de expresión de CD86 incrementó significativamente (Fig. 4A y 4B), indicando que LPS efectivamente indujo la activación de los macrófagos. Por otro lado al agregar CAM

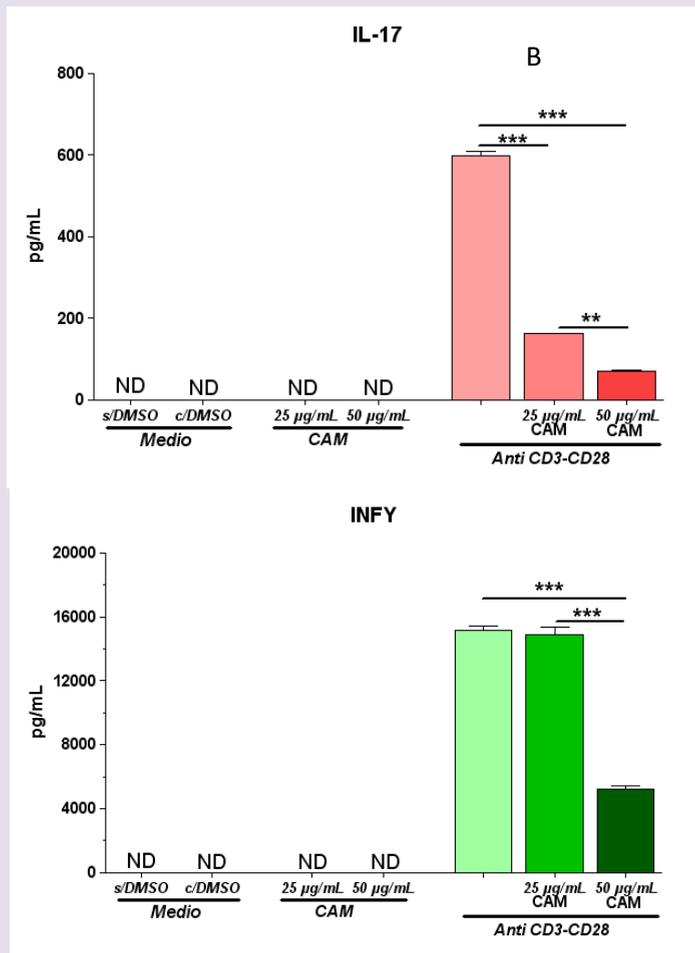


a los macrófagos activados se produjo una disminución significativa tanto del nivel de expresión como del porcentaje de macrófagos CD86+. Como se observa en la Figura 4C no se observaron cambios para el porcentaje de macrófagos que expresan CMH II en presencia de CAM.

Finalmente estudiamos el efecto de CAM sobre la secreción de citocinas en el sobrenadante de cultivo recogido a las 48hs. Luego de la estimulación con anti-CD3/anti-CD28 se observó un aumento significativo en los niveles de IL-17 e IFN-γ. Mientras que al estimular las células y agregar al medio CAM en ambas dosis ensayadas, las concentraciones de IL-17 e IFN-γ disminuyeron significativamente (Figura 5A y 5B). Además, se puede observar que a mayor concentración de CAM en cultivo, mayor fue el efecto inhibitorio sobre la liberación de estas citocinas. Por otro lado, al analizar el efecto CAM sobre la producción de IL-10 se observaron resultados similares, altos niveles de IL-10 luego del estímulo con LPS y una disminución significativa a la dosis 50 µg/mL de CAM (Figura 5C).

Finalmente, al agregar CAM a ambas dosis a las células estimuladas con LPS, también se observó una disminución en la secreción de IL-6 en (Figura 5D).

