Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Medicina

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina

TESIS DOCTORAL

EXPRESIÓN INFLAMATORIA EN LA NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD QUE NO RESPONDE AL TRATAMIENTO

Presentada por María José Lorenzo Dus

DIRECTORES:

Dr. Juan Ruiz Manzano

Dra Rosario Menéndez Villanueva

Dr. Benjamín Sarrià Chust

TUTOR: **Dr. Juan Ruiz Manzano**

Barcelona, 2016

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

El Dr. Juan Ruiz Manzano, Jefe del Servicio de Neumología del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona y Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada: EXPRESIÓN INFLAMATORIA EN LA NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD QUE NO RESPONDE AL TRATAMIENTO, presentada por la licenciada en Medicina y Cirugía, María José Lorenzo Dus para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo su dirección y considera que reúne los requisitos formales y científicos para proceder a su lectura y defensa pública.

Dr. Juan Ruiz Manzano

Barcelona, 2016

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

La Dra. Rosario Menéndez Villanueva, Jefe del Servicio de Neumología del Hospital Universitari i Politécnic La Fe de Valencia

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada: EXPRESIÓN INFLAMATORIA EN LA NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD QUE NO RESPONDE AL TRATAMIENTO, presentada por la licenciada en Medicina y Cirugía, María José Lorenzo Dus para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo su dirección y considera que reúne los requisitos formales y científicos para proceder a su lectura y defensa pública.

Dra Rosario Menéndez Villanueva

Barcelona, 2016

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

El Dr. Benjamín Sarrià Chust, Profesor Titular del Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada: EXPRESIÓN INFLAMATORIA EN LA NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD QUE NO RESPONDE AL TRATAMIENTO, presentada por la licenciada en Medicina y Cirugía, María José Lorenzo Dus para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo su dirección y considera que reúne los requisitos formales y científicos para proceder a su lectura y defensa pública.

Dr. Benjamín Sarrià Chust

Barcelona, 2016

A mis padres, por su cariño, su confianza, su apoyo y ayuda constante e incondicional.

A mis hermanas, por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia.

A Alejandro, por sus consejos, por tener su apoyo y cariño.

A mis hijos Alba y Miguel, por ser la alegría y la luz de todos los días.

Y muy especialmente a mi querido hermano Miguel (1978-1999).

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis es el resultado de un largo trabajo en el que de manera directa o indirecta se han visto implicadas muchas personas. Por ello me gustaría expresar mi profundo agradecimiento a todos aquellos que en cierto modo han contribuido a poder llevarla adelante.

En primer lugar, quisiera reconocer a mis directores de tesis – la Dra. Rosario Menéndez Villanueva, el Dr. Benjamín Sarrià Chust y el Dr. Juan Ruiz Manzano – su tiempo, disposición y proximidad, así como su dedicación en el presente trabajo.

Al Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de Valencia, al Dr Julio Cortijo y al Dr. Esteban Morcillo por el apoyo prestado para la realización de los trabajos que componen esta tesis y en especial a la Dra. Inés Moret, trabajadora incansable, por su labor en el procesamiento de muestras clínicas, por su interés, capacidad de trabajo y por estar ahí en todo momento.

Quisiera además agradecer a mis compañeros del Servicio de Neumología del Hospital Universitario La Fe, y en especial a la Unidad de Técnicas de Neumología, todas las facilidades proporcionadas durante el proceso de recogida de muestras. Sobre todo me gustaría expresar mi agradecimiento al Dr. Pepe Sanchis, responsable de la constitución de esta Unidad en el Hospital Universitario La Fe. Gracias Pepe, por haberme animado a seguir adelante y por despertar en mí el interés por las técnicas. Igualmente al Dr. Enrique Cases, continuador del proyecto y actual responsable de la Unidad, quién ha colaborado muy activamente y ha contribuido a mi formación en este campo.

También me gustaría expresar mi agradecimiento a mis compañeros del Servicio de Neumología del Hospital Arnau de Vilanova, que me han acogido de forma excelente en mi nuevo lugar de trabajo y de forma muy especial al Jefe de Servicio, Dr. Juan José Soler por la confianza que desde el principio depositó en mí.

Por último, quisiera hacer una mención a todos los pacientes que desinteresadamente dieron su consentimiento y participaron en los estudios que componen esta tesis y a sus familiares. Ellos son la razón de nuestros esfuerzos y el motivo para continuar investigando.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS 15

1-PRESENTACIÓN Y JUSTIFICACIÓN 17

2-ANTECEDENTES DEL TEMA 21

2.1-Introducción.

2.2-Defensa pulmonar frente a la infección

2.2.1-Inmunidad innata pulmonar y reclutamiento de neutrófilos

2.2.2-Papel de la apoptosis del neutrófilo en la resolución de la respuesta inflamatoria aguda y defensa del huésped

2.3-Inflamación sistémica: papel de las citocinas en la defensa del huésped

2.4-Macrólidos e inmunomodulación

3-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO 1 37

4-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO 2 41

5-PUBLICACIONES ORIGINALES 45

5.1-Artículo 1: "Increased lung neutrophil apoptosis and inflammation resolution in nonresponding pneumonia". *Eur Respir J* 2011;38:1158-64. 49

5.2-Artículo 2: "Lung inflammatory pattern and antibiotic treatment in pneumonia". *Respir Res* 2015;16:15. 59

6-RESULTADOS 69

7-DISCUSIÓN 87

8-CONCLUSIONES 95

9-BIBLIOGRAFÍA 99

LISTA DE ABREVIATURAS

BTS: British Thoracic Society

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FQ: Fibrosis quística

G-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos

IDSA/ATS: Infectous Diseases Society of America/American Thoracic Society

IL: Interleucina

INF: Interferón

LBA: Lavado broncoalveolar

LTB4: Leucotrieno B_4

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno

NAC: Neumonía adquirida en la comunidad

NF-κβ: Factor nuclear-κβ

PAF: Factor activador de plaquetas

PCR: Proteína C Reactiva

PCT: Procalcitonina

SEPAR: Sociedad Española de Neumología y cirugía Torácica

TNF: Factor de necrosis tumoral

UCI: Unidad de cuidados intensivos

PRESENTACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

1-PRESENTACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La presente Tesis Doctoral está estructurada siguiendo las directrices de la normativa para la presentación de la Tesis Doctoral por compendio de publicaciones, aprobada por la comisión de doctorado de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) con fecha de 16 de julio de 2016.

Los estudios que forman parte de esta Tesis Doctoral pertenecen a una misma línea de investigación dirigida al conocimiento de la inflamación sistémica y pulmonar en la Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC) y su relación con parámetros de resolución clínica del proceso infeccioso.

Los estudios están recogidos en dos artículos originales y publicados en revistas de amplia difusión internacional en el campo de la neumología, con un factor impacto global de 9,646. Dichos artículos se presentan en su versión original en inglés.

El primer estudio de esta Tesis Doctoral evalúa el estado de activación del neutrófilo y su apoptosis así como el patrón de respuesta inflamatoria a nivel local (en lavado broncoalveolar) y a nivel sistémico (en sangre periférica), en pacientes hospitalizados con NAC que no responde al tratamiento antibiótico.

Los resultados obtenidos del primer estudio permiten ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de respuesta inflamatoria implicados en el control y resolución de la neumonía que no responde al tratamiento.

El segundo estudio de esta Tesis Doctoral analiza el perfil inflamatorio sistémico y pulmonar en pacientes hospitalizados por NAC no respondedora que habían recibido tratamiento combinado con macrólidos o tratamiento sin macrólidos. Además se evaluó el impacto del tratamiento con macrólidos sobre los parámetros de resolución clínica de la NAC.

Los resultados obtenidos del segundo estudio proporcionan información relevante sobre los efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores de los macrólidos que les otorgan un papel diferente respecto a las utilidades clásicas como antibióticos abriendo por tanto nuevas posibilidades terapéuticas en la NAC.

ANTECEDENTES DEL TEMA

2-ANTECEDENTES DEL TEMA

2.1-Introducción

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) continúa siendo un problema de salud mundial. Presenta una incidencia de 3 a 5 casos por 1.000 habitantes por año en la población adulta. Esta incidencia se ve incrementada con la edad y la presencia de comorbilidades (1,2,3). Es la infección que con mayor frecuencia condiciona el ingreso hospitalario, de tal modo que el 40 % de los pacientes con NAC requieren hospitalización y alrededor del 10% de los hospitalizados precisarán ingreso en una unidad de cuidados intensivos (UCI) (1).

A pesar de los avances en la terapia antimicrobiana con disponibilidad de nuevos y potentes antibióticos y vacunas efectivas, la NAC continúa siendo la causa más frecuente de muerte debido a infección en países desarrollados. La mortalidad de la NAC se sitúa en torno al 1% en el paciente ambulatorio y entre el 5 y 15 % en pacientes hospitalizados inmunocompetentes (4,5).

La mayoría de los pacientes hospitalizados por NAC responden favorablemente al tratamiento antibiótico inicial, sin embargo entre un 10-25% de ellos presentan un fracaso al tratamiento antibiótico empírico y un en 10% de los casos pueden desarrollar una neumonía rápidamente progresiva de riesgo vital (6). La mortalidad, en estos casos de no respuesta al tratamiento, presenta un aumento importante, pudiendo alcanzar cifras de hasta el 40-49% (7,8,9). En estas situaciones, los síntomas y signos de infección persisten sin alcanzar la estabilidad clínica apareciendo distintos cuadros clínicos producidos por la diseminación de la infección y el fracaso de órganos. En su forma más grave, la NAC cursa con un deterioro clínico que en general, suele ocurrir en las primeras 72 horas, con insuficiencia respiratoria grave o necesidad de ventilación mecánica y/o aparición de shock séptico (10,11) o necesidad de ingreso en UCI (12).

En este contexto, el término *Neumonía que no responde* define una situación en la cual está presente una respuesta clínica inadecuada a pesar del tratamiento antibiótico. De forma general, la falta de respuesta depende de factores relacionados con la gravedad inicial, con el microorganismo causal y con las características del huésped.

La Infectous Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults (IDSA/ATS) (13) define la *"nonresponding pneumonia"* (o neumonía que no responde) como la ausencia o retraso en alcanzar la estabilidad clínica en el plazo de 72 horas teniendo en cuenta que la mediana en días necesarios para alcanzar dicha estabilidad es de 3 dias (14). Menéndez y colaboradores (8), en un estudio multicéntrico en pacientes hospitalizados por NAC, diferenciaron fracaso precoz (*"early failure")* definido como deterioro clínico dentro de las primeras 72 horas de iniciado el tratamiento antibiótico por una o más de las siguientes causas: inestabilidad hemodinámica, aparición o empeoramiento de fracaso respiratorio, necesidad de ventilación mecánica, progresión radiológica o aparición de nuevos focos de infección; y fracaso tardío *("late failure")*, definido como persistencia o reaparición de la fiebre y síntomas o instabilidad hemodinámica, el desarrollo o empeoramiento de fracaso respiratorio (saturación de oxígeno <90% o presión parcial arterial de oxígeno (PaO2) >60 mmHg respirando aire ambiente, progresión radiológica o la aparición de nuevos focos infecciosos tras 72 horas de tratamiento antibiótico.

La etiología de la NAC que no responde puede ser infecciosa hasta en un 40% de los casos, mientras que se ha observado que en aproximadamente un 15% de los casos la causa es no infecciosa (15). Los microorganismos identificados con mayor frecuencia son *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus spp*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa y* enterobacterias (7). Es por tanto importante destacar que hasta en un 30% de los casos de NAC, no se identifica la causa específica de falta de respuesta (10). La actuación ante una NAC que no responde debe incluir una reevaluación completa que confirme o reconsidere el diagnóstico de NAC y poder descartar así otros diagnósticos alternativos. Esta nueva reevaluación de la NAC incluiría la obtención de muestras para examen microbiológico mediante técnicas no invasivas e incluso invasivas a través de broncoscopio como cepillo y/o lavado broncoalveolar (LBA); y el empleo de otras técnicas de imagen como la Tomografía computarizada torácica (13,15,16) que permitiría además examinar mediastino, posibles complicaciones pleurales y el parénquima pulmonar.

2.2-Defensa pulmonar frente a la infección

La principal función del pulmón es el intercambio gaseoso a través de la membrana alveolo-capilar y presenta una extensión aproximada de 100 m^2. De este modo, la vía respiratoria proximal y distal representan la superficie epitelial más extensa del todo el organismo en contacto con el medio ambiente (17). Esta característica facilita el intercambio gaseoso pero también contribuye a que las vías respiratorias sean particularmente susceptibles a la infección dado que toda esa superficie está continuamente expuesta a multitud microorganismos y partículas orgánicas e inorgánicas en suspensión que son arrastradas con el aire inhalado. El riesgo de infección respiratoria dependerá de la habilidad de los microorganismos para alcanzar la superficie epitelial respiratoria y de su capacidad para multiplicarse e invadir el tejido circundante. A pesar de la continua exposición a microorganismos, desde que estos agentes son depositados sobre la superficie del tracto respiratorio, un complejo sistema de mecanismos de defensa mantiene estéril el pulmón. Los principales componentes de defensa pulmonar estarían representados por los mecanismos de la vía aérea y su mucosa (mecanismos de defensa luminal, células epiteliales, células sanguíneas derivadas de la mucosa) y por los espacios alveolares (neumocitos tipo I y II, neutrófilos, macrófagos alveolares…) (17). Para permitir un adecuado intercambio gaseoso, los agentes extraños y los microorganismos deben ser detenidos en su progresión hacia la vía aérea distal y eliminados sin provocar una respuesta inflamatoria excesiva (17). La respuesta pulmonar a estos estímulos inflamatorios afecta a la supervivencia del huésped puesto que el pulmón debe mantener su integridad estructural para el intercambio gaseoso. La capacidad del pulmón de generar una respuesta inflamatoria aguda es necesaria para asegurar una adecuada eliminación de los agentes nocivos (18).

2.2.1-Inmunidad innata pulmonar y reclutamiento de neutrófilos

La inmunidad innata es el sistema de defensa más antiguo de los vertebrados superiores. Está formado por proteínas solubles que son capaces de unirse a productos microbianos, y por células fagocíticas que están circulando en el torrente sanguíneo y que migran a los tejidos lesionados, o residen en distintos órganos atentas a la presencia de agentes

extraños. Su función principal es la eliminación de los microorganismos del espacio alveolar. La inmunidad innata está siempre activa y proporciona una respuesta inmediata reconociendo e inactivando los productos microbianos que penetran en el pulmón (19). Un sistema fagocítico dual que engloba a macrófagos alveolares y leucocitos polimorfonucleares media en la eliminación de microorganismos.

Dependiendo de la carga de los agentes patógenos y de los mecanismos de la inmunidad innata implicados a nivel local, diversas cantidades de células inflamatorias, principalmente neutrófilos son reclutados rápidamente desde el torrente sanguíneo. Los leucocitos polimorfonucleares no forman parte de la población celular habitual del alveolo, pero constituyen la población más abundante de fagocitos circulantes que pueden ser reclutados desde el compartimento vascular mediante la acción quimiotáctica de diversas moléculas liberadas tanto por los macrófagos activados como por los microorganismos.

El reclutamiento de neutrófilos es un componente importante de la respuesta innata protectora del huésped frente las infecciones bacterianas (20). Se trata de un proceso complejo que depende de una serie de eventos concatenados:

-Activación de células endoteliales y la expresión de moléculas de adhesión de células derivadas de neutrófilos endoteliales;

-Adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales;

-Activación del neutrófilo y expresión de moléculas de adhesión derivadas del neutrófilo;

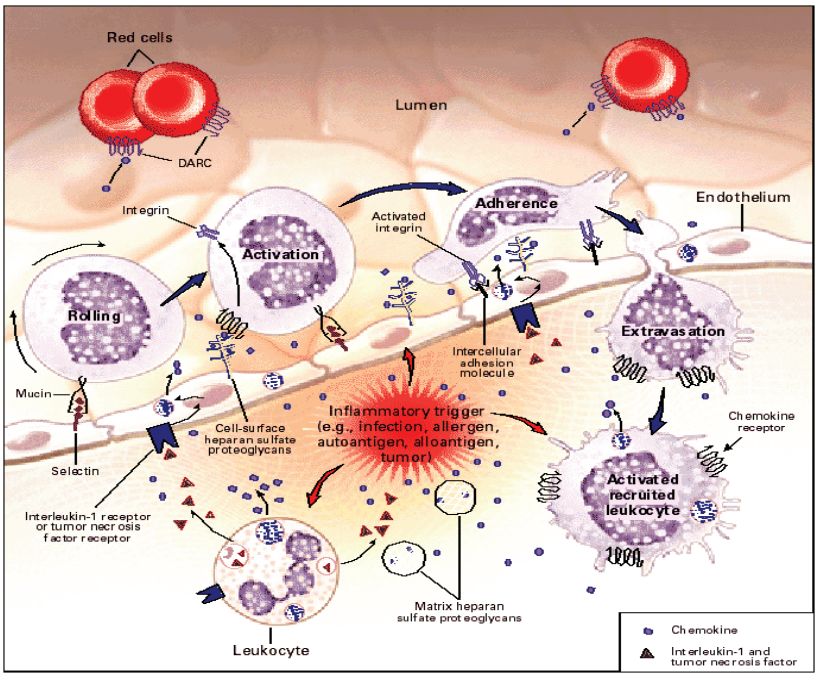
-Diapédesis del neutrófilo y migración de los neutrófilos a través de la barrera vascular (17).

La migración de los neutrófilos desde el torrente sanguíneo hacia el endotelio vascular se inicia con la expresión en su superficie de selectinas (L-selectina) que se une a las sialomucinas de las células endoteliales facilitando la migración de los neutrófilos. Por otro lado, una vez el microorganismo ha sido reconocido por el macrófago alveolar, éste inicia la producción de mediadores inflamatorios en el espacio alveolar (citocinas: TNF-α, interleucina-IL-1β, entre otras) que regulan la expresión de múltiples moléculas de adhesión en las células endoteliales y que provocan también la producción de

quimiocinas de origen pulmonar como la IL-8 siendo clave para la adhesión de los neutrófilos al endotelio y su posterior migración al tejido inflamado. Estas moléculas de adhesión se unen a los neutrófilos incrementando su adherencia al endotelio vascular. La interacción de selectinas y quimiocinas con sus respectivos ligandos desencadena vías de señalización transmembranales dentro de los neutrófilos que conduce a la expresión de integrinas-β2CD11/CD18 y a la liberación de L-selectina. La adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular se produce a través de la unión de las integrinas con ICAM-1 y 2, y dependerá además del estímulo inflamatorio. Una vez los neutrófilos se encuentran adheridos firmemente a las células endoteliales, se aplanan y se desplazan a través de las uniones intercelulares mediante el proceso de quimiotaxis. Esta migración directa hacia los alveolos afectados depende de la expresión de quimioatrayentes de neutrófilos (leucotrieno B_4 -LTB_4-, factor activador de plaquetas -PAF-, y principalmente quimiocinas e interleucinas-IL-8) que han sido liberados tanto por el huésped como por el microorganismo durante el proceso inflamatorio. Durante la migración de los neutrófilos y la unión a los quimioatrayentes se inducen múltiples vías de señalización intracelular que convergen en la activación de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) que da lugar a modificaciones en el citoesqueleto y la aparición de fibras de estrés que permiten que los neutrófilos migren hacia el estímulo quimitáctico (21,22).

Este proceso determina un secuestro temporal de polimorfonucleares en el pulmón de modo que su concentración en el lecho vascular pulmonar es hasta 100 veces mayor que en la circulación extrapulmonar. Los neutrófilos reclutados son también activados y serán capaces de responder de forma inmediata a los estímulos infecciosos dentro del espacio alveolar. Figura 1.

Figura 1: Migración del neutrófilo hacia el foco inflamatorio y unión a quimioatrayentes (tomada de Luster AD [23]).



La existencia de defectos en el reclutamiento de los neutrófilos se asociará a una mayor dificultad en la destrucción de los microorganismos y a un aumento de la mortalidad.

2.2.2-Papel de la apoptosis del neutrófilo en la resolución de la respuesta inflamatoria aguda y defensa del huésped

La presencia de microorganismos en el tracto respiratorio inferior inicia una respuesta inflamatoria aguda caracterizada por una rápida afluencia de polimorfonucleares neutrófilos hacia el parénquima pulmonar afectado. La regulación de la supervivencia del neutrófilo es fundamental en la propagación y resolución de la inflamación y está directamente implicada en la patogénesis de la inflamación prolongada o inapropiada en infecciones severas y en procesos autoinmunes (24).

Los componentes celulares del pulmón están continuamente renovándose a través de un proceso de vida y muerte celular. La muerte celular en los organismos vivos se presenta como necrosis o como apoptosis, ésta última también conocida como "muerte celular programada". Cada una de ellas posee características morfológicas y bioquímicas distintas. La necrosis celular hace referencia a un proceso de muerte no regulado que ocasiona la desintegración de la membrana celular y sus organelas. En contraste, la apoptosis es un proceso de muerte celular ordenado que está desencadenado por señales celulares controladas genéticamente. Se ha definido también como una forma de muerte celular no inflamatoria caracterizada por la pérdida de gránulos citoplasmáticos, redondeo del núcleo y condensación de la heterocromatina nuclear (25,26). En la tabla 1 se resumen las principales diferencias entre los procesos de apoptosis y necrosis.

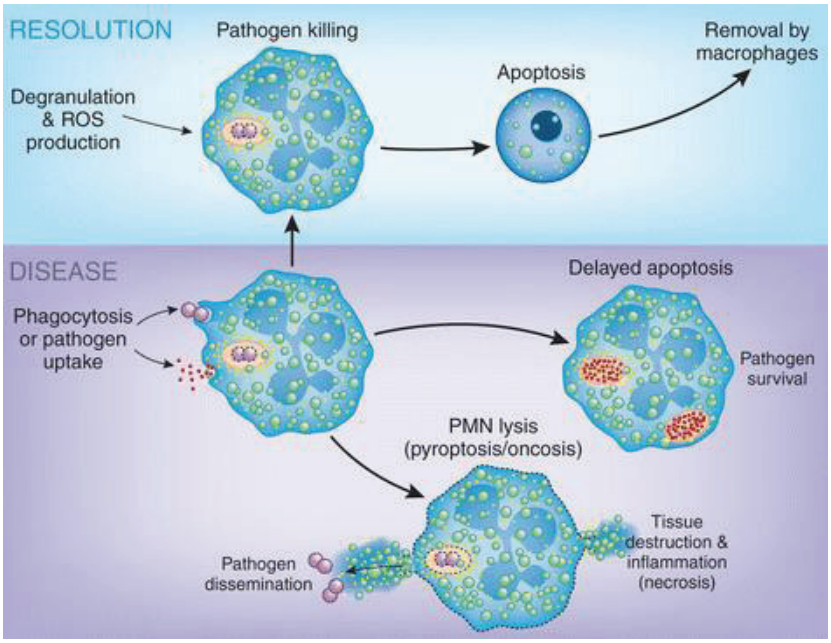
Tabla 1: Principales características diferenciales entre apoptosis y necrosis

APOPTOSIS	NECROSIS
Disminución del volumen celular	Edema celular
Fragmentación membrana celular	Rotura de la membrana celular
Formación de cuerpos apoptóticos	Liberación contenido citoplásmico al espacio extracelular
Condensación cromatina	Fragmentación núcleo y cromatina
Degradación del ADN ordenada	Degradación del ADN aleatoria
No reacción inflamatoria	Reacción inflamatoria
Requerimiento energético	No gasto energético

Los neutrófilos sufren apoptosis espontánea como un mecanismo para mantener la homeostasis del sistema inmune. Mientras que la supervivencia del neutrófilo es fundamental para la defensa frente a los microorganismos y evitar la propagación de la infección, la apoptosis es también clave para disminuir la función celular y la capacidad proinflamatoria cuando los neutrófilos ya no son necesarios. De esta forma, la respuesta

inflamatoria se limita y resuelve sin ocasionar daño tisular local o sistémico. Tras la apoptosis, los neutrófilos son fagocitados por macrófagos alveolares que proporcionan los medios para resolver la respuesta inflamatoria sin liberar moléculas citotóxicas que dañarían los tejidos del huésped. Si el proceso de fagocitosis por los macrófagos alveolares no es adecuado, bien por un exceso de neutrófilos apoptóticos o por una alteración en la producción de citocinas, los neutrófilos experimentan una necrosis secundaria que amplifica la inflamación y produce daño tisular (24,27,28). En la figura 2 se muestra las posibles vías en la interacción entre microorganismo y neutrófilo.

Figura 2: Interacción entre microorganismo y neutrófilo (tomada de Kennedy AD y col [25]).



2.3-Inflamación sistémica: papel de las citocinas en la defensa del huésped

Las citocinas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas solubles de bajo peso molecular que forman parte de una red compleja que regula la respuesta inmune e inflamatoria. La mayoría de células del sistema inmune y una amplia variedad de

células en el organismo son capaces de liberar citocinas y/o responder a ellas a través de receptores específicos. En la neumonía se produce una respuesta inflamatoria del huésped frente a los microorganismos a partir de la activación celular de macrófagos y neutrófilos principalmente con aumento de marcadores biológicos y producción sistémica de citocinas. Son muchos los factores implicados en la respuesta inmunitaria del pulmón desencadenada por el proceso infeccioso, sin embargo, las citocinas constituyen el grupo de mediadores más numeroso y con mayor expresión. Junto a otros factores solubles y moléculas de superficie, las citocinas, están implicadas en el reconocimiento de microorganismos, reclutamiento de leucocitos y eliminación de microorganismos. Las citocinas que han mostrado desempeñar un papel fundamental en la inmunidad innata del pulmón incluyen: factor de necrosis tumoral (TNF), interleucinas (IL) IL-10, IL-12, IL-6, y la quimiocina IL-8, interferón gamma (INF-γ), y factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) (29). La producción de citocinas es variable, y depende de factores como el microorganismo responsable de la infección, el tratamiento administrado, y principalmente del propio huésped (30). La interacción de estos factores puede producir diversas respuestas que influirán en la evolución clínica y en la resolución de la neumonía. La respuesta inflamatoria debe producirse en cantidad suficiente para superar la proliferación y diseminación del microrganismo.

Se ha relacionado la producción local y sistémica de citocinas proinflamatorias con la gravedad inicial de la neumonía, ya que, aunque estos mediadores tienen un efecto beneficioso en la respuesta del huésped, la producción excesiva puede ser perjudicial. En este sentido, en un estudio realizado por nuestro grupo, en NAC hospitalizada, Menéndez y colaboradores (31), detectaron que el aumento de citocinas (IL-6, IL-8) y biomarcadores (procalcitonina-PCT-, proteína C reactiva-PCR-) estaban relacionados con el fracaso terapéutico tanto precoz como tardío y peor pronóstico, y que además, una reducción en estos niveles se asociaba con una buena respuesta. Una producción excesiva de citocinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF-α, se relaciona con un efecto deletéreo sobre el huésped y mayor mortalidad (31,32,33). Al mismo tiempo, se produce una respuesta antiinflamatoria compensadora, mediada por el aumento de citocinas como la IL-10, existiendo un equilibrio dinámico y cambiante entre los componentes proinflamatorios y antiinflamatorios en la respuesta inmune. Si la

respuesta antiinflamatoria generada es excesiva puede causar un efecto perjudicial (34). *Kellum* y colaboradores (35) en un amplio estudio en pacientes hospitalizados con NAC demostraron que una elevación sistémica de los niveles de IL-6 e IL-10 se asociaba a un peor pronóstico en casos de neumonía y de sepsis. Del mismo modo, nuestro grupo en un trabajo de Martínez R y colaboradores (36) constataron que el exceso de citocinas (IL-6 e IL-10) se asociaba con mayor mortalidad, y que diferentes factores independientes como bacteriemia, confusión, derrame pleural e hipotensión, estaban relacionados con un exceso de ambas citocinas.

En los últimos años hemos conocido mejor la respuesta inflamatoria sistémica y pulmonar en infecciones severas y sepsis. Sin embargo, no disponemos de datos definitivos sobre qué factores causan una excesiva respuesta inflamatoria o sobre el papel de las citocinas en la neumonía de mala evolución. En un estudio publicado en pacientes hospitalizados por NAC, Menéndez y colaboradores confirmaron niveles elevados de biomarcadores (PCR y PCT) y citocinas (IL-6 e IL-8) en casos de muerte y que la elevación de PCR y de IL-6 mostraban un valor predictivo independiente para mortalidad a los 30 días tras ajustar por escalas pronósticas (37).

Así pues, sabemos que elevaciones persistentes de citocinas proinflamatorias a nivel sistémico y pulmonar, se asocian a un incremento de la mortalidad tanto en NAC grave como en la lesión pulmonar aguda, indicando que el grado de inflamación pulmonar es determinante en el curso clínico del proceso infeccioso (33,38). En el modelo animal, se ha visto que la sobreexpresión del factor nuclear κβ (NF- κβ) a nivel pulmonar empeoraría la respuesta inflamatoria local y el daño tisular en respuesta al proceso infeccioso (39, 40).

El mejor conocimiento de la respuesta inflamatoria local y sistémica en el huésped, el papel de la apoptosis del neutrófilo y su impacto en la evolución de la infección, podrían permitir modular dicha respuesta. Contribuir a ampliar el entendimiento sobre la expresión inflamatoria en el huésped en la NAC y en la NAC que no responde al tratamiento fue el sentido del primer artículo presentado.

2.4-Macrólidos e inmunomodulación

Los macrólidos son antibióticos comúnmente empleados para el tratamiento de infecciones de vía aérea superior, piel y tejidos blandos causados por microorganismos sensibles y en pacientes alérgicos a penicilina. Los más empleados son claritromicina, eritromicina y azitromicina.

Presentan en su estructura química un anillo lactónico macrocíclico al que se le unen uno o varios azúcares. En función del número de elementos contenidos en el anillo macrocíclico se clasifican en:

-Anillo de 14 átomos: entre ellos se encuentran eritromicina y claritromicina

-Anillo de 15 átomos: el más destacado es la azitromicina

-Anillo de 16 átomos: espiramicina, josamicina, midecamicina y rokitamicina.

El efecto antibacteriano de los macrólidos consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas mediante la unión a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, alteración de la síntesis de la biopelícula bacteriana, y la atenuación de otros factores de virulencia bacteriana. Las características farmacocinéticas de los macrólidos, como el volumen de distribución elevado y la acumulación intracelular, permiten alcanzar concentraciones tisulares elevadas, que en las vías respiratorias pueden ser de 50 a 100 veces superiores a las concentraciones detectadas de forma simultánea en plasma tras la administración de las dosis convencionales (40). Su espectro antibacteriano se centra en cocos grampositivos (excepto estafilococos resistentes a meticilina y *Enterococcus* spp.), y patógenos intracelulares (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella* spp., *Borrelia burgdorferi* y *Coxiella burnetii*). No tienen actividad frente a la mayoría de bacilos gramnegativos. En los últimos años se ha observado un aumento de la resistencia a estos antimicrobianos fundamentalmente para el neumococo. En un estudio realizado en España por Pérez-Trallero y colaboradores (42) se concluye que un 34,5% de las cepas de *S. Pneumoniae* son resistentes a eritromicina, claritromicina y azitromicina.

La terapia combinada con macrólidos para el tratamiento de la NAC con dos agentes antibacterianos es una estrategia terapéutica recomendada por las guías manejo clínico The Infectous Diseases Society of America and American Thoracic Society (IDSA/ATS)

(13) y British Thoracic Society (BTS) (43) y Sociedad Española de Neumología (SEPAR) (15) para asegurar la cobertura de micoorganismos atípicos. Diversos estudios observacionales, han mostrado que los regímenes de antibióticos que contienen macrólidos en el tratamiento de la NAC se ha asociado a disminución de la mortalidad y estancias hospitalarias más cortas cuando se compara con tratamiento antibiótico en monoterapia (44,45,46). Asadi y colaboradores (47), recientemente reportaron el resultado de un meta-análisis, combinando estudios observacionales y ensayos randomizados, del efecto del uso de los macrólidos sobre la mortalidad en la NAC. Se incluyeron 23 estudios y 137.574 pacientes y mostraron que los macrólidos se asociaban con una reducción del 22% de la mortalidad en pacientes hospitalizados por NAC.

Se ha observado que algunos antibióticos, entre ellos los macrólidos, poseen además de sus propiedades antimicrobianas, propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Estas propiedades han dotado a los macrólidos de nuevas posibilidades terapéuticas además de las clásicas como antimicrobianos, ofreciendo la posibilidad de usarlos en procesos crónicos no relacionados con agentes bacterianos. Existe amplia evidencia que el uso a largo plazo de macrólidos a dosis bajas se asocia con mejores resultados en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (FQ), bronquiectasias no FQ, asma y panbronquiolitis difusa (48,49,50), probablemente debido a los efectos antiinflamatorios más que a un mecanismo antimicrobiano puro. Sin embargo, los mecanismos de acción por los que los macrólidos presentan este doble efecto antimicrobiano y antiinflamatorio, no están definidos con exactitud.

En general, los macrólidos inhiben la síntesis y/o secreción de citocinas proinflamatorias mientras ejercen un efecto variable sobre la liberación de citocinas antiinflamatorias. Citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 o IL-8 y otros mediadores de inflamatorios como INF-γ o TNF-α, tienen claramente disminuida su expresión (51). Interfieren en la función de los neutrófilos disminuyendo los procesos de migración, quimiotaxis y activación celular ya que inhiben la formación de citocinas, LTB4 y otras moléculas necesarias para la adhesión de estas células (52). Estas alteraciones afectan a la supervivencia celular ya que se ha visto que macrólidos como la claritromicina, la

azitromicina y la roxitomicina inducen la apoptosis de neutrófilos y de linfocitos (30, 53,54,55).

Se sabe que los macrólidos de 14 y 15 átomos como la claritromicina y la azitromicina, inhiben el acoplamiento y retardan la formación de "biofilm" que producen determinadas bacterias, sobre todo *Pseudomonas aeruginosa,* en el epitelio respiratorio al disminuir la síntesis de alginato y hexosa alterando de este modo la estructura membranosa de la biopelícula (56,57). Además, los macrólidos tienen una importante actividad sobre la producción de moco al inhibir la expresión de los genes productores de mucina de las células bronquiales caliciformes (tabla 2).

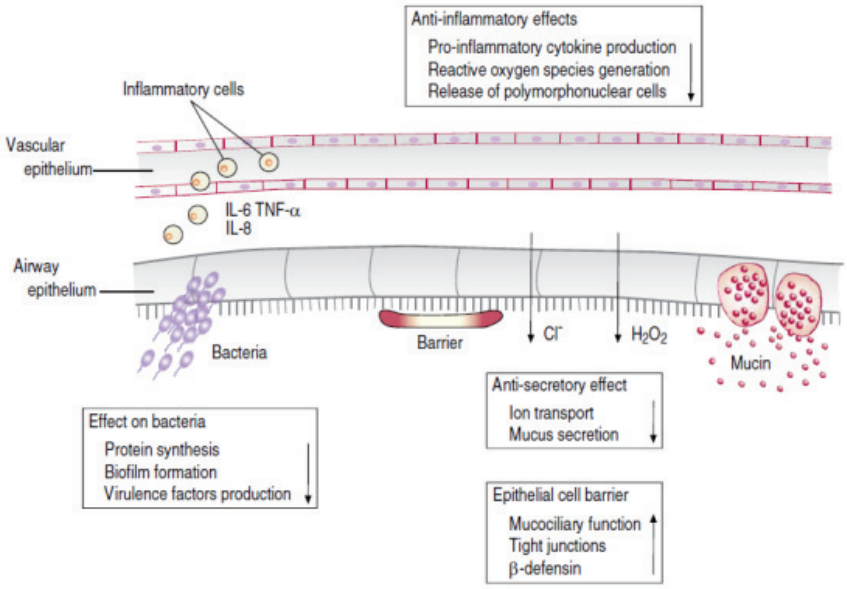
Tabla 2: Resumen de los mecanismos implicados en la actividad antiinflamatoria de los macrólidos.

Inhiben la secreción mucosa inducida por TNF-α
Reducen la producción de citocinas pro-inflamatorias Il-1β, IL-8 y neutrófilos en LBA
Disminuyen la producción de TNF-α e IL-6
Inducen la apoptosis de neutrófilos activados
Inhiben la activación de NFκB
Suprimen la expresión de TLR
Disminución de exotoxina mRNA inducida por TNF-α
Suprimen la expresión de endotelina-1

TNF: factor de necrosis tumoral; IL: interleucina; LAB: lavado broncoalveolar; NF: factor nuclear; TLR: receptor Toll-like.

El uso de macrólidos en la NAC puede tener efectos beneficiosos, independientemente de las propiedades antimicrobianas, proporcionando de esta manera soporte biológico para estudios observacionales que muestran que el uso de macrólidos se asocia con una menor mortalidad y morbilidad en la NAC. Los macrólidos tienen efectos inmunomoduladores en múltiples etapas de la cascada inflamatoria, que afecta a la secreción de citoquinas inflamatorias y células estructurales (figura 3).

Figura 3: Efectos efectos inmunomoduladores de los macrólidos en la neumonía adquirida en la comunidad (tomada de Meijvis SC y col [58]).



TNF: factor de necrosis tumoral; IL: interleucina

El beneficio del uso de macrólidos como agentes inmunomoduladores en el manejo de procesos inflamatorios respiratorios crónicos ha sido ampliamente documentado, sin embargo los efectos en situaciones de inflamación aguda como la neumonía sigue sin estar todavía aclarados.

Intentar ampliar el conocimiento sobre el efecto del uso de macrólidos en situaciones de infección aguda como la NAC y NAC que no responde al tratamiento fue el sentido del segundo trabajo presentado.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO 1

3-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO 1

I. Moret, MJ. Lorenzo, B. Sarriá, E. Cases, E. Morcillo, M. Perpiñá, JM. Molina, R. Menéndez. Increased lung neutrophil apoptosis and inflammation resolution in nonresponding pneumonia. ***Eur Respir J 2011; 38:1158-1164.***

En la neumonía adquirida en la comunidad (NAC), la respuesta inflamatoria del huésped frente al microorganismo es necesaria para la resolución del a infección. Sin embargo un exceso de respuesta inflamatoria puede tener efectos deletéreos.

En la NAC, los neutrófilos activados migran del torrente sanguíneo hacia el pulmón para la eliminación de los microorganismos y posterior apoptosis. Se ha evidenciado la existencia de una inflamación persistente a nivel pulmonar y sistémico en casos de NAC con falta de respuesta al tratamiento.

Nuestra hipótesis es que la persistencia de neutrófilos activados a nivel pulmonar en la NAC que no responde al tratamiento puede contribuir al mantenimiento de la inflamación y al retraso en la resolución del proceso infeccioso.

El objetivo principal del estudio fue evaluar la apoptosis del neutrófilo y el perfil de citocinas (interleucina (IL)-6, IL-8 e IL-10), a nivel local mediante lavado broncoalveolar (LBA) y en sangre periférica en pacientes hospitalizados que desarrollaron NAC no respondedora al tratamiento. Se analizó también su impacto sobre los parámetros clínicos de estabilidad y el tiempo de hospitalización.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO 2

4-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO 2

MJ. Lorenzo, I. Moret, B. Sarriá, E. Cases, J. Cortijo, R. Méndez, J. Molina, A. Gimeno, R. Menéndez. Lung inflammatory pattern and antibiotic treatment in pneumonia. ***Respiratory Research 2015; 16:15***

El efecto inmunomodulador de los macrólidos produce un efecto beneficioso sobre el huésped influyendo en la producción de citocinas inflamatorias. Diversos estudios observacionales han mostrado mejores resultados en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) severa en aquellos casos en los que el tratamiento antibiótico incluía macrólidos.

La hipótesis del presente estudio es que la influencia del antibiótico sobre la producción de citocinas puede tener un efecto beneficioso sobre la resolución de los parámetros de infección. Aunque la inflamación sistémica ha sido examinada previamente, la investigación sobre los patrones de citocinas a nivel pulmonar en la NAC con diferentes pautas de antibióticos es escasa.

Los objetivos de este estudio fueron analizar:

1.- El perfil de citocinas a nivel sistémico y pulmonar en pacientes hospitalizados por NAC tras 72 horas de tratamiento antibiótico (esquema terapéutico con y sin antibiótico macrólido).

2.- El impacto de los regímenes de tratamiento que incluían tratamiento antibiótico con macrólidos sobre los parámetros clínicos de resolución.

PUBLICACIONES ORIGINALES

5-PUBLICACIONES ORIGINALES

Lo resultados de los estudios que forman parte de esta Tesis Doctoral han sido reunidos en los siguientes trabajos:

1- Moret I, Lorenzo MJ, Sarria B, Cases E, Morcillo E, Perpiñá M, Molina JM, Menéndez R. Increased lung neutrophil apoptosis and inflammation resolution in nonresponding pneumonia. Eur Respir J. 2011 Nov;38(5):1158-64. doi: 10.1183/09031936.00190410.

2- Lorenzo MJ, Moret I, Sarria B, Cases E, Cortijo J, Méndez R, Molina J, Gimeno A, Menéndez R. Lung inflammatory pattern and antibiotic treatment in pneumonia. Respir Res. 2015 Feb 7;16:15. doi: 10.1186/s12931-015-0165-y.

ARTÍCULO 1

Eur Respir J 2011; 38: 1158–1164
DOI: 10.1183/09031936.00190410
Copyright©ERS 2011

Increased lung neutrophil apoptosis and inflammation resolution in nonresponding pneumonia

I. Moret*, M.J. Lorenzo[#,¶,+], B. Sarria*, E. Cases[#], E. Morcillo*, M. Perpiñá[#], J.M. Molina[§] and R. Menéndez[#,f]

ABSTRACT: Neutrophil activation state and its relationship with an inflammatory environment in community-acquired pneumonia (CAP) remain insufficiently elucidated. We aimed to evaluate the neutrophil apoptosis and cytokine pattern in CAP patients after 72 h of treatment, and their impact on infection resolution.

Apoptosis of blood and bronchoalveolar lavage (BAL) neutrophils was measured in nonresponding CAP (NCAP), in responding CAP (blood only) and in patients without infection (control). Pro-inflammatory (interleukin (IL)-6, IL-8) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines were measured. Main outcomes were clinical stability and days of hospitalisation.

Basal neutrophil apoptosis was higher in the BAL and blood of NCAP, whereas spontaneous apoptosis (after 24 h culture) was lower. Cytokines in NCAP were higher than in responding CAP and control: IL-6 was increased in BAL and blood, IL-8 in BAL and IL-10 in blood. An increased basal apoptosis ($\geqslant$20%) in BAL of NCAP was associated with lower systemic IL-10 ($p<0.01$), earlier clinical stability ($p=0.05$) and shorter hospital stay ($p=0.02$). A significant correlation was found for systemic IL-6 and IL-10 with days to reach stability and length of stay.

After 72 h of treatment, an increased basal alveolar neutrophil apoptosis might contribute to downregulation of inflammation and to faster clinical stability.

KEYWORDS: Bronchoalveolar lavage, cytokines, length of stay, neutrophil apoptosis, non-responding community-acquired pneumonia

AFFILIATIONS
*Pharmacology Dept, School of Medicine, University of Valencia,
[#]Pneumology Service,
[§]Microbiology Service, University and Politecnic Hospital La Fe,
[+]IIS La Fe-Fundación Bancaja,
[f]CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Valencia, and
[¶]Medicine–Doctoral Programme Dept, Barcelona Autonomous University, Barcelona, Spain.

CORRESPONDENCE
R. Menéndez
Pneumology Service
University and Politecnic Hospital La Fe
Bulevar Sur
46026 Valencia
Spain
E-mail: rmenend@separ.es

Received:
Dec 10 2010
Accepted after revision:
March 08 2011
First published online:
March 24 2011

Community-acquired pneumonia (CAP) has an incidence of five per 1,000 adults [1] and its mortality ranges between 5% and 15% of hospitalised patients. An adequate host response facilitates microbial killing while limiting excessive inflammation and tissue damage [2]. However, ~10% of CAP patients develop non-responding CAP (NCAP), which leads to delayed resolution and poor outcome [3].

In CAP, activated neutrophils in the blood migrate and accumulate in the lungs, ingest and kill bacteria and, finally, undergo apoptosis. Macrophages remove apoptotic neutrophils, precluding subsequent release of inflammatory cytokines and promoting resolution of inflammation [4, 5]. Although neutrophils are usually short-lived immune cells, their lifespan prolongation is critical in their efficacy. However, as neutrophils' lytic enzymes can also induce organ damage, their activation and survival must be tightly regulated [5–9].

In NCAP, a persistent lung and systemic inflammation has been reported [10–12]. However, the state of neutrophil activation remains to be elucidated. We hypothesised that the persistence of activated neutrophils in the lungs in NCAP might be contributing to the maintenance of inflammation and to a delayed resolution.

We aimed primarily to evaluate the neutrophil apoptosis and the cytokine pattern (interleukin (IL)-6, IL-8 and IL-10), both in the lung and in blood, in hospitalised patients with NCAP. Secondarily, we investigated their impact on the clinical parameters of stability and length of stay (LOS).