A



C

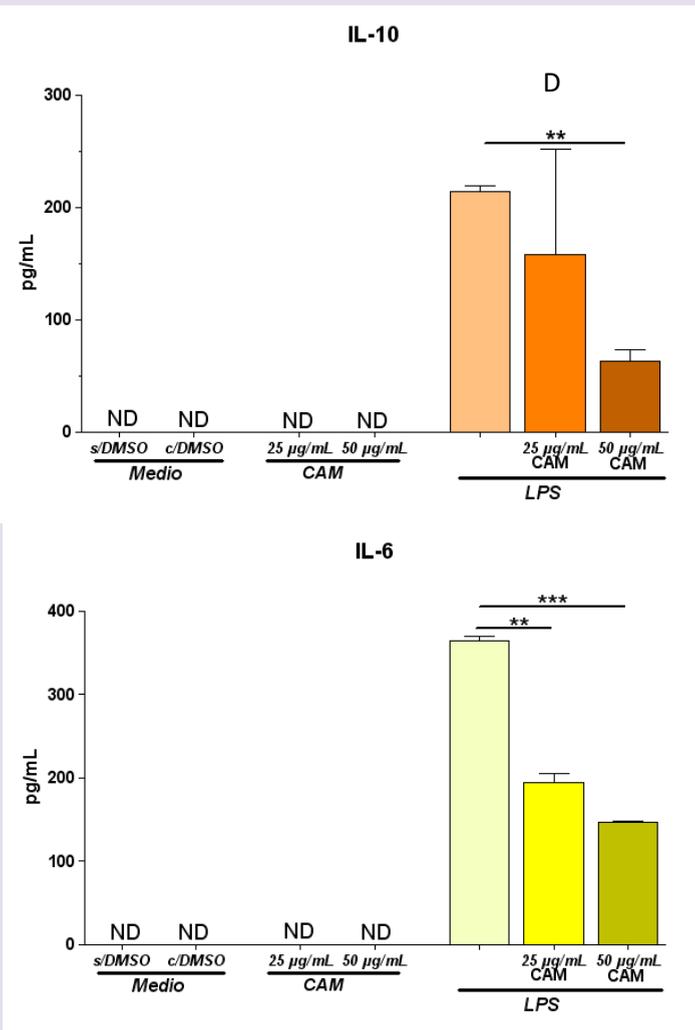


Figura 5: Efectos de CAM sobre la producción de citocinas. Células de bazo murinas fueron cultivadas con medio solo, y estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 o LPS y/o con CAM a dos concentraciones (25 ó 50 ug/mL) durante 48 horas. Se determinó la concentración de citocinas en sobrenadante de cultivo utilizando la técnica de ELISA indirecto. El experimento fue realizado en dos oportunidades. * $p < 0.05$.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En el presente estudio hemos demostrado el efecto inmuno-modulador de CAM tanto sobre células del sistema inmune innato como adaptativo. Al igual que lo observado en otros trabajos en los que se evaluó la apoptosis de LT (9, 12), no encontramos un efecto significativo de CAM sobre la viabilidad celular a las dosis ensayadas. En el trabajo antes citado, los autores demostraron efectos de CAM sobre la proliferación de LT CD4⁺ humanos (9,12). En nuestro estudio, luego de estimular a los LT con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28, los cuales interactúan con el receptor de los LT induciendo la expresión de marcadores de activación temprana como la molécula CD69 y la secreción de citocinas como INF γ e IL17, encontramos que en presencia de CAM, se inducía una menor expresión de la molécula CD69, lo cual está de acuerdo con los resultados encontrados por estos autores. Además, ellos en sus experimentos demostraron que la disminución de la proliferación de linfocitos T por AZT y CAM era dosis dependiente, y que AZT tenía mayor efecto que CAM, necesiéndose una mayor dosis de CAM para alcanzar el mismo efecto que AZT (12). En nuestro estudio también se pudo observar que a mayor concentración de CAM más fuerte era su efecto inhibitorio. En otros trabajos realizados en modelos in vivo se mostró que AZT redujo la expansión de células reactivas en trasplantes hematopoyéticos, aumentando la expansión de células T regulatorias (Treg) (13).

Por otro lado, para estimular a las células de la inmunidad innata utilizamos LPS bacteriano, que interactúa con receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) como por ejemplo, el receptor TLR4. LPS induce en macrófagos un aumento en la expresión de moléculas del CMH y moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, induciendo además la secreción de citocinas como IL-6. LPS también induce la activación de LB aumentando la expresión de CMH clase II y moléculas CD80, CD86. En estudios realizados in vitro con células dendríticas murinas, se ha demostrado que CAM y AZT aumentan la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80, pero no de CD86 (11). Por el contrario, en el trabajo de Amantea y colaboradores se observó que AZT suprimía la inducción de CD80 y CD86 por LPS (14).