METHODS AND MATERIALS

Study design

A prospective study was performed in admitted patients with CAP. Pneumonia was defined as the presence of a new infiltrate with concordant symptoms and laboratory results (fever $\geqslant$38°C, purulent sputum and leukocyte count $\geqslant$12,000 mm^{-3}). Exclusion criteria were admission in the previous 15 days and immunosuppressive treatment.

European Respiratory Journal
Print ISSN 0903-1936
Online ISSN 1399-3003

The inclusion criteria in the NCAP group were: fulfilment of clinical conditions of NCAP after 72 h of treatment (see definition below) and performance of bronchoscopy indicated by the physician in charge. Patients were included in the study on the day when they underwent bronchoscopy.

Two control groups matched by age ($\pm$10 yrs) and comorbid conditions were included: 1) the CAP group comprised patients with CAP who reached clinical stability (definition below); 2) the control group comprised patients without infection referred to bronchoscopy for peripheral lung nodules or minor haemoptysis.

We collected data on age, sex, smoking habits, comorbidities, clinical signs and symptoms, Pneumonia Severity Index [13], chest radiograph, biochemical analyses, microbiological findings, and previous and current antibiotic treatment.

The study was approved by the ethics committee of the University and Politecnic Hospital La Fe (Valencia, Spain) and written informed consent was obtained. No bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was obtained in the CAP group because the ethics committee would not approve bronchoscopy in patients with adequate response.

Definitions

NCAP was defined as persistence of a high temperature ($\geqslant$38°C) and/or clinical symptoms after 72 h of antibiotic treatment, chest radiographic progression of pneumonia (>50% increase of infiltrates along with persistence of high temperature and/or clinical symptoms), empyema, septic shock and/or the need for mechanical ventilation [12].

The CAP group comprised patients who fulfilled clinical stability criteria [14, 15]. Stability was defined as the achievement of all the following parameters: temperature $\leqslant$37.2°C, heart rate $\leqslant$100 beats per min, respiratory rate $\leqslant$24 breaths per min, systolic blood pressure $\geqslant$90 mmHg, and oxygen saturation $\geqslant$90% or arterial oxygen tension $\geqslant$60 mmHg without supplemental oxygen.

LOS was calculated as the number of days from admission until discharge.

Obtaining and processing of BAL

BAL was performed according to recommended guidelines [16]. In the NCAP group, BAL was performed in the involved lobe, and in those patients with diffuse pulmonary infiltrates or in the control group, in the middle lobe or lingula. Five aliquots of sterile saline solution were instilled and immediately aspirated. The first aliquot (20 mL) was discarded. The remaining four aliquots (30 mL each) were pooled together in a single siliconised sterile glass: half of these four aliquots were sent to a microbiology laboratory and the other half to a biochemistry laboratory. The mean$\pm$SEM volume of BAL fluid obtained was 39$\pm$3 mL.

Neutrophil purification from BAL samples

The BAL samples were immediately pelleted by centrifugation at 353$\times g$ for 5 min at 4°C. The supernatant volume was measured and frozen. The pellet was resuspended with culture medium (RPMI 1640 without phenol red; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), passed through two sheets of gauze, and centrifuged at 353$\times g$ for 5 min at 4°C. The cell pellet was washed twice with PBS and resuspended with hypotonic solution (NH_4Cl 155 mM, $NaHCO_3$ 2.46 mM, EDTA·$4H_2O$ 3.72 mM; pH 7.4) for 5 min on ice. After centrifugation at 304$\times g$ for 5 min at 4°C, the pellet was resuspended in PBS. The neutrophil amount and viability were determined using a trypan blue exclusion method [17, 18]. For light microscopy studies, cytospin slides were stained by the Panoptic method (Panreac Quimica SA, Barcelona, Spain).

Preparation of blood samples

In NCAP, blood samples were obtained before bronchoscopy, and in the CAP group, after reaching stability. Plasma aliquots were withdrawn before neutrophil isolation for cytokine determination by ELISA. The isolation of neutrophils was performed as previously described [19]. The pellet was resuspended with a hypotonic solution for 5 min on ice, and spun down with PBS at 304$\times g$ for 5 min to pellet the neutrophils (similar to BAL samples). Cells were resuspended in PBS and counted.

Detection of apoptosis by flow cytometry

Neutrophils were stained with Annexin V detection kit (TACS™ Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC); R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) following the manufacturer's instructions. Samples were analysed using an EPICS XL (Beckman-Coulter, Hialea, FL, USA) [20]. Neutrophils were gated according to their forward and side scatter characteristics with a minimum of 10,000 gated events from each sample. Controls were included to set up compensation with no stained cells and cells stained with Annexin V or propidium iodide alone. Apoptotic cells were distinguished from normal and necrotic cells by labelling with Annexin V and exclusion of propidium iodide. Each subpopulation was expressed as a percentage of the total neutrophil population.

In addition, staining with CD16 FITC (IOTest; Beckman-Coulter) in separate aliquots of BAL and blood samples was applied to detect the positive neutrophil population.

For detection of apoptosis increments (spontaneous apoptosis) after 24 h of *in vitro* culture, neutrophils were seeded in RPMI supplemented with 10% FBS, L-glutamine and antibiotics (penicillin and gentaminicin; Invitrogen) and cultured at 37°C for 24 h.

Measurement of cytokines IL-6, IL-8 and IL-10 in BAL and plasma

The determination of IL-6, IL-8 and IL-10 was performed with a commercial enzymoimmunoassay technique (Pharmingen, BD Biociencias, Madrid, Spain) following the instructions of the manufacturer. The limits of detection were 4.7 $pg \cdot mL^{-1}$ for IL-6, 3.1 $pg \cdot mL^{-1}$ for IL-8, and 7.8 $pg \cdot mL^{-1}$ for IL-10.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS 12.0 and GraphPad software (San Diego, CA, USA). The Chi-squared test was used for categorical variables, and the Mann–Whitney U-test for continuous variables. Correlation was analysed using Spearman's rho correlation analysis. Data are shown as mean$\pm$SEM unless otherwise indicated. Cytokine levels and LOS are shown as medians and interquartile ranges (IQRs). A value of $p<0.05$ was considered statistically significant. The end-point variables were analysed with regard to the basal

neutrophil apoptosis in BAL stratified as high (⩾20%, 75th percentile of basal apoptosis) or low (<20%) apoptosis rates.

RESULTS

General characteristics of groups

60 patients (29 NCAP, 15 CAP and 16 controls without infection) were recruited. Six NCAP patients were excluded due to an alternative diagnosis: one patient with tuberculosis, three with lung cancer, one with bronchiolitis obliterans and organising pneumonia, and one with invasive pulmonary aspergillosis, leaving 23 in the study group. Features of NCAP were: 11 patients with persistent fever and clinical worsening, nine with progression of infiltrates in chest radiograph (two with pleural effusion), and three with respiratory insufficiency requiring invasive ventilation; one of these patients died. The control group without infection included 16 adults, seven with minor haemoptysis and nine with peripheral lung nodules, whose diagnosis ruled out infection and whose comorbidities, sex and age were similar to those in the NCAP group and CAP group (table 1).

The median (IQR) interval since admission to the day in which samples were taken in the NCAP group was 6 (4–8) days, and was 5 (4–5) days in the CAP group.

Aetiological diagnosis in the NCAP group was established in 14 (60.9%) cases: seven *Streptococcus pneumoniae*, one *Escherichia coli*, two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), one *Pseudomonas aeruginosa* and five mixed aetiology (three *S. pneumoniae* and other micro-organisms, two MRSA and other). In BAL fluid, the following micro-organisms were isolated: one *S. pneumoniae*, two *Streptococcus* spp., one *Enterococcus* spp., one *P. aeruginosa*, two MRSA, one *Acinetobacter baumannii*, 10 potentially nonpathogenic micro-organisms, and none in three cases. Aetiology in the CAP group was: four *S. pneumoniae* (27%), one *P. aeruginosa* (7%) and unidentified in 10 cases.

TABLE 1 Characteristics of nonresponding community-acquired pneumonia (NCAP) and control groups

	NCAP	CAP	Control	p-value#
Subjects n	23	15	16	
Age yrs	61±3	66±4	60±2	NS
Male/female n	16/7	12/3	14/2	NS
Smoker/nonsmoker n	6/17	13/2	9/7	NS
Comorbidities				
Heart disease	6 (26)	3 (20)	2 (12)	NS
COPD	7 (30)	7 (46)	5 (31)	NS
Chronic renal disease	2 (9)	0	1 (6)	NS
Cerebrovascular disease	3 (13)	3 (20)	1 (6)	NS
PSI score	90±6	102±7	0	
Blood leukocyte count mm^{-3}	12752±1268	9877±1065	8217±730	0.02
PMN %	82±11	76±3	62±4	0.001
BAL fluid				
Total cell count mm^{-3}	7.5±2.2		0.5±0.2	0.01
PMN %	38±4.5		8±3	<0.001

Results are expressed as mean±SEM or n (%), unless otherwise stated. CAP: community-acquired pneumonia; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; PSI: Pneumonia Severity Index (FINE score); PMN: polymorphonuclear neutrophils; BAL: bronchoalveolar lavage; NS: nonsignificant. #: Mann–Whitney U-test and Chi-squared test for continuous and categorical variables, respectively.

Apoptosis and cytokine results in BAL and blood

Leukocyte counts in blood (table 1) and BAL fluid were significantly higher in the NCAP group. Apoptosis values from flow cytometry (fig. 1a–c) were compared with data obtained by judging the nuclear morphology by light microscopy (fig. 1d) and similar results were obtained.

The basal apoptosis in BAL (fig. 2) was higher (13±3%) in NCAP compared with controls (6±3%), although significance was not reached; no data were available for CAP (as described in Methods and materials section). A similar pattern in blood was observed in NCAP compared with control and CAP (15±4%, 4±1% and 6±2%, respectively) (fig. 2c). No significant correlation was found between apoptotic neutrophils in BAL and in blood in the NCAP group. Spontaneous apoptosis after 24 h of culture was studied in a subset of patients (n=5) to observe neutrophil apoptosis *in vitro* (fig. 2b and d). Spontaneous apoptosis was lower in blood in NCAP (compared with control and CAP; $p<0.05$). The same pattern appeared in BAL (compared with control, no data for CAP) although significance was not reached.

The median levels of systemic cytokines are depicted in figure 3. IL-6 was significantly higher in BAL of the NCAP patients (compared with controls), and in blood (compared with controls and a trend compared with CAP). IL-8 was higher in BAL in NCAP (compared with control), although no differences were found in blood (compared with controls and CAP). Conversely, IL-10 showed significantly higher levels in blood (compared with controls and CAP), without differences in BAL (compared with controls).

In the NCAP group, cytokine levels in BAL compared with blood showed significantly higher median (IQR) IL-8 BAL levels, 4,358 (868–12,117) *versus* 38 (24–78) pg·mL^{-1}, and significantly higher IL-10 in blood, 22 (9–60) *versus* 3 (2–9) pg·mL^{-1}, whereas no differences were found concerning IL-6.

In the NCAP group, a statistically significant positive correlation was found between IL-6 in blood and BAL fluid ($r=0.7$, $p=0.01$). IL-6 levels in BAL were also found to be significantly correlated to IL-10 levels in blood ($r=0.7$, $p=0.02$). A significant correlation of the percentage and absolute count of neutrophils in BAL was found with IL-8 in BAL ($r=0.6$, $p=0.01$ and $r=0.7$, $p<0.01$, respectively).

Clinical resolution and outcome

One of the NCAP patients died. The median (IQR) number of days to reach clinical stability was 12 (7–18) days, and the median LOS was 20 (12–34) days. Basal high neutrophil apoptosis in BAL (⩾20%) showed a significant negative correlation with LOS ($r= -0.5$, $p=0.02$) and with days needed to reach clinical stability ($r= -0.4$, $p=0.05$). Patients with high apoptosis in BAL had shorter LOS (median 10 *versus* 21 days) and needed fewer days for stability (median 7 *versus* 13 days). Neutrophil apoptosis in blood did not correlate either with clinical stability or with LOS ($r= -0.2$, $p=0.4$ and $r= -0.1$, $p=0.7$, respectively).

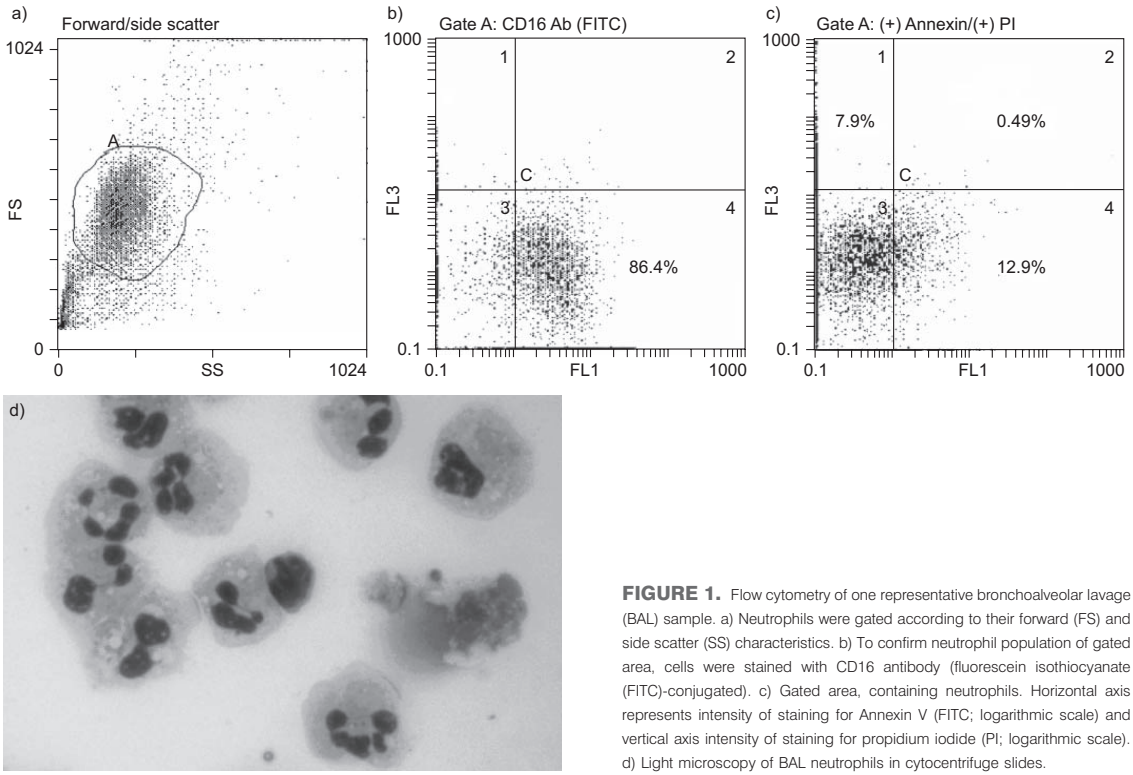


FIGURE 1. Flow cytometry of one representative bronchoalveolar lavage (BAL) sample. a) Neutrophils were gated according to their forward (FS) and side scatter (SS) characteristics. b) To confirm neutrophil population of gated area, cells were stained with CD16 antibody (fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated). c) Gated area, containing neutrophils. Horizontal axis represents intensity of staining for Annexin V (FITC; logarithmic scale) and vertical axis intensity of staining for propidium iodide (PI; logarithmic scale). d) Light microscopy of BAL neutrophils in cytocentrifuge slides.

Cytokine levels in NCAP stratified according to high ($\geqslant$20%) or low (<20%) basal BAL neutrophil apoptosis are depicted in figure 4. Systemic IL-10 was significantly lower in those with high apoptosis. A trend to lower IL-6 and IL-8 was found in those with high apoptosis both in BAL and blood. IL-6 and IL-10 levels in blood showed a positive significant correlation with the number of days to reach clinical stability ($r=0.7$, $p<0.01$ and $r=0.7$, $p<0.01$, respectively), and IL-10 with LOS ($r=0.7$, $p=0.02$). In the CAP group, a significant positive correlation was found for blood IL-6 and IL-10 with number of days to reach clinical stability ($r=0.4$, $p=0.02$ and $r=0.7$, $p<0.001$, respectively), and with LOS ($r=0.4$, $p=0.03$ and $r=0.7$, $p<0.001$, respectively).

DISCUSSION

The most important findings of this study are: 1) systemic basal neutrophil apoptosis was significantly higher in the NCAP group than in responding CAP and controls, while spontaneous apoptosis at 24 h was lower; 2) the inflammatory cytokine pattern showed higher pro-inflammatory IL-6 and IL-8 in BAL, and higher IL-6 along with higher IL-10 in blood; 3) patients with NCAP who had increased basal apoptosis in BAL ($\geqslant$20%) reached clinical stability earlier and their LOS was shorter; and 4) low basal alveolar apoptosis was associated with higher IL-10 in blood and a trend for higher IL-8 and IL-6 in BAL and blood.

The apoptosis of neutrophils after killing micro-organisms is considered essential for the downregulation of inflammation while precluding the release of their cytotoxic components. The relevance of high initial and persistent inflammation in CAP has been thoroughly studied. Initial raised inflammatory cytokines in NCAP, and at 72 h, have been associated with slower clinical stability and poorer outcome [12, 21–23]. As expected, our findings showed an increase in cytokine levels and alveolar neutrophils, which reflects an ongoing inflammation along with certain degree of apoptosis. In fact, we found higher basal neutrophil apoptosis in BAL (12%) than Droemann *et al.* [24] (1%), probably because they included patients at an earlier stage. Interestingly, we also found a slightly higher neutrophil apoptosis in blood, reflecting the functional continuum of the infection.

Although absolute basal apoptosis was increased, neutrophil survival was also prolonged; that is, their functional longevity was enhanced. Spontaneous apoptosis at 24 h was higher in controls than in NCAP, as reported elsewhere [4]. This finding illustrates neutrophil fate during infection, especially because BAL neutrophils were not completely purified from the rest of the BAL cells, and cytokines released by co-cultured cells would reflect the *in vivo* inflammation process. Interestingly, in patients with clinical stability, both basal and spontaneous apoptosis mimics the pattern of controls without infection. The lower systemic basal apoptosis in CAP represents a phase in

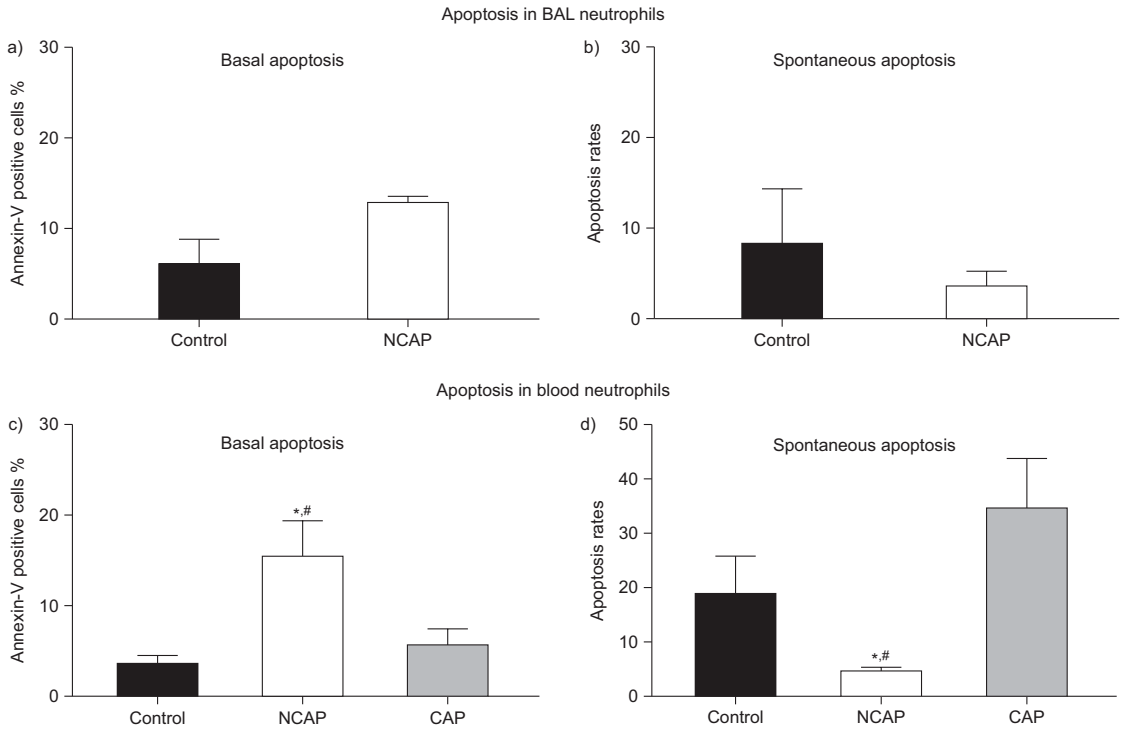


FIGURE 2. Apoptosis of neutrophils in bronchoalveolar lavage (BAL) of nonresponding community-acquired pneumonia (NCAP) and control (a and b) and peripheral blood of NCAP, control and community-acquired pneumonia (CAP) patients (c and d). Apoptosis was determined after neutrophil purification (basal apoptosis, a and c) and after *in vitro* culture for 24 h (spontaneous apoptosis, b and d). Apoptosis rate is defined as percentage of cells in apoptosis at 24 h compared with that at 0 h. Data are presented as mean±SEM. *: $p<0.05$, NCAP *versus* control; #: $p<0.05$, NCAP *versus* CAP.

which leukocytes are declining, as it corresponds to a resolving infection with decreasing cytokines (IL-6 and IL-10). These results indicate that a different neutrophil apoptosis kinetic is a feature of NCAP patients.

Activation of neutrophils is necessary to clear infection, as well as their apoptosis to adequately resolve inflammation [25]. During the initial phases of infection, cytokines may enhance neutrophil activation, particularly IL-8 prime neutrophils, and prolong their lifespan [26]. We have confirmed the higher pro-inflammatory cytokine levels of IL-6 and IL-8 in BAL fluid after 72 h of treatment, as expected in NCAP patients. Interestingly, the predominant inflammatory cytokines in the pulmonary and systemic compartments revealed different patterns: higher IL-8 in BAL, higher IL-10 in blood and similar IL-6 levels in both compartments. SCHÜTTE *et al.* [27] have also reported similar findings with IL-8 and IL-6 in patients with severe pneumonia. The higher IL-8 levels in BAL compared with blood highlight the active phase of infection and the upregulation of neutrophils. In fact, a positive correlation between IL-8 and the absolute count of neutrophils in BAL was confirmed. Concerning IL-6, we found a positive correlation between levels in BAL and in blood, which indicates that an inflammatory process originating in the lung is continued in the systemic compartment. Conversely, IL-10 levels in blood indicate a predominant anti-inflammatory pattern. In fact, significantly lower systemic IL-10 and a trend for lower IL-6 was found in patients with clinical stability. Taking all these results together, a different speed of inflammatory resolution is suggested: slower in the lung than systemically. Moreover, we found a correlation between systemic inflammatory resolution and clinical resolution, *i.e.* among systemic IL-6 and IL-10 and stability and LOS.

The interaction between alveolar neutrophils, cytokines and adequate restoration of homeostasis is far from completely understood. Our results indicate that, when alveolar apoptosis was low in BAL, systemic IL-10 and IL-8 in BAL fluid were raised. This association may have several explanations. First, a reduced apoptosis may reflect an ongoing inflammation with the potential for prolonging the tissue damage. Secondly, bacterial load, or the pathogens themselves, might alter apoptosis thus evading their efficient killing [26]. Thirdly, an exuberant cytokine environment might delay apoptosis, as reported in acute lung injury, where it is associated with a dysregulation of apoptosis [28]. In sepsis, a delayed apoptosis due to prolonged activation of nuclear factor-κB causes neutrophils to remain active [29, 30]. Enhancement of neutrophil apoptosis, however, has

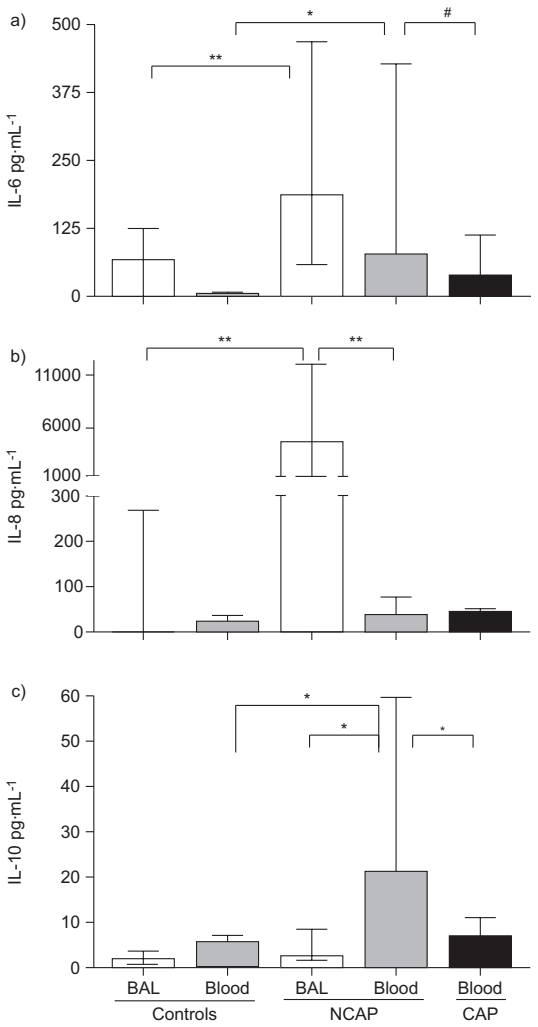


FIGURE 3. Cytokine levels from nonresponding community-acquired pneumonia (NCAP), community-acquired pneumonia (CAP) and control groups in bronchoalveolar lavage (BAL) and peripheral blood. Data are presented as median and interquartile range. *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; #: $p=0.06$.

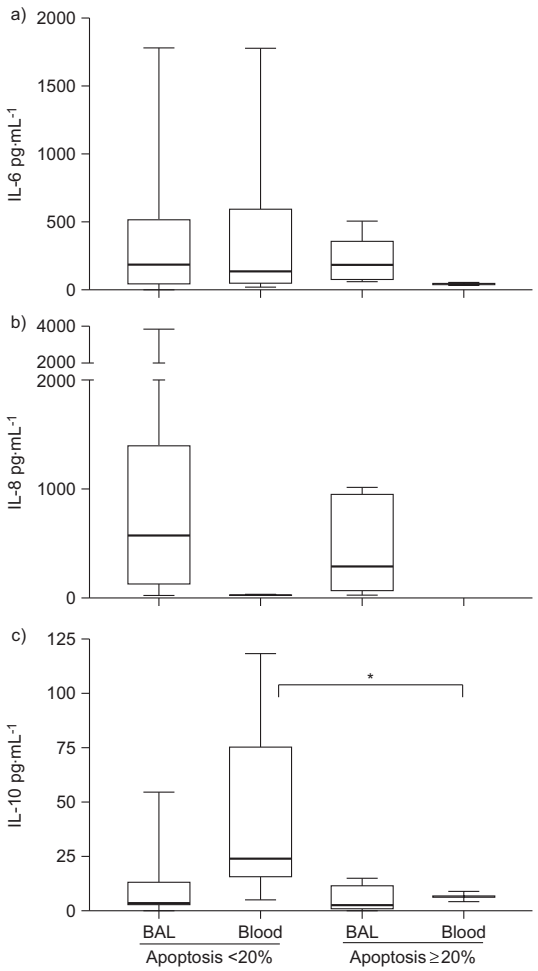


FIGURE 4. Cytokine levels in bronchoalveolar lavage (BAL) and blood of nonresponding community-acquired pneumonia patients classified as low (<20%) or high (≥20%) BAL apoptosis. Data are presented as median and interquartile range. *: $p<0.05$.

been associated with less lung damage and mortality [31]. In an animal model, localised apoptosis was found to be a feature in the resolution of pneumonia [32].

Clinical relevance of alveolar apoptosis was proved when analysing resolution of infectious parameters. We found that a higher alveolar apoptosis was significantly associated with faster clinical stability and shorter LOS. A similar significant correlation was found between systemic levels, both in NCAP and responding CAP, of cytokines, clinical stability and LOS.

To our knowledge, this is the first study to investigate the role of neutrophil apoptosis, both in the lung and systemically, in NCAP. With regard to potential limitations, we have to point out a possible beta error in statistical analyses due to the limited number of cases included and the lack of BAL in the responding CAP group.

In summary, basal apoptosis in NCAP is high both in lung and in blood while spontaneous apoptosis at 24 h is lower than in responding CAP. High IL-8 levels in BAL fluid were associated with accumulation of neutrophils in the lung. Systemic inflammation with raised IL-6 and IL-10 is associated with a delayed clinical stability and LOS. In NCAP, a greater basal alveolar neutrophil apoptosis was associated with earlier clinical stability and lower LOS, which suggests that neutrophil apoptosis precludes persistent local inflammation, thereby contributing to a faster recovery of normal homeostasis.

SUPPORT STATEMENT

This work was supported by the CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), an initiative from the Carlos III Health Institute, Grant from Bancaja-Fundación para la Investigación Hospital La Fe, Conselleria de Sanidad de la Comunidad Valenciana (AP-018/06) and SAF2009-08913.

STATEMENT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

1 Guidelines for the diagnosis and treatment of community-acquired pneumonia. Spanish Society of Pulmonary and Thoracic Surgery (SEPAR). *Arch Bronconeumol* 2005; 41: 272–289.
2 Mitzgerd JP, Lupa MM, Kogan MS, *et al.* Nuclear factor-κB p50 limits inflammation and prevents lung injury during *Escherichia coli* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 810–817.
3 Menéndez R, Perpiñá M, Torres A, *et al.* Evaluation of non-resolving and progressive pneumonia. *Semin Respir Infect* 2003; 18: 103–111.
4 Pletz MW, Ioanas M, de Roux A, *et al.* Reduced spontaneous apoptosis in peripheral blood neutrophils during exarcerbation of COPD. *Eur Respir J* 2004; 23: 532–537.
5 Behnia M, Robertson KA, Martin WJ 2nd, *et al.* Lung infections: role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Chest* 2000; 117: 1771–1777.
6 François S, El Benna J, Dang PM, *et al.* Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-κB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol* 2005; 174: 3633–3642.
7 Cowburn AS, Condliffe AM, Farahi N, *et al.* Advances in neutrophil biology: clinical implications. *Chest* 2008; 134: 606–612.
8 Watt AP, Brown V, Courtney J, *et al.* Neutrophil apoptosis, proinflammatory mediators and cell counts in bronchiectasis. *Thorax* 2004; 59: 231–236.
9 Knapp S, Leemans JC, Florquin S, *et al.* Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 171–179.
10 Montón C, Torres A, El-Ebiary M, *et al.* Cytokine expression in severe pneumonia: a bronchoalveolar lavage study. *Crit Care Med* 1999; 27: 1745–1753.
11 Ioanas M, Ferrer M, Cavalcanti M, *et al.* Causes and predictors of nonresponse to treatment of intensive care unit-acquired pneumonia. *Crit Care Med* 2004; 32: 938–945.
12 Menéndez R, Cavalcanti M, Reyes S, *et al.* Markers of treatment failure in hospitalised community acquired pneumonia. *Thorax* 2008; 63: 447–452.
13 Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, *et al.* A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 1997; 336: 243–250.
14 Halm EA, Fine MJ, Marrie TJ, *et al.* Time to clinical stability in patients hospitalized with community-acquired pneumonia: implications for practice guidelines. *JAMA* 1998; 279: 1452–1457.
15 Menéndez R, Torres A, Rodríguez de Castro F, *et al.* Neumofail Group. Reaching stability in community-acquired pneumonia: the effects of the severity of disease, treatment, and the characteristics of patients. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1783–1790.
16 Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage. Report of the European Society of Pneumology Task Group. *Eur Respir J* 1989; 2: 561–585.
17 Ishii H, Mukae H, Kadota J, *et al.* Increased levels of interleukin-18 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic nonspecific interstitial pneumonia. *Respiration* 2005; 72: 39–45.
18 Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, *et al.* Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 2003; 81: 289–296.
19 Ottonello L, Dapino P, Amelotti M, *et al.* Activation of neutrophil respiratory burst by cytokines and chemoattractants. Regulatory role of extracellular matrix glycoproteins. *Inflamm Res* 1998; 47: 345–350.
20 Schmidt-Ioanas M, Pletz MW, de Roux A, *et al.* Apoptosis of peripheral blood neutrophils in COPD exacerbation does not correlate with serum cytokines. *Respir Med* 2006; 100: 639–647.
21 Kellum JA, Kong L, Fink MP, *et al.* GenIMS Investigators. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1655–1663.
22 Chalmers JD, Singanayagam A, Hill AT, *et al.* C-reactive protein is an independent predictor of severity in community-acquired pneumonia. *Am J Med* 2008; 121: 219–225.
23 Menéndez R, Martínez R, Reyes S, *et al.* Stability in community-acquired pneumonia. One step forward with markers? *Thorax* 2009; 64: 987–992.
24 Droemann D, Aries SP, Hansen F, *et al.* Decreased apoptosis and increased activation of alveolar neutrophils in bacterial pneumonia. *Chest* 2000; 117: 1679–1684.
25 Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, *et al.* Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 325–337.
26 DeLeo FR. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis* 2004; 9: 399–413.
27 Schütte H, Lohmeyer J, Rosseau S, *et al.* Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. *Eur Respir J* 1996; 9: 1858–1867.
28 Chopra M, Reuben JS, Sharma AC. Acute lung injury: apoptosis and signalling mechanisms. *Exp Biol Med* 2009; 234: 361–371.
29 Taneja R, Parodo J, Jia SH, *et al.* Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. *Crit Care Med* 2004; 32: 1460–1469.
30 Sayeed MM. Delay of neutrophil apoptosis can exacerbate inflammation in sepsis patients: cellular mechanisms. *Crit Care Med* 2004; 32: 1604–1606.
31 Sookhai S, Wang JJ, McCourt M, *et al.* A novel therapeutic strategy for attenuating neutrophil-mediated lung injury *in vivo*. *Ann Surg* 2002; 235: 285–291.
32 Kazzaz JA, Horowitz S, Xu J, *et al.* Differential patterns of apoptosis in resolving and nonresolving bacterial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 2043–2050.

ARTÍCULO 2

Lorenzo *et al. Respiratory Research* (2015) 16:15
DOI 10.1186/s12931-015-0165-y

RESPIRATORY RESEARCH

RESEARCH Open Access

Lung inflammatory pattern and antibiotic treatment in pneumonia

María-José Lorenzo[1,4,5], Inés Moret[2], Benjamín Sarria[3], Enrique Cases[1], Julio Cortijo[3,7], Raúl Méndez[1], Jose Molina[6], Alejandra Gimeno[1] and Rosario Menéndez[1,7,8*]

Abstract

Background: In community-acquired pneumonia host inflammatory response against the causative microorganism is necessary for infection resolution. However an excessive response can have deleterious effects. In addition to antimicrobial effects, macrolide antibiotics are known to possess immunomodulatory properties.
We aimed to evaluate inflammatory cytokine profiles – both locally (bronchoalveolar lavage) and systemically (blood) – in community-acquired pneumonia admitted patients after at least 72 hours of antibiotic treatment (with and without macrolide containing regimens) and requiring bronchoscopic examination for inadequate response due to infection progression and/or lack of clinical stability.

Methods: A prospective study was performed on 52 admitted patients who developed an inadequate response after 72 hours of antibiotic treatment - non-responders community-acquired pneumonia - (blood and bronchoalveolar lavage), and two control groups: 1) community-acquired pneumonia control (blood) and 2) non-infection control (blood and bronchoalveolar lavage). Cytokine profiles (interleukin (IL)-6, IL-8, IL-10), tumour necrosis factor α and clinical outcomes were assessed.

Results: Non–responders patients treated with macrolide containing regimens showed significantly lower levels of IL-6 and TNF-α in bronchoalveolar lavage fluid and lower IL-8 and IL-10 in blood than those patients treated with non-macrolide regimens. Clinical outcomes showed that patients treated with macrolide regimens required fewer days to reach clinical stability ($p < 0.01$) and shorter hospitalization periods ($p < 0.01$).

Conclusions: After 72 hours of antibiotic effect, patients who received macrolide containing regimens exhibited lower inflammatory cytokine levels in pulmonary and systemic compartments along with faster stabilization of infectious parameters.

Keywords: Community acquired pneumonia, Macrolides, Lung inflammation

Introduction

The majority of hospitalized community-acquired pneumonia (CAP) patients respond favorably to antibiotic treatment but around 10% develop an inadequate response to treatment that leads to a poorer prognosis [1]. Cytokines are important mediators that orchestrate the inflammatory response and hence play an important role in host defense against microorganisms. However, excessive and persistent cytokine production [2] has been associated with a higher number of days needed to reach clinical stability, treatment failure and increased mortality [3,4]. After antibiotic treatment, when the response is adequate, inflammation decreases with a return to homeostasis.

The immunomodulatory effects of macrolides benefit the host due to their capacity to temper the production of inflammatory cytokines [5-7]. Some recent observational studies have reported better outcomes in severe CAP cases [8-12], when antibiotics regimens contained macrolides. Others studies, though, have not reported such improvement [13,14]. We hypothesized that antibiotic influence on cytokine production might have a beneficiary effect upon the resolution of infectious parameters. Although systemic inflammation has been examined

* Correspondence: rosmenend@gmail.com
[1]Pneumology Department, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain
[7]CIBER de Enfermedades Respiratorias (CibeRes), Valencia, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2015 Lorenzo et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

previously, research into lung cytokine patterns in CAP with different antibiotics regimens is scarce.

The aims of the present study were to investigate 1) lung and systemic inflammatory cytokine profiles in hospitalized CAP patients after at least 72 hours of antibiotic treatment (with and without macrolide containing regimens) and who required bronchoscopic examination owing to an inadequate response consequent upon infection progression and/or lack of clinical stability; and 2) the impact of macrolide containing regimens treatment on clinical resolution parameters.

Methods

Study design

A prospective longitudinal study was conducted of admitted CAP patients requiring bronchoscopic examination due to an inadequate response to antibiotic treatment after at least 72 hours of antibiotic treatment: non-responders CAP (NCAP). The inclusion criteria for the NCAP study group were: 1) clinical deterioration with acute respiratory failure requiring ventilator support and/or septic shock; and/or 2) persistence of a high temperature (≥38°C) and/or clinical symptoms, and/or chest-X ray progression (>50% increase of infiltrates with clinical symptoms) or empyema [3]. Patient enrolment in the study was performed on the day of their bronchoscopic examination when samples of bronchoalveolar (BAL) fluid and blood were obtained.

Two control groups were included: 1) CAP control group (CAP), comprised of patients of a similar age and co-morbid condition who reached clinical stability after 72 hours of antibiotic treatment (temperature <37.2°C, heart rate <100 beats/min, respiratory rate <24 breaths/min, systolic blood pressure >90 mm Hg, and oxygen saturation >90% or arterial oxygen tension >60 mm Hg when patient was not receiving supplemental oxygen) [15,16]; and 2) Non-infection control group, comprised of patients without any infection for whom a bronchoscopy had been scheduled due to peripheral lung nodules or minor haemoptysis.

Exclusion criteria were: prior admission to hospital (1 month), immunosuppressive treatment, HIV infection, or alternative diagnosis.

The study was approved by the Ethical Committee of our hospital (approval number 2005/0141) and patients signed the required informed consent form.

Data collection

The following data were collected: demographics, comorbid conditions, laboratory data, chest radiograph, initial pneumonia severity [17], microbiological tests (sputum culture, urinary antigens of *Legionella pneumophila* and *Streptococcus pneumoniae*, blood cultures and serology for *Chlamydophila pneumoniae, Mycoplasma pneumonia, Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila)*, and length of hospital stay (LOS) which was calculated as the number of days from admission until discharge.

Antimicrobial therapy received by patients was recorded and classified as follows: beta-lactams (ceftriaxone/cefotaxime: 1–2 g/12-24 h, 1–2 g/8 h or co-amoxiclavulanate: 1–2 g/8 h) + macrolides (azithromycin: 500 mg/24 h); fluoroquinolone (levofloxacin: 500 mg/12-24 h) in monotherapy, both as recommended by Spanish guidelines [18], and beta-lactams + fluoroquinolone. Patients who received any other combination of antibiotics were classified as "other regimens".

Biological samples collection

In both the NCAP and non-infection control group, BAL fluid and blood samples were obtained on the day of bronchoscopic examination. In the CAP control group, blood samples were obtained at clinical stability, after at least 72 hours of antibiotic treatment, and no BAL fluid was obtained.

Bronchoalveolar lavage

BAL was collected according to recommended guidelines [19] by flexible videobronchoscope in the affected lobe in NCAP patients and in the middle lobe in non-infection controls. Five aliquots of sterile saline solution were instilled and immediately aspirated. The first aliquot (20 mL) was discarded. The remaining four aliquots (30 mL each) were pooled together in a single sterile glass: 50% of the retrieved fluid was sent to the microbiology laboratory and the other 50% to the biochemistry laboratory for cytokine measurement. The mean ± SEM BAL fluid obtained for processing was 56 ± 2 ml. To eliminate remaining mucus, the samples were filtered through two sheets of gauze. BAL fluid sample was centrifuged at 353 × g for 5 min at 4°C. The supernatant volume was measured and frozen at −80°C until further analysis.

Blood samples

Venous blood samples were collected prior to the BAL procedure and were centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes. Plasma was separated, coded and frozen at −80°C until further processing.

Cytokines determinations

The determination of cytokines levels [interleukin (IL)-6, IL-8, IL-10 and tumour necrosis factor α (TNF-α)] were analysed using the commercially available enzyme immunoassay (Pharmingen, BD Biociencias, Madrid, Spain) according to the manufacturer's protocol. The limits of detection were 3 pg/ml for IL-6, 3 pg/ml for IL-8, 2 pg/ml for IL-10 and 1 pg/ml for TNF-α.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS statistical software package, version 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA), and the GraphPad software (San Diego, CA, USA). Chi-square and Mann–Whitney U tests were performed for, respectively, the qualitative and quantitative variables. Data are shown as mean ± SEM. Statistical significance was considered at a p value of <0.05.

Results

Patient characteristics

86 patients were included: 52 NCAP, 15 CAP controls and 19 non-infection controls. The main demographic characteristics, comorbidity, initial pneumonia severity and antimicrobial therapy for each group are shown in Table 1. The median days of hospitalization prior to enrolment in the study was 5 days in the NCAP group and 4 in the CAP control group. The reasons for non-response in the NCAP group were: 32 (61.5%) persistent fever and clinical worsening; 15 (28.8%) radiological progression- 2 of these with pleural effusion-; and 5 (9.6%) respiratory failure requiring invasive ventilation. Six patients died during hospitalization.

Table 1 General characteristics, comorbidity, initial pneumonia severity and antimicrobial therapy of the study population

	NCAP	*CAP control*	*Non-infection control*	*p value**
Subjects, n	52	15	19	
Age, years	61 ± 2	66 ± 4	61 ± 2	NS
Male/Female	31/21	12/3	16/3	NS
Current smoker, n	16	2	9	NS
Comorbidity, n				
- Cerebrovascular disease	11(21)	3(20)	2(10)	NS
- Heart disease	12(23)	3(20)	2(10)	NS
- COPD	7(14)	7(46)	7(37)	0.01
PSI score	98 ± 4	102 ± 7	N/A	NS
CRP (mg/dl)			N/A	
- At admission	232 ± 25	190 ± 30		NS
- At enrolment	165 ± 18	68 ± 21		0.05
Inhaled corticosteroids	2(29)	1(14)	0(15)	NS
Systemic corticosteroids	2(29)	3(43)	0	NS
Antimicrobial therapy$^{\beta}$, n			N/A	
- Fluoroquinolone	6(12)	5(33)		
- β-lactam plus macrolide	23(44)	9(60)		
- β-lactam plus fluoroquinolone	8(15)	0		
- Others regimens**	15(28)	1(7)		

Data are expressed as mean ± SEM or n(%). *Mann–Whitney *U* test and chi-square test for continuous and categorical variables, respectively.
NCAP: non-responders pneumonia; CAP: community-acquired pneumonia; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; PSI score: Pneumonia Severity Index score; CRP: C-reactive protein; NS: non-significant. N/A: not applicable.
$^{\beta}$Antimicrobial therapy at enrolment of the study.
Other regimens **vancomycin, imipemen-cilastatin, piperacillin-tazobactam, amikacin, clindamycin, ceftazidime, ertapenem and linezolid.

General characteristics, comorbidity conditions and corticosteroids treatment according to macrolides regimens in the NCAP and CAP control groups are shown in Table 2. The median macrolide dosages for patients at the point of enrolment for the study were: 5 dosages of azithromycin 500 mg/24 h iv for the NCAP group and 3 dosages of azithromycin 500 mg/24 h iv for the CAP control group.