En nuestro trabajo, evaluamos la acción de CAM sobre la capacidad de los LB de comportarse como célula presentadora de antígeno, demostrando que CAM no tiene efecto sobre la expresión de MHC II, pero sí un efecto inhibitorio en la expresión de CD86. Nuestros resultados como los del trabajo de Sugiyama y colaboradores demuestran que CAM tiene un efecto inhibitorio sobre las células presentadoras de antígeno (15) y en nuestro conocimiento, éste es el primer trabajo donde se demuestra un efecto de CAM sobre LB.

Nuestros resultados demostraron además efectos inhibitorios sobre la activación de macrófagos. Otros estudios han señalado efectos de AZT en modelos de isquemia cerebral donde el tratamiento con este macrólido redujo el número de neutrófilos y macrófagos infiltrando la zona dañada, como así también se observó un cambio del fenotipo de los macrófagos hacia un perfil M2 (protector) en los ratones tratados, por lo que los autores sugieren un efecto inmunomodulador que reduce el daño en la zona infartada (14). Namkoong y colaboradores (16) investigaron los efectos de CAM en modelos murinos de neumonía post virus influenza y también realizaron estudios en pacientes. Los autores observaron que luego de administrar CAM se encontraban mayores proporciones de células CD11b+GR1⁺ en bazo y pulmón y que el pretratamiento con CAM aumentaba la supervivencia de los animales en un modelo de shock inducido por LPS. Estas células CD11b+GR1⁺ protegieron a los animales de la neumonía post influenza (16). La presencia de células con un fenotipo similar también fue observada en humanos voluntarios que recibieron CAM. Las células CD11b+GR1⁺ han sido ampliamente descritas por sus capacidades moduladoras y fueron denominadas como células mieloides supresoras, las cuales se postula que participan en la resolución de la inflamación y el

establecimiento de la homeostasis limitando la función de LT, induciendo linfocitos Treg y secretando citocinas supresoras (17).

Cuando analizamos la producción de citocinas en sobrenadante de cultivo, encontramos que la presencia de CAM redujo los niveles de las cuatro citocinas medidas, IL-17, INF γ , IL-10 e IL-6. Esta misma tendencia fue informada en otros estudios donde se encontraron también disminuciones de IL-6, INF γ y TNF α en presencia de AZT (9). En el trabajo de Sugiyama se demostró que AZT aumentaba la producción de IL-10, mientras que CAM no tenía efectos (15).

La bibliografía y nuestros estudios demuestran que los antibióticos macrólidos, ejercen un efecto inmuno-modulador sobre algunas células del sistema inmunitario, como macrófagos, linfocitos T y B. Además estos efectos no son iguales para todos los macrólidos, sino que dentro de este grupo podemos encontrar diferentes efectos, produciendo inhibiciones en algunos casos y favoreciendo acciones en otros. Se han observado diferencias en cuanto a la potencia de sus efectos, observándose que se necesitan diferentes concentraciones de los distintos macrólidos para obtener un mismo nivel de resultado.

Nuestros resultados confirman que CAM, además de sus acciones antimicrobianas, posee efectos anti-inflamatorios e inmuno-moduladores afectando tanto a células de la inmunidad innata como a las de la inmunidad adaptativa.