Microbiological results

In the NCAP group, etiological microorganism was identified in 24 patients (46%). The most frequent isolated pathogen was *Streptococcus pneumoniae* (13 patients 25%): 3 in both blood culture and urinary antigen, 7 urinary antigen, 1 blood culture and 2 in BAL. The aetiological diagnosis with regard to macrolide regimens or otherwise, is provided in Table 3. In the CAP control group, aetiological diagnosis was reached in 5 patients (33.3%): 4 *Streptococcus pneumoniae*, 1 *Pseudomonas aeruginosa*.

Cytokine levels in BAL and blood samples

NCAP group

The comparison between patients treated with and without macrolide regimens showed: In BAL fluid, IL-6 and TNF-α were significantly lower in patients treated with macrolide regimens (216 ± 66 vs 590 ± 230 pg/mL; p = 0.01 and 1 ± 0.3 vs 4 ± 0.8; p = 0.03 respectively), (Figure 1), with a trend towards lower IL-8 levels (p = 0.06). After excluding patients with inhaled or systemic concomitant corticosteroids treatment, lower IL-6 levels in BAL (111 ± 32 vs 706 ± 300; p = 0.004) were confirmed.

In blood, IL-8 and IL-10 were significantly lower in patients with macrolide regimens (42 ± 13 vs 57 ± 13; p = 0.04, and 15 ± 6 vs 27 ± 7; p = 0.01 respectively), (Figure 2), with a trend towards lower IL-6 levels (p = 0.06). No detectable levels of TNF-α in blood were obtained. In the subset of patients without corticosteroids concomitant treatment we corroborated lower IL-6, IL-8 and IL-10 levels in patients with macrolide regimens (96 ± 39 vs 305 ± 137, p = 0.05; 35 ± 14 vs 52 ± 14, p = 0.05; and 14 ± 6 vs 23 ± 6, p = 0.02, respectively).

CAP control group

No significant differences in blood cytokine levels were observed between patients treated with macrolide containing regimens and those treated with non-macrolide regimens (Figure 2) in the whole group and after excluding patients with corticosteroid concomitant treatment. Similarly, no differences were observed between COPD and non-COPD patients.

Table 2 General characteristics, comorbidity and corticosteroids treatment in NCAP and CAP control groups according to macrolide containing regimens and non-macrolide regimens

	NCAP			*CAP controls*		
	Macrolide regimens[α]	*Non-macrolide regimen*[β]	*p value**	*Macrolide regimens*[α]	*Non-macrolide regimens*[β]	*p value**
Subjects, n	23	29		9	6	
Age, years	60 ± 4	63 ± 3	NS	78 ± 3	70 ± 9	NS
Male/Female	12/11	19/10	NS	7/2	5/1	NS
Co-morbidity, n						
- Cerebrovascular disease	4(17)	7(24)	NS	3(33)	0	NS
- Heart disease	4(17)	8(28)	NS	2(22)	1(17)	NS
- COPD	1(4)	6(21)	NS	3(33)	4(67)	NS
Risk class of Fine			NS			NS
I-II	7(30)	6(21)		0	1(17)	
III-V	16(70)	23(79)		9(100)	5(83)	
Inhaled corticosteroid	0	2(7)	NS	1(11)	0	NS
Systemic corticosteroid	3(13)	6(21)	NS	4(44)	2(33)	NS

Data are expressed as mean ± SEM or n(%). *Mann–Whitney *U* test and chi-square test for continuous and categorical variables, respectively.
[α]Macrolide regimens: beta-lactam (ceftriaxone, cefotaxime or co-amoxi-clavulanate + macrolide (azithromicyn: 500 mg/24 h).
[β]Non-macrolide regimens: fluoroquinolone (levofloxacin: 500 mg/12-24 h) in monotherapy or beta-lactam + fluoroquinolone or other regimens.
NCAP: non-responders pneumonia; CAP: community-acquired pneumonia; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; NS: non-significant. N/A: not applicable.

Clinical outcomes

The relationship between the days needed to reach clinical stability and LOS according to treatment with macrolide and non-macrolide regimens in the NCAP group and the CAP control group is shown in Table 4.

In the NCAP group, patients with macrolide containing regimens required fewer days than patients with non-macrolide regimens to reach clinical stability, and had shorter LOS. After excluding patients with corticosteroid concomitant treatment we confirmed significantly shorter LOS in patients treated with macrolide regimens (13 ± 1.5 vs 24 ± 4, p = 0.01, respectively) and fewer days to reach clinical stability (8 ± 1 vs 16 ± 3, p = 0.004, respectively). No differences were found in the whole CAP control group and after excluding those with corticosteroid treatments.

Discussion

The most important findings of our study are: 1) Levels of IL-6 and TNF-α in BAL and of IL-8 and IL-10 in blood were significantly lower in NCAP patients who received macrolide containing regimens than in those treated with non-macrolide regimens; and 2) there were improved clinical outcomes, such as earlier clinical stability and shorter LOS, in patients who received macrolide containing regimens. Our main findings were also confirmed in patients without any concomitant corticosteroid treatment.

Table 3 Aetiological diagnosis in NCAP and CAP control group patients according to macrolide containing regimens and non-macrolide regimens

	NCAP		*CAP control*	
	Macrolide regimens (n 23)	*Non-macrolide regimens (n 29)*	*Macrolide regimens (n 9)*	*Non-macrolideregimens (n 6)*
Microorganisms				
- *Streptococcus pneumoniae*	5 (21.7)	8(27.6)	2(22.2)	2(33.3)
- *Pseudomonas aeruginosa*	2(8.7)	5(17.2)	1(11.1)	0
- *Escherichia coli*	0	2(6.9)	0	0
- *Streptococcus spp*	1(4.3)	1(3.4)	0	0
- MRSA	0	2(6.9)	0	0
- Polymicrobial	0	7(24.1)	0	0
Pathogens isolated	8(34.8)	16(55.2)	3(33.3)	2(33.3)

Date are presented as n (%).
NCAP: non-responders pneumonia; CAP: community-acquired pneumonia; MRSA: methilcilin-resistant *Staphylococcus aureus*.

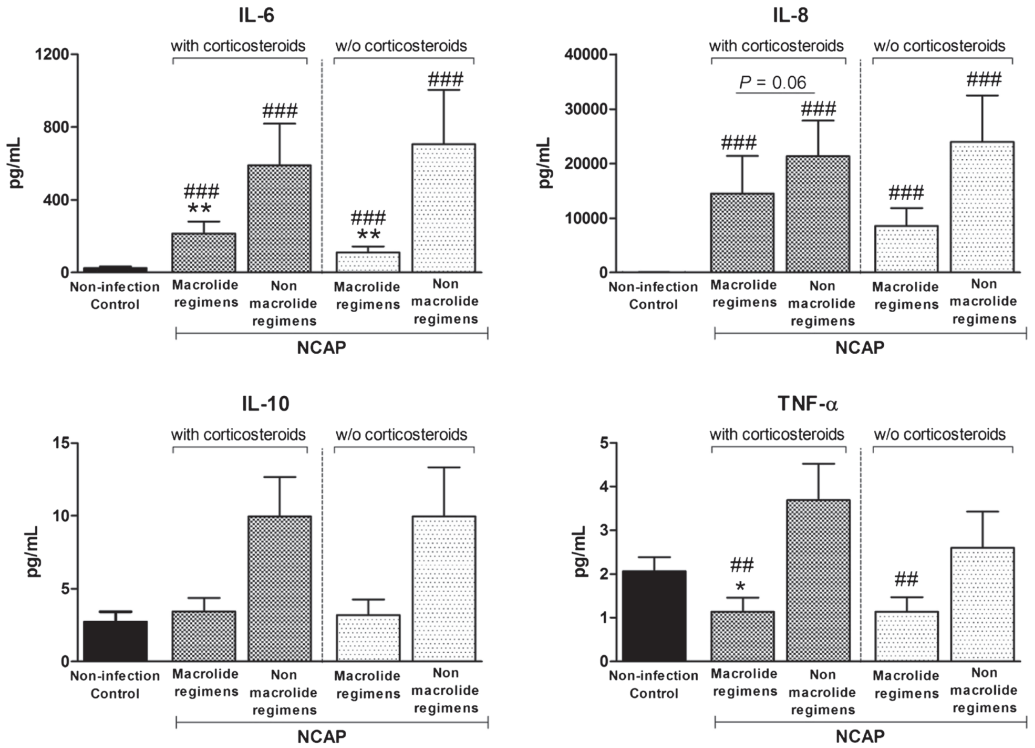


Figure 1 BAL cytokine levels in the NCAP group according to macrolide containing regimens and non-macrolide regimens. Data excluding corticosteroids users are also depicted. *Legend:* Data are presented as mean ± SEM. **/* macrolide regimens vs non-macrolide regimens; ###/## vs control. *: $p < 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ##: $p < 0.05$; ###: $p < 001$. NCAP: non-responders pneumonia; IL: interleukin; TNF-α: tumour necrosis factor-α.

In this study, patients who did not reach clinical stability at 72 hours after antibiotic treatment developed raised cytokine inflammatory levels in both compartments, pulmonary and systemic, thereby following a pattern similar to that found in previous reports. Persistently high levels of IL-6, IL-8 and IL-10 in BAL fluid or serum have been found in severe pneumonia and NCAP [2,4,20,21], reflecting an ongoing inflammation. In this context, declining levels of biomarkers, IL-6, IL-8 and IL-10, along with apoptosis of neutrophils have also been reported at clinical stability [22].

The beneficial impact of controlling inflammatory response through immunodulatory agents in CAP has received significant attention [5,23-26]. In our study, NCAP patients treated with macrolide containing regimens exhibited a trend towards IL-8 BAL fluid levels and significantly lower IL-6 and TNF-α compared to patients treated with non-macrolide regimens. Moreover, in blood our results also confirmed lower levels of IL-6, IL-8 and IL-10 in the NCAP patients treated with macrolide regimens, while in those CAP control patients who attained clinical stability no significant differences were detected.

Despite the recognized role of macrolides in tempering inflammation, there are very few studies on humans of this [25]. In cases of CAP, Demartini *et al.* [27] compared systemic cytokines levels of clarithromycin (500 mg twice a day for 7 days) and amoxicylin (1 g three times a day for 7 days) in patients before starting antibiotic therapy, at the 3rd and 7th days of therapy. Clarithromycin decreased significantly levels of IL-6 and increased levels of IL-10 at the 3rd and 7th days in comparison with basal levels. In a randomized clinical study of ventilator associated pneumonia patients, Spyridaki *et al.* [28] analyzed the effect of the clarithromycin and placebo on cytokines over six consecutive days. The serum ratio of IL-10 to TNF-α decreased in the clarithromycin group compared to the placebo group.

It is also worth highlighting that in our study the effect of macrolides was not apparent in CAP patients with clinical stability, which indicates that, at that point, cytokine levels were already reduced.

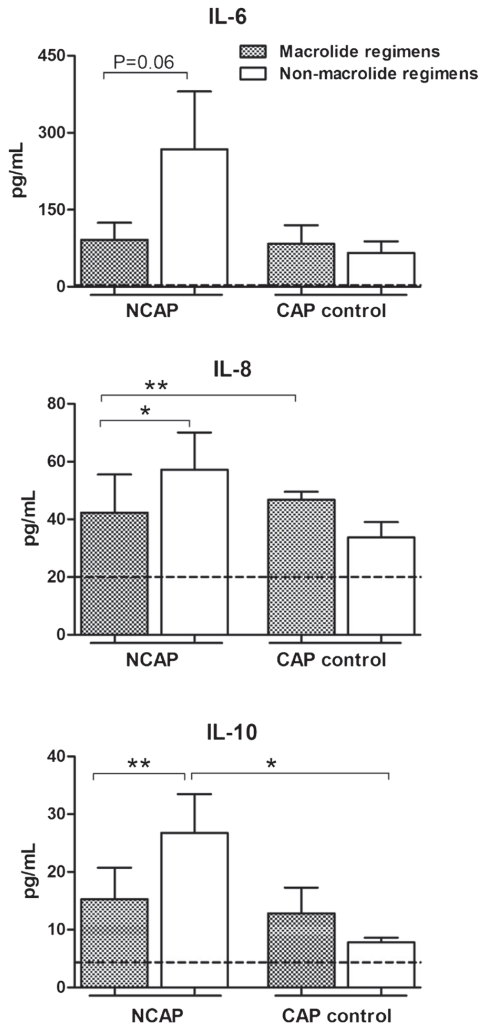


Figure 2 Blood cytokine levels in NCAP and CAP control group according to macrolide containing regimens and non-macrolide regimens. ***Legend:*** Data are presented as mean ± SEM. *: $p < 0.05$; **: $p \leq 0.01$. NCAP: non-responders pneumonia; CAP: community-acquired pneumonia; IL: interleukin. Non-infection control group is represented as dashed line.

Macrolides inhibit intracellular signaling pathways, suppress the production of NF-kB and the synthesis and/or secretion of pro-inflammatory cytokines, and decrease influx and neutrophil activity [23]. In animal models with pneumonia, the reduction of chemokine secretion and cytokine levels was demonstrated when microorganisms were resistant to macrolides, suggesting that benefits were independent of antimicrobial activity [29]. Sanz *et al.* [30], reported in respect of an animal study *in vivo* that erythromycin exerts anti-inflammatory activity and inhibits leukocyte recruitment in the lung. In *in vitro* studies, results suggest that macrolides exhibit a suppressive effect on cytokines in models of acute inflammation [25], viral bronchiolitis [31] and ventilator-induced lung injury [32]. Anderson *et al.* [33], have reported that the production of pneumolysin, a key virulence factor of the pneumococcus, is attenuated by exposure of this microbial pathogen to clarithromycin.

Table 4 Comparison of clinical outcomes in NCAP and CAP control group according to macrolide containing regimens and non-macrolide regimens

	Clinical stability (days)	*p#*	*LOS*	*p#*
NCAP				
-Macrolide regimens *(n 23)*	8(6–12)	0.007	12(10–21)	0.007
-Non-macrolide regimens *(n 29)*	14(8–27)		20(13–36)	
CAP control				
-Macrolide regimens *(n 9)*	6(3–10)	0.6	9(7–16)	0.8
-Non-macrolide regimens *(n 6)*	6(3–6)		9(8–12)	

Data are presented as median and interquartile range. *p#* values were calculated using the Mann–Whitney *U*-test.
NCAP: non-responders pneumonia; CAP: community-acquired pneumonia; LOS: Length of stay.

The beneficial impact of macrolides on outcomes in CAP cases has been recently evaluated in a systematic review [23] that identified 6 uncontrolled studies: 4 in favor of macrolides [12,34-36] and 2 without beneficial effects [13,14]. Moreover, in severe sepsis due to CAP, Restrepo *et al.* [10], found that patients who received macrolide therapy in comparison with those patients who did not receive it were associated with decreased mortality at 30 days (11% vs 29%, $p < 0.001$) and at 60 days (12% vs 34%, $p < 0.001$) even in those cases with macrolide-resistant pathogens. Recently, Rodrigo *et al.* [37], studied the benefits of beta-lactams/macrolide combination therapy over single beta-lactams therapy for the treatment of immunocompetent adults hospitalized with CAP. They reported that the 30 days inpatient death rate was lower in the combination therapy than in the single therapy group (23% vs 26.8%; OR 0.81, 95% CI 0.72 to 0.93, $p = 0.001$). In bacteremic pneumonia Metersky *et al.* [11], reported that the use of macrolides was associated with lower in-hospital mortality, 30-day mortality and readmission within 30 days of discharge.

Interestingly, the gain in survival and improved outcomes with regard to dual antibiotic therapy, mainly in severe and bacteremic pneumococcal CAP, is associated principally with treatments that include macrolides [38] instead of beta-lactams plus fluoroquinolones [39]. This

is probably due to the immunomodulatory effect of macrolides.

In vitro and *in vivo* studies have shown that, due to their immunomodulatory effects, macrolides decrease inflammatory response, independently of antibacterial activity, through different pathways: inhibition of NF-kβ along with reduction of proinflammatory cytokines production; an inhibitory effect on the release of inflammatory cells such as polymorphonuclear cells; and an effect on structural cells of the respiratory tract that improves mucociliary clearance and increases the expression of molecules tight junctions or β-defensin [24]. In addition, macrolide antibiotics have an effect on microorganisms because they may inhibit virulence factors production, biofilm formation and protein synthesis [24]. Moreover, a macrolide combination therapy could provide better coverage for atypical microorganisms.

Some other important factors can influence the inflammatory response in CAP patients, such as corticosteroids treatment and comorbidity as COPD [40]. In our study, we corroborated our results with lower IL-6 in BAL and IL-8 and IL-10 in blood after excluding patients treated with corticosteroids.

Our findings are consistent with previous studies as they show an improvement of clinical outcomes (faster clinical stability and shorter LOS) and a reduction of cytokine levels in CAP patients with acute lung infection who are treated with macrolide containing regimens. These findings could be related to decreased levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8 and TNF-α, and support the value of macrolides for their beneficial effect over immunomodulatory properties.

The present study has some limitations that should be considered.

First, the absence of BAL fluid samples in the CAP control group as, for ethical reasons, we did not perform a bronchoscopy in patients with adequate response. There are few human studies that report compartmental inflammatory response in patients with CAP, probably because of the ethical difficulties of performing BAL in non-severe CAP. The current guidelines for management of CAP do not recommend invasive studies when clinical response is appropriate. Second, for our study we enrolled patients after they had received antibiotic treatment. We therefore did not have cytokine levels for those patients prior to initiating their treatment. Third, to improve the robustness of our results, we could ideally have been controlled for patient age and pneumonia severity. However, our study draws upon a single-hospital cohort, and hence upon a limited number of patients. This, and the aforementioned difficulties in collecting data from NCAP patients, including the BAL procedure, prevented our being able to conduct a multivariate analysis for this study.

Conclusions

Our study shows that after 72 hours of antibiotic therapy, NCAP patients treated with macrolide containing regimens have lower cytokine levels in both compartments (systemic and pulmonary) than those treated with non-macrolide regimens. This supports the immunomodulatory effect of macrolides on cytokine profiles during the course of treatment. That effect seems to contribute to faster resolution and earlier clinical stability. Further randomized trials are needed to confirm the benefit of macrolide therapy in NCAP patients.

Abbreviations

BAL: Bronchoalveolar lavage; CAP: Community-acquired pneumonia; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease; IL: Interleukin; LOS: Length of hospital stay; NCAP: Non-responders CAP; TNF-α: Tumour necrosis factor-α.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RM designed the study, analyzed, discussed and interpreted the data; she also participated in the revision of the manuscript. MJL participated in study design, statistical analysis and interpretation of data and wrote the manuscript. IM performed the determinations of cytokines, statistical analysis and interpretation of data and contributed to writing the manuscript. BS, EC, JC, participated in study design, interpretation of data and revision of the manuscript. JMM, RM and AG performed the microbiological analysis, participated in the statistical analysis and interpretation of data and revision of the manuscript. All the authors analyzed and discussed the data. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Ciber of respiratory illnesses (CIBERES), an initiative from the Carlos III Health Institute (grant number PI 08/0727), the Bancaja-Fundación para la Investigación Hospital La Fe, Conselleria de Sanidad de la Comunidad Valenciana (grants numbers AP-018/06 and SAF2009-08913) and the public funding from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Instituto de Salud Carlos III, grant number CA10/01027).

Author details

[1]Pneumology Department, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain. [2]Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain. [3]Pharmacology Department, University of Medicine, Universidad de Valencia, Valencia, Spain. [4]Medicine-Doctoral Programme Department, Barcelona Autonomous University, Barcelona, Spain. [5]Research contract IIS La Fe-Fundación Bancaja, Valencia, Spain. [6]Microbiology Department, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain. [7]CIBER de Enfermedades Respiratorias (CibeRes), Valencia, Spain. [8]Servicio de Neumología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Avda Bulevar Sur, 46026 Valencia, Spain.

Received: 11 August 2014 Accepted: 5 January 2015
Published online: 07 February 2015

References

1. Arancibia F, Ewig S, Martinez JA, Ruiz M, Bauer T, Marcos MA, et al. Antimicrobial treatment failures in patients with community-acquired pneumonia: causes and prognostic implications. Am J Respir Crit Care Med. 2000;162:154–60.
2. Ioanas M, Ferrer M, Cavalcanti M, Ferrer R, Ewig S, Filella X, et al. Causes and predictors of non-response to treatment of intensive care unit-acquired pneumonia. Crit Care Med. 2004;32:938–45.
3. Menéndez R, Cavalcanti M, Reyes S, Mensa J, Martinez R, Marcos MA, et al. Markers of treatment failure in hospitalised community-acquired pneumonia. Thorax. 2008;63:447–52.

4. Kellum JA, Kong L, Fink MP, Weissfeld LA, Yealy DM, Pinsky MR, et al. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis. Results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. Arch Intern Med. 2007;167:1655–63.
5. Culic O, Erakovic V, Parnham MJ. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. Eur J Pharmacol. 2001;429:209–29.
6. Wales D, Woodhead M. The anti-inflammatory effects of macrolides. Thorax. 1999;54 Suppl 2:58–62.
7. Steel HC, Theron AJ, Cockeran R, Anderson R, Feldman C. Pathogen- and host-directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics. Mediators Inflamm. 2012;2012:584262. doi:10.1155/2012/584262.
8. Martin-Loeches I, Lisboa T, Rodriguez A, Putensen C, Annane D, Garnacho-Montero J, et al. Combination antibiotic therapy with macrolides improves survival in intubated patients with community-acquired pneumonia. Intensive Care Med. 2010;36:612–20.
9. Parnham MJ. Immunomodulatory effects of antimicrobials in the therapy of respiratory tract infections. Curr Opin Infect Dis. 2005;18:125–31.
10. Restrepo MI, Mortensen EM, Waterer GW, Wunderink RG, Coalson JJ, Anzueto A. Impact of macrolide therapy on mortality for patients with severe sepsis due to pneumonia. Eur Respir J. 2009;33:153–9.
11. Metersky ML, Ma A, Houck PM, Bratzler DW. Antibiotics for bacteremic pneumonia: improve outcomes with macrolides but not fluorquinolones. Chest. 2007;131:466–73.
12. Baddour LM, Yu VL, Klugman KP, Feldman C, Ortqvist A, Rello J, et al. International Pneumococcal study group. Combination antibiotic therapy lowers mortality among severily ill patients with pneumococcal pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2004;170:440–4.
13. Dwyer R, Ortqvist A, Aufwerber E, Henriques Normark B, Marrie TJ, Mufson MA, et al. Addition of a macrolide to a β-lactam in bacteremic pneumococcal pneumonia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006;25:518–21.
14. Aspa J, Rajas O, Rodriguez DeCastro F, Huertas MC, Borderías L, Cabello FJ, et al. Pneumococcal Pneumonia in Spain study group. Impact of initial antibiotic choice on mortality from pneumococcal pneumonia. Eur Respir J. 2006;27:1010–9.
15. Halm EA, Fine MJ, Marrie TJ, Coley CM, Kapoor WN, Obrosky DS, et al. Time to clinical stability in patients hospitalized with community-acquired pneumonia. JAMA. 1998;279:1452–7.
16. Menéndez R, Torres A, Rodríguez de Castro F, Zalacaín R, Aspa J, Martín Villasclaras JJ, et al. Reaching stability in community-acquired pneumonia: the effects of the severity of disease, treatment, and the characteristics of patients. Clin Infect Dis. 2004;39:1783–90.
17. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. N Engl J Med. 1997;336:243–50.
18. Alfageme I, Aspa J, Bello S, Blanquer J, Blanquer R, Borderías L, et al. Guidelines for the diagnosis and management of community-acquired pneumonia. Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery (SEPAR). Arch Bronconeumol. 2005;41:272–89.
19. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage. Report of the European Society of Pneumology Task Group. Eur Respir J. 1989;2:561–585
20. Montón C, Torres A, El-Ebiary M, Filella X, Xaubet A, de la Bellacasa JP. Cytokine expression in severe pneumonia: a bronchoalveolar lavage study. Crit Care Med. 1999;27:1745–53.
21. Paats MS, Bergen IM, Hanselaar WE, van Zoelen ECG, Hoogsteden HC, Hendriks RW, et al. Local and systemic cytokine profiles in nonsevere and severe community-acquired pneumonia. Eur Respir J. 2013;41:1378–85.
22. Moret I, Lorenzo MJ, Sarria B, Cases E, Morcillo E, Perpiñá M, et al. Increased lung neutrophil apoptosis and inflammation resolution in nonresponding pneumonia. Eur Respir J. 2011;38:1158–64.
23. Corrales-Medina VF, Musher DM. Immunomodulatory agents in the treatment of community-acquired pneumonia: a systematic review. J Infect. 2011;63:187–99.
24. Meijvis SC, van de Garde EM, Rijkers GT, Bos WJ. Treatment with anti-inflammatory drugs in community-adquired pneumonia. J Intern Med. 2012;272:25–35.
25. Kovaleva A, Remmelts HH, Rijkers GT, Hoepelman AI, Biesma DH, Oosterheert JJ. Immunomodulatory effects of macrolides during community-acquired pneumonia: a literature review. J Antimicrob Chemother. 2012;67:530–40.
26. Steel HC, Cockeran R, Anderson R, Feldman C. Overview of community-acquired pneumonia and the role of inflammatory mechanisms in the immunopathogenesis of severe pneumococcal disease. Mediators Inflamm. 2013;2013:490346. doi:10.1155/2013/490346. Epub 2013 Dec 25.
27. Demartini G, Esposti D, Marthyn P, Lapidari A, Fraschini F, Scaglione F. Effect of multiple doses of clarithromycin and amoxicillin on IL-6, IFN gamma and IL-10 plasma levels in patients with community acquired pneumonia. J Chemother. 2004;16:82–5.
28. Spyridaki A, Raftogiannis M, Antonopoulou A, Tsaganos T, Routsi C, Baziaka F, et al. Effect of clarithromycin in inflammatory markers of patients with ventilator-associated pneumonia and sepsis caused by gram-negative bacteria: results from a randomized clinical study. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:3819–25.
29. Nakamura S, Yanagihara K, Araki N, Yamada K, Morinaga Y, Izumikawa K, et al. Efficacy of clarithromycin against experimentally induced pneumonia caused by clarithromycin-resistant Haemophilus influenzae in mice. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:757–62.
30. Sanz MJ, Nabah YN, Cerdá-Nicolás M, O'Connor JE, Issekutz AC, Cortijo J, et al. Erythromycin exerts *in vivo* anti-inflammatory activity downregulating cell adhesion molecule expression. Br J Pharmacol. 2005;144:190–201.
31. Beigelman A, Mikols CL, Gunsten SP, Cannon CL, Brody SL, Walter MJ. Azithromycin attenuates airway inflammation in a mouse model of viral bronchiolitis. Respir Res. 2010;11:90.
32. Amado-Rodríguez L, González-López A, López-Alonso I, Aguirre A, Astudillo A, Batalla-Solís E, et al. Anti-inflammatory effects of clarithromycin in ventilator-induced lung injury. Respir Res. 2013;14:52.
33. Anderson R, Steel HC, Cockeran R, von Gottberg A, de Gouveia L, Klugman KP, et al. Clarithromycin alone and in combination with ceftriaxone inhibits the production of pneumolysin by both macrolide-susceptible and macrolide-resistant strains of Streptococcus pneumoniae. J Antimicrob Chemother. 2007;59:224–9.
34. Martínez JA, Horcajada JP, Almela M, Marco F, Soriano A, García E, et al. Addition of a macrolide to a beta-lactam-based empirical antibiotic regimen is associated with lower in-hospital mortality for patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. Clin Infect Dis. 2003;36:389–95.
35. Weiss K, Low DE, Cortes L, Beaupre A, Gauthier R, Gregoire P, et al. Clinical characteristics at initial presentation and impact of dual therapy on the outcome of bacteremic Streptococcus pneumoniae pneumonia in adults. Can Respir J. 2004;11:589–93.
36. Mufson MA, Stanek RJ. Revisiting combination antibiotic therapy for community-acquired invasive streptococcus pneumoniae pneumonia. Clin Infect Dis. 2006;42:304–6.
37. Rodrigo C, Mckeever TM, Woodhead M, Lim WS, On behalf of the British Thoracic Society. Single versus combination antibiotic therapy in adults hospitalized with community-acquired pneumonia. Thorax. 2013;68:493–5.
38. Waterer GW, Rello J, Wunderink RG. Management of community-acquired pneumonia in adults. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183:157–64.
39. Mortensen EM, Restrepo MI, Anzueto A, Pugh J. The impact of empiric antimicrobial therapy with β-lactam and fluoroquinolone on mortality for patients hospitalized with severe pneumonia. Crit Care Med. 2005;10:R8.
40. Crisafulli E, Menéndez R, Huerta A, Martinez R, Montull B, Clini E, et al. Systemic inflammatory pattern of patients with community-acquired pneumonia with and without COPD. Chest. 2013;143:1009–17.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

RESULTADOS

6-RESULTADOS

Los estudios que constituyen esta tesis han permitido obtener los siguientes resultados:

ARTÍCULO 1: Moret I, Lorenzo MJ, Sarria B, Cases E, Morcillo E, Perpiñá M, Molina JM, Menéndez R. **Increased lung neutrophil apoptosis and inflammation resolution in nonresponding pneumonia. Eur Respir J. 2011 Nov;38(5):1158-64**.

Características generales de los grupos:

En nuestro estudio se incluyeron 60 pacientes: 29 de ellos con NAC que no responde al tratamiento, 15 con NAC y 16 controles sin proceso infeccioso conocido. Los datos demográficos y las características clínicas de los tres grupos se muestran en la tabla 1. No hubo diferencias significativas respecto a edad, comorbilidad y sexo entre los grupos. Seis pacientes del grupo de NAC que no responde al tratamiento fueron excluídos debido a otros diagnósticos (un caso de tuberculosis, tres casos de cáncer de pulmón, uno caso de bronquiolitis obliterante y un caso de aspergilosis pulmonar invasiva). Las causas de falta de respuesta al tratamiento de los 23 pacientes con NAC no respondedora fueron: 11 pacientes con fiebre persistente y empeoramiento clínico, nueve pacientes con progresión radiológica (dos de ellos con derrame pleural) y tres con fracaso respiratorio y necesidad de ventilación mecánica.

En el grupo de NAC que no responde al tratamiento, el diagnóstico etiológico se alcanzó en 14 pacientes (61%): *Streptococcus pneumoniae* (siete casos), *Escherichia coli* (un caso), *Pseudomona aeruginosa* (un caso), *Staphylococcus aureus meticilin-resistente* (dos casos), etiología mixta (cinco casos). En LBA, se aislaron los siguientes microorganismos: *Streptococcus pneumoniae* (un caso), *Streptococcus spp* (dos casos), *Enterococcus spp* (un caso), *Pseudomona aeruginosa* (un caso), *Staphylococcus aureus meticilin-resistente* (dos casos), *Acinetobacter baumannii* (un caso).

En el grupo control NAC el germen aislado con mayor frecuencia fue *Streptococcus pneumoniae* (27%).

Apoptosis del neutrófilo en sangre y lavado broncoalveolar

El recuento de leucocitos en sangre y lavado broncoalveolar (LBA) fue significativamente más elevado en el grupo de NAC que no responde al tratamiento. La comparación de los valores de apoptosis de los neutrófilos analizados mediante inmuno-tinción y citometría de flujo (figura 1a-c) y mediante tinción diferencial y observación por microscopía, mostró que por ambas técnicas se obtenían resultados similares, validando por tanto los resultados de citometría (figura 1d).

La apoptosis basal en LBA fue mayor (13±3%) en NAC que no responde al tratamiento que en los controles (6±3) aunque sin alcanzar significación estadística. Observamos un patrón similar en sangre en NAC no respondedora al tratamiento comparado con el control sin infección y en el control con NAC (15±4%, 4±1% y 6±2%, respectivamente). Figura 2c. No encontramos correlación significativa entre la apoptosis del neutrófilo en LBA y sangre en la NAC no respondedora al tratamiento. Estudiamos la apoptosis espontánea tras cultivo de 24 horas en un subgrupo de pacientes (n=5) para observar la evolución de la apoptosis, *in vitro,* y comprobar si estaba alterada en ese grupo de pacientes (figuras 2b y d). La apoptosis espontánea fue más baja en sangre en la NAC que no responde al tratamiento comparada con el control sin infección y la NAC ($p<0.05$). El mismo patrón de apoptosis fue observado en LBA comparando NAC que no responde al tratamiento y control sin infección, aunque sin alcanzar significación estadística.

Citocinas en sangre y lavado broncoalveolar

Los niveles de citocinas se muestran en la figura 3. Los valores de IL-6 fueron significativamente más elevados en LBA en pacientes con NAC que no responde (comparado con controles sin infección), y en sangre (comparado con controles sin infección y NAC). Los valores de IL-8 fueron más elevados en LBA de pacientes con NAC que no responde al tratamiento (comparado con controles sin infección). No se encontraron diferencias significativas en sangre (comparado con los controles sin infección y NAC). Los valores de IL-10 fueron significativamente más elevados en sangre (comparado con los controles sin infección y NAC); en LBA no se encontraron diferencias significativas (comparado con controles sin infección).

En la NAC que no responde al tratamiento, los valores de citocinas en LBA comparado con los valores en sangre fueron significativamente más elevados para IL-8 [mediana 4,358 (rango intercuartil 868-12,117) $pg.mL^{-1}$] versus [38 (24-78) $pg.mL^{-1}$, y significativamente más elevados en sangre para IL-10 [22 (9-60) versus 3(2-9) $pg.mL^{-1}$]. No encontramos diferencias significativas respecto a IL-6 entre sangre y LBA.

En la NAC que no responde al tratamiento, observamos correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de IL-6 en sangre y LBA ($r=0.7$, $p=0.01$). Los valores de IL-6 en LBA presentaron también correlación estadísticamente significativa con los valores de IL-10 en sangre ($r=0.7$, $p=0.02$). Observamos además correlación significativa del porcentaje y recuento absoluto de neutrófilos en LBA con los valores de IL-8 en LBA ($r=0.6$, $p=0.01$ y $r=0.7$, $p<0.01$, respectivamente).

Resolución clínica

En el grupo de NAC que no responde al tratamiento, la mediana de días necesarios para alcanzar la estabilidad clínica fue de 12 días (7-18), y la mediana de la estancia hospitalaria fue de 20 días (12-34). La elevación de la apoptosis basal de neutrófilo (≥20%) mostró una correlación negativa estadísticamente significativa con la estancia hospitalaria ($r=-0.5$, $p=0.02$) y con los días necesarios para alcanzar la estabilidad clínica ($r=-0.4$, $p=0.05$). Los pacientes con elevada apoptosis en LBA tuvieron menor estancia hospitalaria (mediana 10 versus 21 días) y necesitaron menos días para alcanzar la estabilidad clínica (mediana 7 versus 13 días). La apoptosis del neutrófilo en sangre no mostró correlación con ninguno de los dos parámetros mencionados.

Los niveles de citocinas en pacientes con NAC que no responde al tratamiento clasificados según alta (≥20%) o baja (<20%) apoptosis basal del neutrófilo en LBA se muestran en la figura 4. Los niveles en sangre de IL-10 fueron significativamente más bajos en aquellos con alta apoptosis basal. Observamos una tendencia hacia valores bajos de IL-6 e IL-8 con alta apoptosis tanto en sangre como en LBA.

Los niveles de IL-6 e IL-10 en sangre mostraron correlación positiva significativa con el número de días necesarios para alcanzar la estabilidad clínica ($r=0.7$,$p<0.01$ y $r=0.7$,

$p<0.01$, respectivamente); IL-10 además mostró correlación positiva significativa con la estancia hospitalaria ($r=0.7$, $p<0.02$).

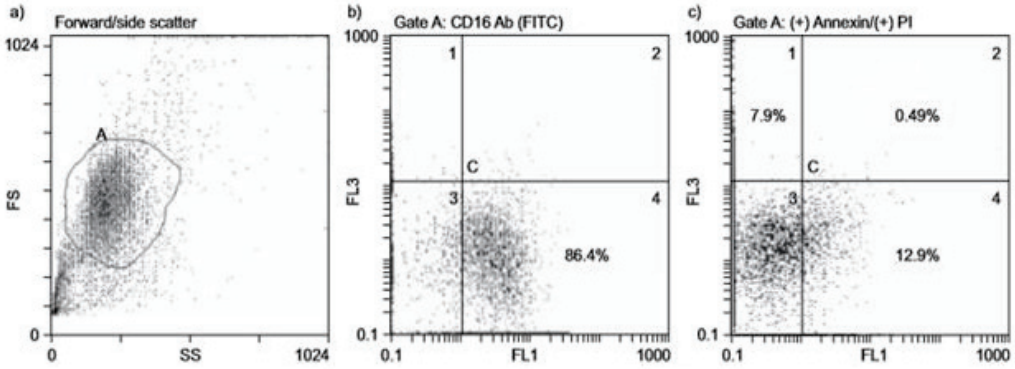
En el grupo de NAC, encontramos correlación positiva significativa con los valores de IL-6 e IL-10 en sangre con los días necesarios para alcanzar la estabilidad clínica ($r=0.4$, $p=0.02$ y $r=0.7$, $p<0.001$, respectivamente) y con la estancia hospitalaria ($r=0.4$, $p=0.03$ y $r=0.7$, $p<0.001$, respectivamente).

Tabla 1: Características del grupo de NAC que no responde al tratamiento y los grupos control

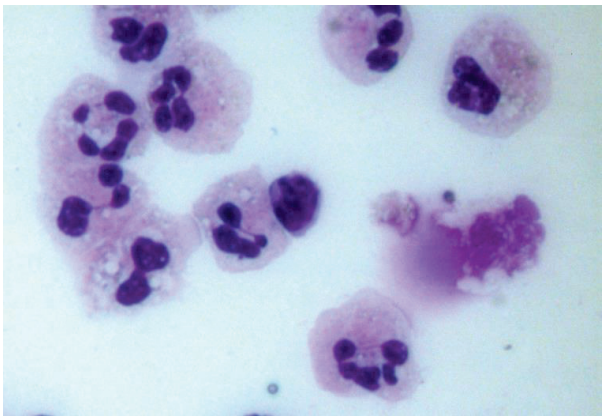
	NAC que no responde al tratamiento *(n 23)*	***NAC*** *(n 15)*	***Control*** *(n 16)*	***p****
Edad, años	61±3	66±4	60±2	NS
Hombre/Mujer	16/7	12/3	14/2	NS
Fumador/no fumador	6/17	13/2	9/7	NS
Comorbilidad, n(%)				
-Cardiovascular	6 (26)	3(20)	2(12)	NS
-EPOC	7 (30)	7(46)	5(31)	NS
-Nefropatía	2 (9)	0	1(6)	NS
-Cerebrovascular	3 (13)	3(20)	1(6)	NS
PSI score	90±6	102±7	N/A	
Recuento leucocitos sangre (cel/mm^3) -PMN %	12,752±1,268 82±11	9,877±1,065 76±3	8,217±730 62±4	0.02 0.001
LBA (total cel/ mm^3) -PMN%	7.5±2.2 38±4.5		0.5±0.2 8±3	p=0.01 p<0.001

Resultados expresados como media±SEM o n (%), * Test U de MannWhitney y test Chi cuadrado para variables continuas y categóricas respectivamente. NAC: neumonía adquirida en la comunidad; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PSI: índice severidad de la neumonía; PMN: polimorfonucleares; LBA: lavado broncoalveolar: NS: no significativo; N/A: no aplicable

Figura 1: Citometría de flujo de una muestra representativa de lavado broncoalveolar (LBA) en pacientes con NAC que no responde al tratamiento.

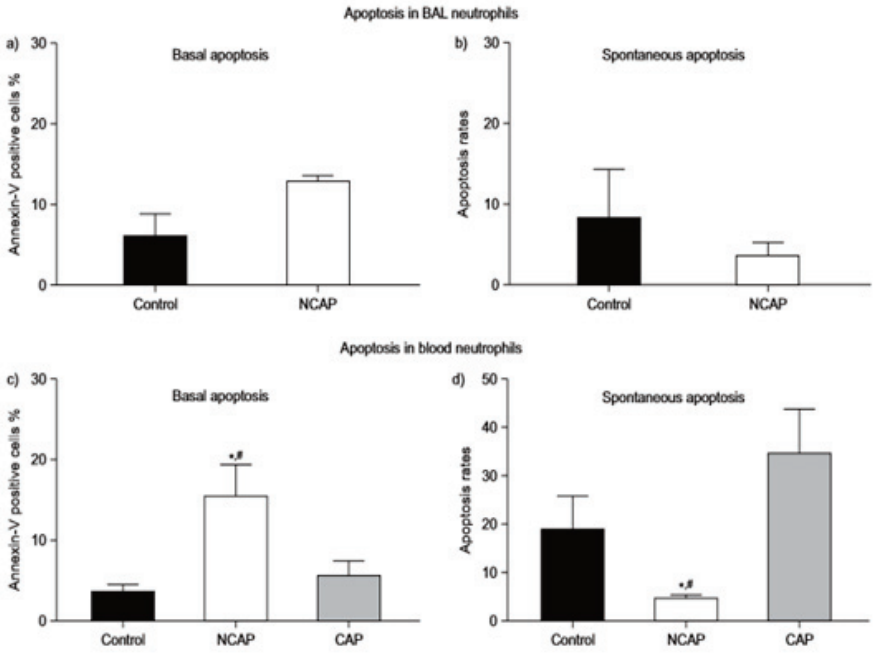


d)



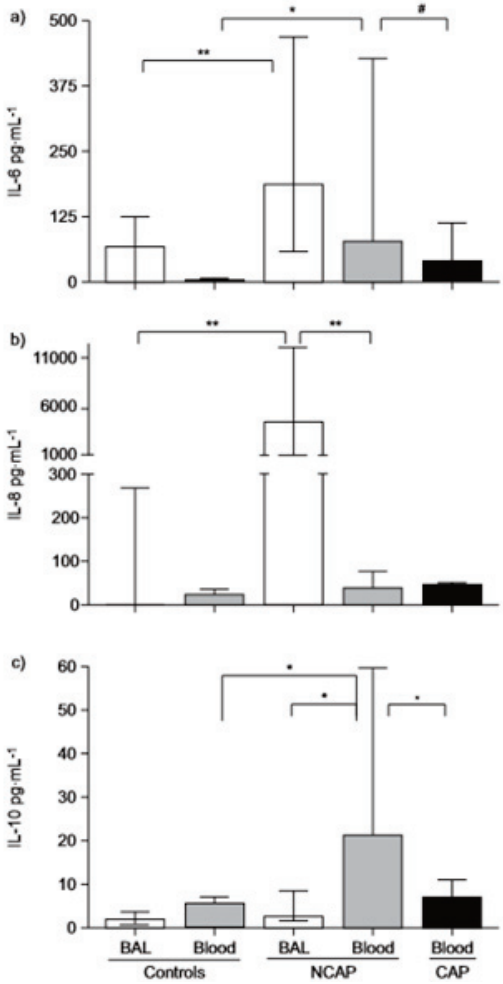
a) Identificación y selección de los neutrófilos (acotamiento de subpoblaciones, gate A) basadas en las características que presentan estas células de forward y side scatter (dot plots). b) Comprobación de la correcta selección de los neutrófilos (gate A) mediante tinción de la muestra de LBA con anti-CD16. c) Identificación del grado de apoptosis (anexina-V, FL1) y necrosis (ioduro de propidio, FL3) de la subpoblación de neutrófilos seleccionada. Para establecer los "settings" de todos los histogramas, se emplearon muestras negativas (no teñidas) y teñidas con diferentes concentraciones de anticuerpo y de anexina/IP. d) Imagen de la tinción panóptica de una muestra de LBA preparada mediante Cytospin.

Figura 2: Apoptosis del neutrófilo en lavado broncoalveolar (neumonía adquirida en la comunidad (NAC) que no responde al tratamiento y control sin infección) y en sangre periférica (NAC).



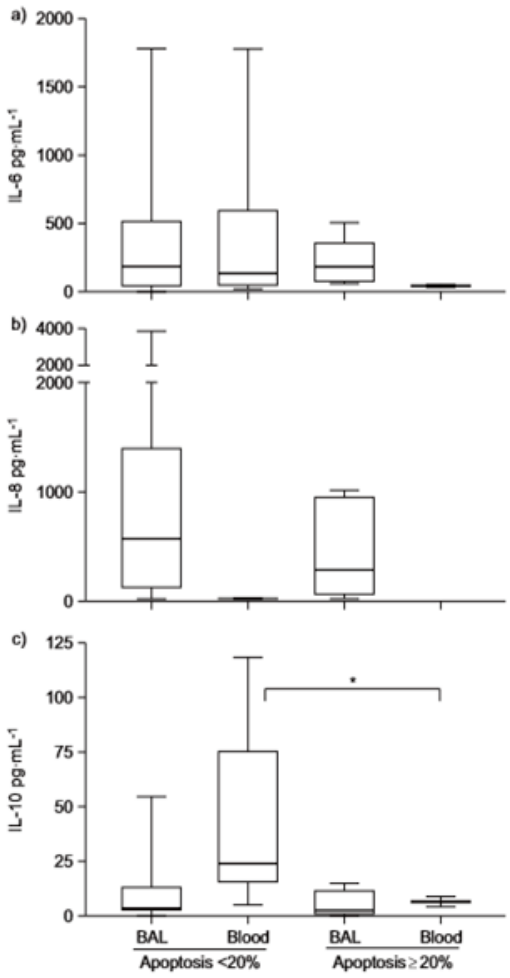
Apoptosis del neutrófilo en lavado broncoalveolar (LBA) en neumonía adquirida en la comunidad (NAC) que no responde y control sin infección (a y b) y en sangre periférica en pacientes con NAC que no responde, y control sin infección y NAC (c y d). La apoptosis se midió tras purificación de neutrófilos (apoptosis basal, ay c) y tras cultivo 24 horas in vitro (apoptosis espontánea, b y d). Apoptosis rate se define como porcentaje de células en apoptosis a las 24 horas respecto a las 0 horas. Los datos se expresan como media±SEM. *:p <0.05, NAC no respondedora versus control sin infección; #: p<0.05, NAC que no responde versus NAC.