AGRADECIMIENTOS: A la doctora Mónica García del Depto. de Farmacología que generosamente nos donó la claritomicina (Ingrediente farmacéutico activo) para hacer las pruebas. Al Dr. Fabio Cerbán y su grupo de investigación por la donación del LPS y el RPMI SRF.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shinkai M, Henke MO, Rubin BK. Macrolide antibiotics as immunomodulatory medications: proposed mechanisms of action. *Pharmacol Ther.* 2008; 117(3):393-405
2. Mencarelli A, Distrutti E, Renga B. Development of non-antibiotic macrolide that corrects inflammation-driven immune dysfunction in models of inflammatory bowel diseases and arthritis. *Eur J Pharmacol.* 2011 Aug 31;665(1-3):29-39
3. Wong EH, Porter JD, Edwards MR, Johnston SL. The role of macrolides in asthma: current evidence and future directions. *Lancet Respir Med.* 2014 Aug;2(8):657-70. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70107-9.
4. Wong EH, Porter JD, Edwards MR, Johnston SL. The role of macrolides in asthma: current evidence and future directions. *Lancet Respir Med.* 2014 Aug; 2(8):657-70.
5. Schultz MJ. Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jul;54(1):21-8
6. Kang JY, Jo MR, Kang HH. Long-term azithromycin ameliorates not only airway inflammation but also remodeling in a murine model of chronic asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2016 Feb;36:37-45.
7. Yamamoto K, Yamamoto S, Ogasawara N. Clarithromycin prevents human respiratory syncytial virus-induced airway epithelial responses by modulating activation of interferon regulatory factor-3. *Pharmacol Res.* 2016 Sep;111:804-14.
8. Vrančić M, Banjanac M, Nujić K. Azithromycin distinctively modulates classical activation of human monocytes in vitro. *Br J Pharmacol.* 2012 Mar;165(5):1348-60.

9. Lin SJ, Kuo ML, Hsiao H. Azithromycin modulates immune response of human monocyte-derived dendritic cells and CD4(+) T cells. *Int Immunopharmacol.* 2016 Nov;40:318-326.
10. E. Takahashi, K. Kataoka, I.L. Indalao, K. Konoha, K. Fujii, J. Chida, D. Mizuno, K. Fujihashi, H. Kido, Oral clarithromycin enhances airway immunoglobulin A (IgA) immunity through induction of IgA class switching recombination and B-cellactivating factor of the tumor necrosis factor family molecule on mucosal dendritic cells in mice infected with influenza A virus, *J. Virol.* 86 (2012) 10924–10934
11. Takahashi E, Indalao IL, Sawabuchi T, Mizuno K, Sakai S, Kimoto T, Kim H, Kido H. Clarithromycin suppresses induction of monocyte chemoattractant protein-1 and matrix metalloproteinase-9 and improves pathological changes in the lungs and heart of mice infected with influenza A virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2018 Feb; 56:6-13. doi: 10.1016/j.cimid.2017.11.002.
12. Ratzinger F, Haslacher H, Poepl W. Azithromycin suppresses CD4+ T-cell activation by direct modulation of mTOR activity. *Scientific Reports.* 2014; Dec; 4: 7438.
13. Radhakrishnan SV, Palaniyandi S, Mueller G. Preventive Azithromycin Treatment Reduces Noninfectious Lung Injury and Acute Graft-versus-Host Disease in a Murine Model of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Jan; 21(1):30-8.
14. Amantea D, Certo M. Azithromycin protects mice against ischemic stroke injury by promoting macrophage transition towards M2 phenotype. *Exp Neurol.* 2015. Jan. 275 1:116-25.
15. Sugiyama K, Shirai R, Mukae H, et al. Differing effects of clarithromycin and azithromycin on cytokine production by murine dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology.* 2007; 147(3):540-546.
16. Namkoong H, Ishii M, Fujii H, Yagi K, Asami T, Asakura T, Suzuki S, Hegab AE, Kamata H, Tasaka S, Atarashi K, Nakamoto N, Iwata S, Honda K, Kanai T, Hasegawa N, Koyasu S, Betsuyaku T. Clarithromycin expands CD11b+Gr-1+ cells via the STAT3/Bv8 axis to ameliorate lethal endotoxic shock and post-influenza bacterial pneumonia. *PLoS Pathog.* 2018 Apr 5; 14(4):e1006955. doi:10.1371/journal.ppat.1006955.
17. Dorhoi A, Du Plessis N. Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Chronic Infections. *Front Immunol.* 2018 Jan 4; 8:1895. doi: 10.3389/fimmu.2017.01895. eCollection 2017. Review. PubMed PMID: 29354120;