Figura 3: Niveles de citocinas en neumonía adquirida en la comunidad (NAC) que no responde al tratamiento, NAC y control sin infección en lavado broncoalveolar y sangre periférica.



Los datos se expresan como mediana y rango intercuartil. *: p<0.05; **: p<0.01; #: p=0.06. BAL: lavado broncoalveolar. IL: interleucina

Figura 4: Niveles de citocinas en lavado broncoalveolar (LBA) y sangre periférica en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) que no responde al tratamiento, de acuerdo a apoptosis del neutrófilo en LBA baja (<20%) o alta (≥20%).



Los datos se expresan como mediana y rango intercuartil. *: p<0.05. BAL: lavado broncoalveolar. IL: interleucina

ARTÍCULO 2: MJ. Lorenzo, I. Moret, B. Sarriá, E. Cases, J. Cortijo, R. Méndez, J. Molina, A. Gimeno, R. Menéndez. Lung inflammatory pattern and antibiotic treatment in pneumonia. Respir Res 2015; 16:15.

En nuestro estudio se incluyeron 86 pacientes: 52 de ellos con NAC que no responde al tratamiento, 15 con NAC y 19 controles sin proceso infeccioso conocido. En la tabla 1, se muestran los principales datos demográficos, comorbilidades y terapia antimicrobiana para cada grupo. Las principales causas de no respuesta en el grupo de NAC que no responde fueron: 32 (61.5%) fiebre persistente y empeoramiento clínico; 15 (28.8%) progresión radiológica (dos de ellos con derrame pleural); y 5 (9.6%) fracaso respiratorio con necesidad de ventilación mecánica. Seis pacientes murieron durante la hospitalización.

En la tabla 2 se muestran las características generales, comorbilidad y tratamiento con corticoesteroides según los pacientes recibieron esquema terapéutico que contenía o no macrólidos en el grupo de NAC que no responde y en el grupo control NAC. La mediana de dosis de macrólidos recibida por paciente en el momento de la inclusión en el estudio fue de 5 dosis (azitromicina 500 mg/24 horas iv) para el grupo de NAC que no responde y de 3 dosis (azitromicina 500 mg/24 horas iv) parar el grupo control NAC.

En el grupo de NAC que no responde al tratamiento, el diagnóstico etiológico se alcanzó en 24 pacientes (46%). El germen aislado con mayor frecuencia fue *Streptococcus pneumoniae* (13 pacientes, 25%): 3 en muestras de sangre y antígeno urinario, 7 en antígeno urinario, 1 en hemocultivo y 2 en LBA. En el grupo control NAC el diagnóstico etiológico se obtuvo en 5 pacientes (33.3%), siendo el microorganismo más frecuente *Streptococcus pneumoniae.*

Niveles de citocinas en LBA y sangre

Grupo NAC que no responde al tratamiento: En la figura 1 se muestran la comparación en los niveles de citocinas en LBA entre pacientes tratados esquema terapéutico con y sin macrólidos. Los valores de IL-6 y TNF-α fueron significativamente más bajos en pacientes tratados con macrólidos (216±66 versus 590±230 pg/mL; p=0.01 y 1±0.3 versus 4±0.8; p=0.03 respectivamente), con una tendencia hacia hacia valores bajos en los niveles de IL-8 (p=0.06). Tras excluir los pacientes que además estaban siendo

tratados con corticoesteroides inhalados o sistémicos, los niveles bajos de IL-6 en LBA se mantenían (111±32 versus 706±300; p=0.004). En sangre (figura 2), los niveles de IL-8 e IL-10 fueron significativamente más bajos en pacientes tratados con macrólidos (42±13 versus 57±13; p=0.04, y 15±6 versus 27±7; p=0.01 respectivamente), con una tendencia hacia niveles bajos de IL-6 (p=0.06). No obtuvimos niveles detectables de TNF-α en sangre. En el grupo de pacientes sin tratamiento concomitante con corticoesteroides, confirmamos niveles bajos de IL-6, IL-8 e IL-10 en pacientes con tratamiento con macrólidos (96±39 versus 305±137, p=0.05; 35±14 versus 52±14, p=0.05; y 14±6 versus 23±6, p=0.02, respectivamente).

Grupo control NAC: no encontramos diferencias significativas en los niveles de citocinas en sangre entre pacientes tratados con esquemas terapéuticos que contenían macrólidos y los que no contenían macrólidos (figura 2) en la totalidad del grupo y en tras excluir los pacientes que recibían tratamiento concomitante con corticoestroides. De igual modo, no observamos diferencias significativas entre pacientes con diagnóstico de EPOC frente a los no EPOC.

Resultados clínicos

En la tabla 3 se muestra la relación entre los días necesarios para alcanzar la estabilidad clínica y la estancia hospitalaria según si el tratamiento recibido contenía o no macrólidos en pacientes con NAC que no responde al tratamiento y en el grupo control NAC.

En el grupo de NAC que no responde al tratamiento, los pacientes que recibieron tratamiento con macrólidos precisaron menos días para alcanzar la estabilidad clínica y tuvieron menor estancia hospitalaria que los pacientes cuyo tratamiento no contenía macrólidos. Al excluir los pacientes con tratamiento concomitante con corticoesteroides, corroboramos los resultados obteniendo en pacientes que recibieron tratamiento con macrólidos, menor estancia media (13±1.5 versus 24±4, p=0.01, respectivamente), y menos días para alcanzar la estabilidad clínica (8±1 versus 16±3, p=0.004, respectivamente). No encontramos diferencias en el grupo control NAC, tampoco al excluir los pacientes con tratamiento esteroideo.

Tabla 1: Características generales, comorbilidad, índice severidad de la neumonía y tratamiento antibiótico en la población a estudio.

	NAC que no responde al tratamiento	*Control NAC*	*Control sin infección*	*p**
Sujetos, n	52	15	19	
Edad, años	61±2	66±4	61±2	NS
Hombre/Mujer	31/21	12/3	16/3	NS
Current smoker, n	16	2	9	NS
Comorbilidad, n				
- Cerebrovascular	11(21)	3(20)	2(10)	NS
-Cardiovascular	12(23)	3(20)	2(10)	NS
-EPOC	7(14)	7(46)	7(37)	0.01
PSI score	98±4	102±7	N/A	NS
PCR (mg/dl)			N/A	
-al ingreso	232±25	190±30		NS
-a la inclusion del estudio	165±18	68±21		0.05
Corticoide inhalado	2(29)	1(14)	0(15)	NS
Corticoide sistémico	2(29)	3(43)	0	NS
Terapia antimicrobiana[β],n			N/A	
-Fluoroquinolona	6(12)	5(33)		
-β-lactam + macrolido	23(44)	9(60)		
-β-lactam + fluoroquinolona	8(15)	0		
-Otros regímenes**	15(28)	1(7)		

Los datos se expresan como media±SEM o n(%). * Test U de Mann-Whitney y Test Chi-cuadrado para variables contínuas y categóricass respectivamente.

NAC: neumonía adquirida en la comunidad; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiv crónica; PSI score: índice severidad de la neumonía; PCR: proteína C reactiva; NS: no significativo. N/A: no aplicable.

[β]: Terapia antimicrobiana a la inclusion del estudio.

Otros regímenes[**]: vancomicina, imipemen-cilastatina, piperacillina-tazobactam, amikacina, clindamicina, ceftazidima, ertapenem y linezolid.

Tabla 2: Características generales, comorbilidad y tratamiento corticoideo en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) que no responde al tratamiento y control NAC clasificados según recibieron régimen antibiótico con o sin macrólido.

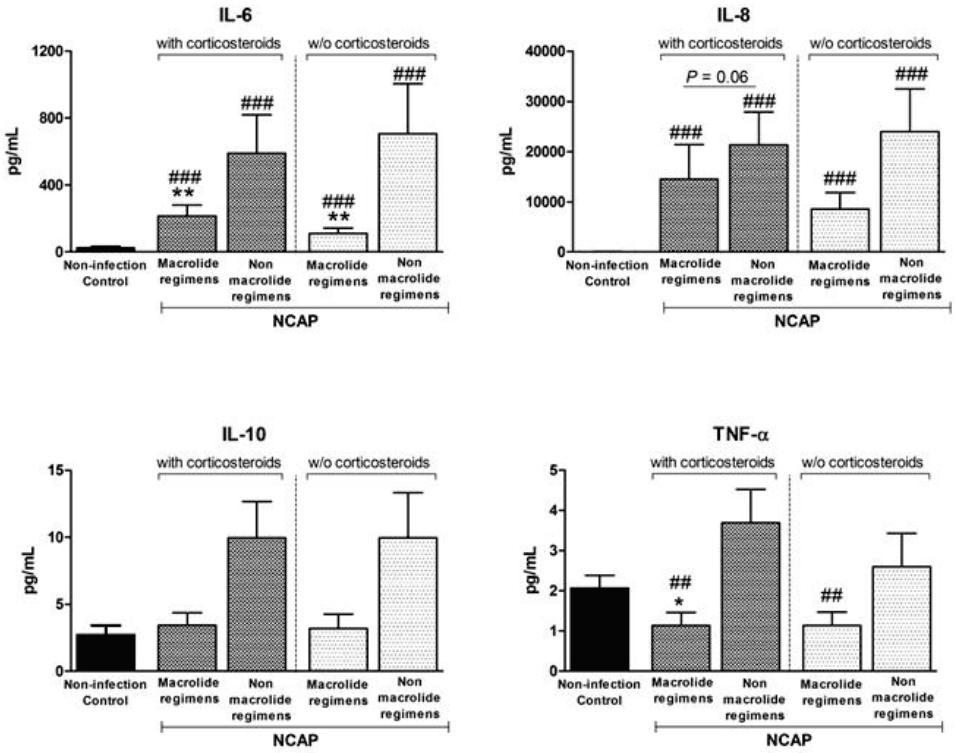
	NAC que no responde al tratamiento			*Control NAC*		
	Regímen con Macrolido$^{\alpha}$	***Regímen sin Macrolido$^{\alpha}$***	***p****	***Regímen con Macrolido$^{\alpha}$***	***Regímen sin Macrolido$^{\alpha}$***	***p****
Sujetos, n	23	29		9	6	
Edad, años	60±4	63±3	NS	78±3	70±9	NS
Hombre/Mujer	12/11	19/10	NS	7/2	5/1	NS
Comorbilidad, n						
-Cerebrovascular	4(17)	7(24)	NS	3(33)	0	NS
-Cardiovascular	4(17)	8(28)	NS	2(22)	1(17)	NS
-EPOC	1(4)	6(21)	NS	3(33)	4(67)	NS
Corticoide inhalado	0	2(7)	NS	1(11)	0	NS
Corticoide sistémico	3(13)	6(21)	NS	4(44)	2(33)	NS

Los datos se expresan como media±SEM o n(%). * Test U de Mann-Whitney y Test Chi-cuadrado para variables contínuas y categóricas respectivamente.EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

$^{\alpha}$Regímen antibiótico con macrólido: beta-lactámico (ceftriaxona, cefotaxima o amoxi-clavulanico + macrolido (azitromicina: 500mg/24h).

$^{\beta}$Regímen antibiótico sin macrólido: fluoroquinolona (levofloxacino: 500mg/12-24h) en monoterapia o beta-lactámico + fluoroquinolona u otros regímenes.

Figura 1: Niveles de citocinas en lavado broncoalveolar (LBA) en pacientes con con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) que no responde al tratamiento clasificados según recibieron régimen antibiótico con o sin macrólido.

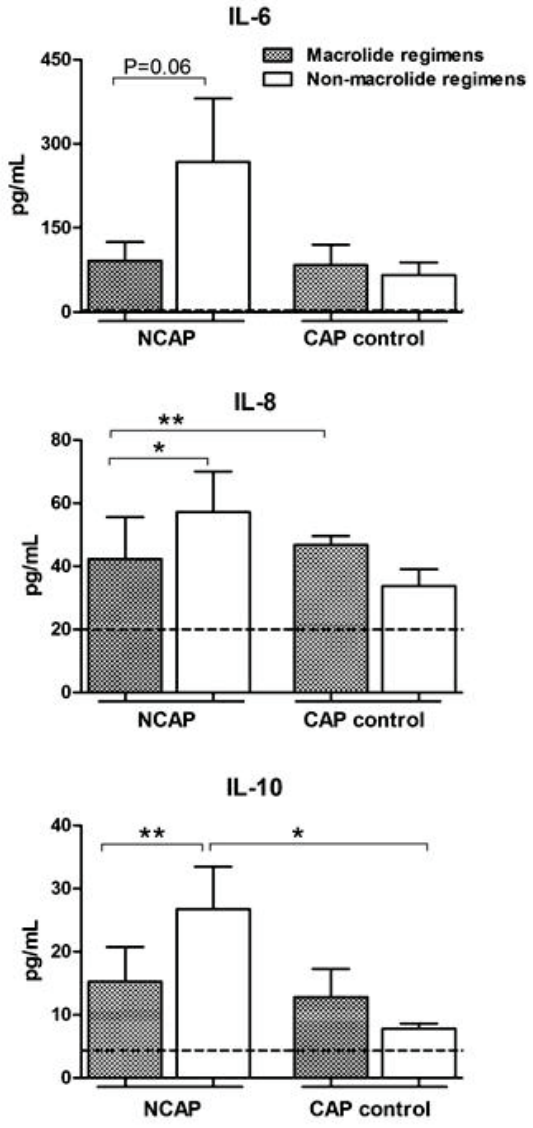


Los datos se expresan como media±SEM.**/* regímenes con macrólido versus regímenes sin macrólidos; ###/## versus control sin infección. Se expresan además los datos excluyendo los pacientes con tratamiento corticoideo.

*: $p<0.05$; **: $p\leq0.01$; ##: $p<0.05$; ###: $p<001$

BAL: lavado broncoalveolar; IL: interleucina; TNF-α: factor de necrosis tumoral-α.

Figura 2: Niveles de citocinas en sangre periférica en pacientes con con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) que no responde al tratamiento y control NAC según recibieron régimen antibiótico con o sin macrólido.



Los datos se expresan como media±SEM. *: $p<0.05$; **: $p\leq0.01$. IL: interleucina. El grupo control sin infección se expresa como línea discontínua.

Tabla 3: Comparación de los resultados clínicos según el regímen antibiótico recibido (con macrólido o sin macrólido) en pacientes con NAC que no responde al tratamiento y en el grupo control NAC.

	Estabilidad clínica (días)	***p#***	***Estancia hospitalaria (días)***	***p#***
NAC que no responde				
-Regímen con macrólido*(n 23)*	8(6-12)	0.007	12(10-21)	0.007
-Regímen sin macrólido*(n 29)*	14(8-27)		20(13-36)	
NAC				
-Regímen con macrólido *(n 9)*	6(3-10)	0.6	9(7-16)	0.8
- Regímen sin macrólido*(n 6)*	6(3-6)		9(8-12)	

Los datos se expresan como mediana y rango intercuartil. *p* # Test U de Mann-Whitney.

NAC: neumonía adquirida en la comunidad

DISCUSIÓN

7-DISCUSIÓN

Los resultados de la presente Tesis Doctoral han permitido ampliar el conocimiento sobre la respuesta inflamatoria tanto a nivel pulmonar como sistémico en la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) que no responde al tratamiento, el papel de la apoptosis del neutrófilo en la resolución de la infección, así como la influencia del esquema terapéutico empleado (conteniendo o no tratamiento con macrólidos) en el perfil inflamatorio local y sistémico y en la estabilización de los parámetros de infección.

ESTUDIO 1

Los hallazgos más importantes del primer estudio son: 1) la apoptosis basal de los neutrófilos en sangre periférica fue significativamente más elevada en el grupo de pacientes con NAC que no responde al tratamiento que en el grupo de NAC con buena respuesta y que en el grupo control; 2) el patrón inflamatorio de citocinas mostró niveles más elevados de IL-6 y de IL-8 en lavado broncoalveolar (LBA), junto con niveles más elevados de IL-6 y de IL-10 en sangre periférica; 3) los pacientes con NAC que no responde al tratamiento con incremento de la apoptosis basal en LBA (≥20%) alcanzaban estabilidad clínica más temprano y presentaban menor estancia hospitalaria; 4) apoptosis basal baja se asociaba con niveles elevados de IL-10 en sangre periférica y una tendencia hacia niveles elevados de IL-8 y de IL-6 en LBA y sangre periférica.

La apoptosis del neutrófilo tras la eliminación del microorganismo se considera esencial para la regulación a la baja de la inflamación. La elevación inicial de las citocinas inflamatorias en la NAC que no responde al tratamiento a las 72 horas se ha asociado con mayor tiempo para alcanzar estabilidad clínica y peores resultados (35,37). Nuestros hallazgos mostraron un incremento de los niveles de citocinas y neutrófilos alveolares lo cual refleja una inflamación mantenida con cierto grado de apoptosis. De hecho, encontramos mayor apoptosis basal de neutrófilos en LBA (12%) que en el estudio de Droemann y colaboradores (24), probablemente porque en dicho estudio se incluyeron pacientes con neumonía en estadios iniciales. Curiosamente, en nuestro trabajo encontramos una apoptosis del neutrófilo en sangre ligeramente elevada reflejando de este modo la continuidad de la infección.

La apoptosis espontánea a las 24 horas estaba más elevada en los controles que en la NAC que no responde al tratamiento como ha sido descrito en otros estudios (59). En pacientes con estabilidad clínica, la apoptosis basal y espontánea del neutrófilo imita el patrón de los controles sin infección. La baja apoptosis basal sistémica en pacientes con NAC representa una fase en la cual los leucocitos están disminuyendo ya que corresponde a la resolución de una infección con citocinas en descenso (IL-6 e IL-10). Estos resultados indican que una cinética de apoptosis diferente es una característica de la NAC que no responde al tratamiento.

La activación de los neutrófilos, así como su apoptosis es necesaria para resolver adecuadamente la inflamación (60). Durante las fases iniciales de la infección, las citocinas pueden intensificar la activación del neutrófilo, particularmente IL-8 y prolongar su vida útil (27). Nosotros hemos confirmado niveles elevados de citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 en LBA tras 72 horas de tratamiento tal y como se esperaba en pacientes con NAC que no responde al tratamiento. Las citocinas inflamatorias predominantes revelaron diferentes patrones en los compartimentos pulmonar y sistémico: elevados niveles de IL-8 en LBA, elevados niveles de IL-10 en sangre y niveles similares de IL-6 en ambos compartimentos. *Schutte* y colaboradores (61) constataron hallazgos similares respecto a IL-8 y a IL-6 en pacientes con neumonía severa. En cuanto a IL-6, observamos correlación positiva entre los niveles en LBA y en sangre, lo cual indica que un proceso inflamatorio originario en el pulmón es continuado en el compartimento sistémico. Por el contrario, los niveles de IL-10 en sangre indican un patrón predominantemente anti-inflamatorio. De hecho, niveles significativamente bajos en sangre de IL-10 y una tendencia hacia niveles bajos de IL-6 se encontraron en pacientes con estabilidad clínica. Tomando estos resultados en conjunto, nos indican una velocidad diferente en la resolución de la inflamación: más lenta en el pulmón que en sangre periférica. Además, encontramos correlación entre la resolución de la inflamación sistémica y la resolución clínica. Es decir, entre niveles sistémicos de IL-.6 y de IL-10 con la estabilidad clínica y la estancia hospitalaria.

La interacción entre los neutrófilos alveolares, citocinas y la adecuada restauración de la homeostásis no se conoce con claridad. Nuestros resultados indican que, cuando la apoptosis era baja en LBA, IL-10 en sangre e IL-8 en LBA estaban en aumento. Esta asociación puede tener varias explicaciones. Primero, una apoptosis reducida puede

reflejar una inflamación en curso con la capacidad potencial de prolongar el daño tisular. Segundo, la carga bacteriana, o los patógenos en sí mismos, pueden alterar la apoptosis evitando así su muerte (27). Tercero, un ambiente cargado de citocinas podría retrasar la apoptosis como se describe en la lesión pulmonar aguda, donde está asociado con una disregulación de la apoptosis (62). El aumento de la apoptosis del neutrófilo sin embargo, se ha asociado con menos daño pulmonar y mortalidad (63). En el modelo animal, la apoptosis localizada se encontró que era una característica de la resolución de la neumonía (64). La relevancia clínica de la apoptosis alveolar fue probada en el análisis de la resolución de los parámetros de infección. En nuestro estudio encontramos que una elevada apoptosis alveolar se asociaba significativamente con una rápida estabilidad clínica y menor estancia hospitalaria. Una similar correlación significativa (en NAC que no responde y NAC) se encontró entre los niveles sistémicos de citocinas, estabilidad clínica y estancia hospitalaria.

ESTUDIO 2

En el segundo estudio, los hallazgos más importantes son:1) Los niveles de IL-6 y de TNF-α en LBA y de IL-8 e IL-10 en sangre periférica fueron significativamente más bajos en pacientes con NAC que no responde al tratamiento que recibieron el esquema antibiótico que contenía macrólido, que en aquellos tratados con el esquema antibiótico sin macrólido; y 2) se observaron mejores resultados clínicos respecto a los días necesarios para alcanzar la estabilidad clínica y menor estancia hospitalaria en aquellos pacientes que recibieron tratamiento antibiótico con macrólido.

En nuestro estudio, los pacientes que no alcanzaron la estabilidad clínica a las 72 horas de iniciado el tratamiento antibiótico, desarrollaron un aumento de los niveles de citocinas inflamatorias tanto a nivel pulmonar como a nivel sistémico, siguiendo un patrón similar al descrito en estudios previos, en los que se observa niveles elevados persistentes de IL-6, IL-8 e IL-10 en LBA o en sangre en pacientes con neumonía severa y NAC que no responde, reflejando un proceso de inflamación mantenida (33,35,65,66).

Curiosamente, los pacientes con NAC que no responde tratados con esquemas terapéuticos que contenían macrólidos mostraron una tendencia hacia niveles más bajos de IL-8 en LBA y significativamente más bajos para IL-6 y TNF-α comparado con pacientes tratados con esquemas terapéuticos sin macrólidos. Además, en sangre periférica nuestros resultados también confirman niveles más bajos de IL-6, IL-8 y de IL-10 en pacientes con NAC que no responde tratados con macrólidos, mientras que en aquellos pacientes con NAC que alcanzaron la estabilidad clínica no se detectaron diferencias significativas.

A pesar del reconocido papel de los macrólidos en modular la inflamación (51,58,68), hay pocos estudios en humanos sobre este aspecto (68). En casos de pacientes con NAC, Demartini y colaboradores (69) compararon niveles de citocinas en sangre periférica antes de comenzar el tratamiento antibiótico con claritomicina (500 mg dos veces al dia durante 7 días) y amoxicilina (1 gramo al dia durante 7 dias), a los 3 días y a los 7 días. En los casos con claritromicina los niveles de IL-6 disminuyeron de modo significativo y se incrementaron los niveles de IL-10 al tercer y séptimo días respecto a los niveles basales. En un estudio randomizado de neumonía asociada al ventilador, Spyridaki y colaboradores (70), analizaron el efecto de la claritromicina y placebo sobre las citocinas durante seis días consecutivos. La relación de IL-10 y TNF-α se redujo en el grupo tratado con claritromicina comparado con el grupo placebo. Los resultados sugieren que la administración de claritromicina restauraría el equilibrio entre los mediadores pro y anti-inflamatorios en pacientes con sepsis.

Los macrólidos inhiben las vías de señales intracelulares, suprimen la producción de NF-kB y la síntesis y/o secreción de citocinas proinflamatorias y disminuyen la afluencia y actividad del neutrófilo (67). En modelos animales con neumonía, la reducción de secreción de chemocinas y niveles de citocinas fue demostrado en casos de microorganismos resistentes a macrólidos, sugiriendo que los beneficios eran independientes de la actividad antimicrobiana (71). Otros estudios *in vitro* en modelo animal orientan a que el uso de claritromicina disminuye las lesiones pulmonares asociada al ventilador, reduce el reclutamiento de neutrófilos alveolares y disminuyen la expresión de citocinas (72).

En sepsis severa por NAC, *Restrepo* y colaboradores (45) encontraron que en pacientes que recibieron terapia con macrólidos en comparación con pacientes que no la recibieron, se asociaba con un descenso de la mortalidad a los 30 días (11% vs 29%, p<0,001) y a los 60 días (12% vs 34%, p<0,001) incluso en aquellos casos con patógenos resistentes a macrólidos. Recientemente, *Rodrigo* y colaboradores (73), estudiaron los beneficios de la terapia con beta-lactámicos para el tratamiento de pacientes inmunocompetentes hospitalizados con NAC. Sus resultados mostraron que a los 30 días la tasa de mortalidad era más baja en el grupo de pacientes de terapia combinada con macrólidos que en el grupo de monoterapia (23% vs 27%; OR 0.81, 95% CI 0.72 a 0.93, p=0.001). En neumonía bacteriémica, *Metersky* y colaboradores (74) reportaron que el uso de macrólidos estaba asociado con menor mortalidad hospitalaria, menor mortalidad a los 30 días y menor tasa de reingresos a los 30 días del alta. Curiosamente, el aumento en la supervivencia y la mejora de los resultados en relación con la doble terapia antibiótica, principalmente en NAC severa y neumonía bacteriémica por neumococo se asocia con tratamientos que incluyen macrólidos (75) en lugar de beta-lactámicos más quinolonas (76), debido probablemente al efecto inmunomodulador de los macrólidos.

Otros factores importantes pueden influir en la respuesta inflamatoria en pacientes con NAC, como el tratamiento con corticoides o bien comorbilidades como la EPOC (77). En nuestro estudio, corroboramos nuestros resultados con bajos niveles de IL-6 en LBA y de IL-8 e IL-10 en sangre tras excluir a los pacientes tratados con corticoide.

Nuestros hallazgos son consistentes con estudios previos que mostraban una mejora de resultados clínicos (reducción de los días necesarios para alcanzar la estabilidad clínica y menor estancia hospitalaria) y una reducción de los niveles de citocinas en pacientes con NAC que fueron tratados con esquemas terapéuticos que contenían macrólidos. Estos hallazgos podrían estar relacionados con niveles disminuidos de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-8 y TNF α, y apoyar el valor de los macrólidos por su efecto beneficioso sobre las propiedades inmunomoduladoras.

CONCLUSIONES

8-CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los dos estudios que componen esta Tesis Doctoral han permitido elaborar las siguientes conclusiones:

ESTUDIO 1

1-El patrón inflamatorio con elevación sistémica de IL-6 y de IL-10 y a nivel pulmonar de IL-6 y de IL-8 se asocia con una estabilidad clínica retardada y mayor estancia hospitalaria.

2-La apoptosis basal del neutrófilo elevada se asocia con un menor tiempo para alcanzar la estabilidad clínica y menor estancia hospitalaria, lo que sugiere que la apoptosis del neutrófilo se opone a la inflamación local persistente, contribuyendo a una recuperación más rápida de la homeostasis.

ESTUDIO 2

1-En pacientes con NAC que no responde al tratamiento, tratados con esquema antibiótico que contenía macrólidos, presentaban los niveles de citocinas más bajos en ambos compartimentos (pulmonar y sistémico) que en aquellos pacientes tratados con esquema antibiótico sin macrólidos.

2-El efecto inmunomodulador del tratamiento con macrólidos sobre el perfil de citocinas (pulmonar y sistémico) en el curso del tratamiento en la NAC parece contribuir a la resolución del proceso infeccioso y a alcanzar antes la estabilidad clínica.

CONCLUSIÓN FINAL

Los resultados de los estudios presentados en esta tesis proporcionan información que ha ayudado a ampliar el conocimiento de la expresión inflamatoria local y sistémica en la neumonía que no responde adecuadamente al tratamiento y que continúa siendo responsable de elevado porcentaje de mortalidad. Además, ha contribuido a incrementar

la información sobre la posibilidad del uso de macrólidos como tratamiento adyuvante inmunomodulador en la NAC que colaborarían con las defensas del huésped para modular favorablemente la respuesta inflamatoria y mejorar el pronóstico y reducir la mortalidad de los pacientes con NAC y NAC que no responde al tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

9-BIBLIOGRAFÍA

1. Almirall J, Bolíbar I, Vidal J, Sauca G, Coll P, Niklasson B, Bartolome M, Balanzo X. Epidemiology of community-acquired pneumonia in adults: a population-based study. Eur Respir J 2000; 15:757-763.

2. Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. Thorax 2012; 67:71-79.

3. Kaplan V, Angus DC, Griffin MF, Clermont G, Watson RS, Linde-Zwirble WT. Hospitalised community-acquired pneumonia in the elderly: age and sex related patterns of care and outcome in the United States. Am J Respir Crit Care 2002; 165:766-772.

4. Pachón J, Alcántara J, Cordero E, Lama C, Rivero A. Clinical management of community-acquired pneumonia. Clinical management of community-acquired pneumonia. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21:350-357.

5. Menéndez R, Torres A, Zalacaín R, Aspa J, Martín-Villasclaras JJ, Borderías L, Benítez-Moya JM, Ruiz-Manzano J, de Castro FR, Blanquer J, Pérez D, Puzo C, Sánchez-Gascón F, Gallardo J, Álvarez C, Molinos L. Neumofail Group. Guidelines for the managemnet of Community-acquired Pneumonia: Predictors of Adherence and outcome. Am J Respir Crit Care Med 2005; 172:757-762.

6. Ruiz M, Ewig S, Marcos MA, Martínez JA, González J, Arancibia F, Torres A. Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity and severity. Am J Respir Crit Care Med 1999; 160:397-405.

7. Arancibia F, Ewig S, Martínez JA, Ruiz M, Bauer T, Marcos MA, Mensa J, Torres A. Antimicrobial treatment failures in patients with community-acquired pneumonia: causes and prognostic implications. Am J Respir Crit Care Med 2000; 162:154-160.

8. Menéndez R, Torres A, Zalacaín R, Aspa J, Martín Villasclarsa JJ, Borderías L, Benítez Moya JM, Ruiz-Manzano J, Rodríguez de Castro F,

Blanquer J, Pérez D, Puzo C, Sánchez Gascón F, Gallardo J, Alvarez C, Molinos L. Neumofail Group. Risk factors of treatment failure in community-acquired pneumonia: implications for disease outcome. Thorax 2004; 59:960-965.

9. Celis MR, Torres A, Zalacaín R, Aspa J, Blanquer J, Blanquer R, Gallardo J, España PP; Grupo de trabajo del área TIR para el estudio del diagnóstico y tratamiento de la NAC en España (NACE). Neumonía Adquirida en la Comunidad en España. Med Clin (Barc) 2002; 119:321-326.

10. Rosón B, Carratalá J, Fernández-Sabé N, Tubau F, Manresa F, Gudiol F. Causes and factors associated with early failure in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. Arch Intern Med 2004; 164:502-508.

11. Menéndez R, Torres A. Treatment failure in community-acquired pneumonia. Chest 2007; 132:1348-1355.

12. Chalmers JD, Singanayagam A, Hill AT. Predicting the need for mechanical ventilation and/or inotropic support for young adults admitted to the hospital with community-acquired pneumonia. Clin Infect Dis 2008; 47:1571-1574.

13. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM Jr, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG; Infectious Diseases Society of America; American Thoracic Society. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. Clin Infect Dis. 2007; 44 Suppl 2:S27-72.

14. Menéndez R, Torres A, Rodríguez de Castro F, Zalacaín R, Aspa J, Martín Villasclaras JJ, Borderías L, Benítez Moya JM, Ruiz-Manzano J, Blanquer J, Pérez D, Puzo C, Sánchez-Gascón F, Gallardo J, Alvarez CJ, Molinos L; Neumofail Group. Reaching stability in community-acquired pneumonia: the effects of the severity of disease, treatment, and the characteristics of patients. Clin Infect Dis. 2004; 39:1783-1790.

15. Menéndez R, Torres A, Aspa J, Capelastegui A, Prat C, Rodríguez de Castro F; Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Community acquired pneumonia. New guidelines of the Spanish Society of Chest Diseases and Thoracic Surgery (SEPAR). Arch Bronconeumol 2010; 46:543-558.

16. Technical recommendtions and guidelines for bronchoalveolar lavage. Report of the European Society of Pneumology TAsk Group. Eur Respir J 1989; 2:561-585.

17. Nicod LP: Lung defences: an overview. Eur Respir Rev 2005; 95:45-50.

18. Strieter RM, Lukacs NW, Standiford TJ, Kunkel SL. Cytokines. 2. Cytokines and lung inflammation: mechanisms of neutrophil recruitment to the lung. Thorax. 1993; 48:765-769.

19. Martin TR, Frevert CW. Innate Immunity in the lungs. Proc Am Thorac Soc 2005; 2:403-411.

20. Mizgerd JP. Molecular mechanisms of neutrophil recruitment elicited by bacteria in the lungs. Semin Immunol 2002; 14:123-132.

21. Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. Pharmacol Rev 2000; 52:349-374.

22. Wang Q, Doerschuk CM, Mizgerd JP. Neutrophils in innate immunity. Semin Respir Crit Care Med 2004; 25:33-41.

23. Luster AD. Chemokines-Chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 1998; 338:436-445.

24. Droemann D, Aries SP, Hansen F, Moellers M, Braun J, Katus HA, Dalhoff K. Decreased apoptosis and increased activation of alveolar neutrophils in bacterial pneumonia. Chest 2000; 117:1679-1684.

25. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ 2nd. Lung infections: role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. Chest. 2000; 117:1771-1777.

26. Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. Immunol Res. 2009; 43:25-61.

27. De Leo FR. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. Apoptosis. 2004; 9:399-413.

28. Cowburn AS, Condliffe AM, Farahi N, Summers C, Chilvers ER. Advances in neutrophil biology: clinical implications. Chest 2008; 134:606-612.

29. Yao-Ling L, Eei C, Ling-Yun C, Chia-Hung C, Yu-Chao L, Shinn-Jye L, Chuen-Ming S. Systemic and bronchoalveolar cytokines as predictors of in-hospital mortality in severe community-acquired pneumonia. J Crit Care 2010; 25:176.e7-176.e13.

30. Rendon A, Rendon-Ramírez EJ, Rosas-Taraco AG. Relevant cytokines in the management of community-acquired pneumonia. Curr Infect Dis Rep 2016, 18:10.

31. Menéndez R, Cavalcanti M, Reyes S, Mensa J, Martinez R, Marcos MA, Filella X, Niederman M, Torres A. Markers of treatment failure in hospitalised community acquired pneumonia. Thorax. 2008; 63:447-452.

32. Fernández-Serrano S, Dorca J, Coromines M, Carratalà J, Gudiol F, Manresa F. Molecular inflammatory responses measured in blood of patients with severe community-acquired pneumonia. Clin Diagn Lab Immunol. 2003; 10:813-820.

33. Ioanas M, Ferrer M, Cavalcanti M, Ferrer R, Ewig S, Filella X, de la Bellacasa JP, Torres A. Causes and predictors of nonresponse to treatment of intensive care unit-acquired pneumonia. Crit Care Med. 2004; 32:938-945.

34. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. Crit Care Med 2000; 28(4 Suppl):N3-12.

35. Kellum JA, Kong L, Fink MP, Weissfeld LA, Yealy DM, Pinsky MR, Fine J, Krichevsky A, Delude RL, Angus DC; Understanding the inflammatory

cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. GenIMS Investigators. Arch Intern Med. 2007; 167:1655-1663.

36. Martínez R, Menéndez R, Reyes S, Polverino E, Cillóniz C, Martínez A, Esquinas C, Filella X, Ramírez P, Torres A. Factors associated with inflammatory cytokine patterns in community-acquired pneumonia. Eur Respir J 2011; 37:393-399.

37. Menéndez R, Martínez R, Reyes S, Mensa J, Polverino E, Filella X, Esquinas C, Martínez A, Ramírez P, Torres A. Stability in community-acquired pneumonia: one step forward with markers?. Thorax 2009; 64:987-992.

38. Antunes G, Evans SA, Lordan JL, Frew AJ. Systemic cytokine levels in community-acquired pneumonia and their association with disease severity. Eur Respir J. 2002; 20:990-995.

39. Lopez B, Maisonet TM, Londhe VA. Alveolar NF-κβ signaling regulates endotoxin-induced lung inflammation. Experimental Lung Research 2015; 41:103-114.

40. Liao Y, Song H, Xu D, Jiao H, Yao F, Liu J, Wu Y, Zhong S, Yin H, Liu S, Wang X, Guo W, Sun B, Han B, Chin YE, Deng J. Gprc5a-deficiency confers susceptibility to endotoxin-induced acute lung injury via NF-κB pathway. Cell Cycle. 2015; 14:1403-12.

41. Danesi R, Lupetti A, Barbara C, Ghelardi E, Chella A, Malizia T, Senesi S, Angeletti CA, Del Tacca M, Campa M. Comparative distribution of azithromycin in lung tissue of patients given oral daily doses of 500 and 1000 mg. J Antimicrob Chemother. 2003; 51:939-945.

42. Pérez-Trallero E, García-de-la-Fuente C, García-Rey C, Baquero F, Aguilar L, Dal-Ré R, García-de-Lomas J; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory

pathogenic bacteria in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49:1965-1972.

43. Lim WS, Baudouin SV, George RC, Hill AT, Jamieson C, Le Jeune I, Macfarlane JT, Read RC, Roberts HJ, Levy ML, Wani M, Woodhead MA; Pneumonia Guidelines Committee of the BTS Standards of Care Committee. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009.Thorax. 2009; 64 Suppl 3:iii1-55.

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

45. Restrepo MI, Mortensen EM, Waterer GW, Wunderink RG, Coalson JJ, Anzueto A. Impact of macrolide therapy on mortality for patients with severe sepsis due to pneumonia. Eur Respir J. 2009; 33:153-159.

46. Martin-Loeches I, Lisboa T, Rodriguez A, Putensen C, Annane D, Garnacho-Montero J, Restrepo MI, Rello J. Combination antibiotic therapy with macrolides improves survival in intubated patients with community-acquired pneumonia. Intensive Care Med. 2010; 36:612-620.

47. Asadi L, Sligl WI, Eurich DT, Colmers IN, Tjosvold L, Marrie TJ, Majumdar SR. Macrolide-based regimens and mortality in hospitalized patients with community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis. 2012; 55:371-380.

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

49. Sevilla-Sánchez D, Soy-Muner D, Soler-Porcar N. Usefulness of macrolides as anti-inflammatories in respiratory diseases. Arch Bronconeumol 2010; 46:244-254.

50. Wilms EB, Touw DJ, Heijerman HG. Pharmacokinetics of azithromycin in plasma, blood, polymorphonuclear neutrophils and sputum during long-term therapy in patients with cystic fibrosis. Ther Drug Monit. 2006; 28:219-225.

51. Culić O, Eraković V, Parnham MJ. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics 2001;429:209-229.

52. Friedlander AL, Albert RK. Chronic macrolide therapy in inflammatory airways diseases. Chest 2010;138:1202-1212.

53. Ishimatsu Y, Kadota J, Iwashita T, Nagata T, Ishii H, Shikuwa C, Kaida H, Mukae H, Kohno S. Macrolide antibiotics induce apoptosis of human peripheral lymphocytes in vitro. Int J Antimicrob Agents 2004; 24:247-253.

54. Hodge S, Hodge G, Brozyna S, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN. Azithromycin increases phagocytosis of apoptotic bronchial epithelial cells by alveolar macrophages. Eur Respir J 2006; 28:486-495.

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

56. Gillis RJ, Iglewski BH. Azithromycin retards Pseudomonas aeruginosa biofilm formation. J Clin Microbiol. 2004; 42:5842-5845.

57. Gillis RJ, White KG, Choi KH, Wagner VE, Schweizer HP, Iglewski BH. Molecular basis of azithromycin-resistant Pseudomonas aeruginosa biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:3858-3867.

58. Meijvis SC, van de Garde EM, Rijkers GT, Bos WJ. Treatment with anti-inflammatory drugs in community-acquired pneumonia. J Intern Med 2012; 272:25-35.

59. Pletz MW, Ioanas M, de Roux A, Burkhardt O, Lode H. Reduced spontaneous apoptosis in peripheral blood neutrophils during exarcerbation of COPD. Eur Respir J 2004; 23:532-537.

60. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chun-Shiang C, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. J Leukoc Biol 2005; 78:325-337.

61. Schütte H, Lohmeyer J, Rosseau S, Ziegler S, Siebert C, Kielisch H, Pralle H, Grimminger F, Morr H, Seeger W. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. Eur Respir J 1996; 9:1858-1867.

62. Chopra M, Reuben JS, Sharma AC. Acute lung injury: apoptosis and signalling mechanisms. Exp Biol Med 2009; 234:361-371.

63. Sookhai S, Wang JJ, McCourt M, Kirwan W, Bouchier-Hayes D, Redmon P. A novel therapeuic strategy for attenuating neutrophil-mediated lung injury in vivo. Ann Surg 2002; 235:285-291.

64. Kazzaz JA, Horowitz S, Xu J, Khullar P, Niederman MS, Fein AM, Zakeri Z, Lin L, Rhodes GC. Differential patterns of apoptosis in resolving and nonresolving bacterial pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161:2043-2050.

65. Montón C, Torres A, El-Ebiary M, Filella X, Xaubet A, Puig de la Bellacas J. Cytokine expression in severe pneumonia: A bronchoalveolar lavage study. Crit Care Med 1999; 27:1745-1753.

66. Paats MS, Bergen IM, Hanselaar WE, Van Zoolen CG, Hoogsteden HC, Hendriks RW, van der Eerden MM. Local and systemic cytokine profiles in nonsevere and severe community-acquired pneumonia. Eur Respir J 2013; 41:1378-1385.

67. Corrales-Medina VF, Musher DM. Immunomodulatory agents in the treatment of community-acquired pneumonia: A systematic review. J Infect 2011; 63:187-199.

68. Kovaleva A, Remmelts HH, Rijkers GT, Hoepelman AI, Biesma DH, Oosterheert JJ. Immunomodulatory effects of macrolides during community-acquired pneumonia: a literature review. J Antimicrob Chemothe 2012; 67:530-540.

69. Demartini G, Esposti D, Marthyn P, Lapidari A, Fraschini F, Scaglione F. Effect of multiple doses of clarithromycin and amoxicilin on IL-6, IFN gamma and IL-10 plasma levels in patients with community-acquired peumonia. J Chemother 2004; 16:82-85.

70. Spyridaki A, Raftogiannis M, Antonopoulou A, Tsaganos, Routsi C, Baziaka F, Karagianni V, Mouktaroudi M, Koutoukas P, Pelekanou A, Kotanidou A, Orfanos SE, van der Meer JW, Netea MG, Giamarellos-Bourboulis EJ. Effect of clarithromycin in inflammatory markers of patients with ventilator-associated pneumonia and sepsis caused by gram-negative bacteria: results from a randomized clinical study. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56:3819-3825.

71. Nakamura S, Yanagihara K, Araki N, Yamada K, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Kamihira S, Kohno S. Efficacy of clarithromycin against experimentally induced pneumonia caused by clarithromycin-resistant Haemophilus influenzae in mice. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:757–762.

72. Amado-Rodríguez L, González-López A, López-Alonso I, Aguirre A, Astudillo A, Batalla-Solís E, Blazquez-Prieto J, García-Prieto E, Albaiceta GM. Anti-inflammatory effects of clarithromycin in ventilator-induced lung injury. Respir Res 2013; 14:52.

73. Rodrigo C, Mckeever TM, Woodhead M, Lim WS, On behalf of the British Throracic Society. Single versus combination antibiotic therapy in adults hosptalized with community-acquired pneumonia. Thorax 2013; 68:493-495.

74. Metersky ML, Ma A, Houck PM, Bratzler DW. Antibiotics for bacteremic pneumonia: improve outcomes with macrolides but not fluorquinolones. Chest 2007; 131:466-473.

75. Waterer GW, Rello J, Wunderink RG. Management of community-acquired pneumonia in adults. Am J Respir Crit Care Med 2011; 183:157-164.

76. Mortensen EM, Restrepo MI, Anzueto A, Pugh J. The impact of empiric antimicrobial therapy with ß-lactam and fluoroquinolone on mortality for patients hospitalized with severe pneumonia. Crit Care Med 2005; 10:R8.

77. Crisafulli E, Menéndez R, Huerta A, Martínez R, Montull B, Clini E, Torres A. Systemic inflammatory pattern of patients with community-acquired pneumonia with and without COPD. Chest 2013; 143:1009-1017.