

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA

**Estudi experimental del paper del factor activador de les
plaquetes en la meningitis i la pneumònia pneumocòciques**

Memòria presentada per M^a Carmen Cabellos Mínguez per a
optar al grau de Doctora en Medicina i Cirurgia



INDEX

1. PRESENTACIO	1
2. FONAMENTS DE LA TESI	6
2.1 Característiques generals i estructura de <i>S. pneumoniae</i>	7
2.1.1 Introducció històrica	8
2.1.2 Morfologia i identificació	9
2.1.3 Anàlisi estructural	12
2.2 Fisiopatologia de la infecció pneumocòcica ..	20
2.2.1 Meningitis pneumocòcica	21
2.2.2 Pneumònia pneumocòcica	31
2.3 Factor activador de les plaquetes	34
2.3.1 Introducció històrica	34
2.3.2 Estructura química i característiques del factor activador de les plaquetes .	36
2.3.3 Activitat biològica del factor activador de les plaquetes	40
3. OBJECTIUS	54
4. MATERIAL I METODES	57
4.1 Disseny del projecte	58
4.2 Factor activador de les plaquetes	61
4.2.1 Factor activador de les plaquetes. Preparació, dosi i vies d'administració ..	61
4.2.2 Antagonista del factor activador de les plaquetes. Preparació, dosi i vies d'administració	62

4.3	Components bacterians	63
4.3.1	Soques utilitzades	63
4.3.2	Paret cel.lular de <i>S. pneumoniae</i> . Preparació, dosi i vies d'administració ..	64
4.3.3	Acid lipoteicoic pneumocòcic. Preparació, dosi i vies d'administració	66
4.4	Anticossos	70
4.4.1	Anticòs monoclonal IB4	70
4.4.2	Anticòs TEPC-15	70
4.5	Models animals de meningitis i pneumònia	71
4.5.1	Animals	71
4.5.2	Model animal de meningitis	71
4.5.3	Processament de les mostres	74
4.5.4	Model animal de pneumònia	76
4.5.5	Processament de les mostres	78
4.6	Assaigs <i>in vitro</i>	80
4.6.1	Inducció d'agregació plaquetar	80
4.6.2	Inducció de degranulació de neutròfils	80
4.7	Anàlisi estadística	81
5.	RESULTATS	82
5.1	Activitat inflamatòria del factor activador de les plaquetes a l'espai subaracnoïdal	83
5.1.1	Inoculació intracisternal del factor activador de les plaquetes	83

5.1.2	Modulació de la resposta inflamatòria per l'administració conjunta de factor activador de les plaquetes i l'antagonista del factor activador de les plaquetes	85
5.2	Activitat inflamatòria del factor activador de les plaquetes al pulmó	95
5.2.1	Inoculació intratraqueal del factor activador de les plaquetes	95
5.2.2	Modulació per l'administració simultània del factor activador de les plaquetes	95
5.3	Paper del factor activador de les plaquetes a la inflamació pneumococica. Model de meningitis	98
5.3.1	Inoculació intracisternal de <i>S. pneumoniae</i>	98
5.3.2	Modulació de l'activitat inflamatòria per l'administració conjunta de <i>S.pneumoniae</i> i l'antagonista del factor activador de les plaquetes	99
5.3.3	Inoculació intracisternal de <i>S. pneumoniae</i> i <i>H. influenzae</i> vius i modulació per l'antagonista del factor activador de les plaquetes	100
5.4	Paper del factor activador de les plaquetes a la inflamació pneumocòcica. Model de pneumònia	109
5.4.1	Inoculació intratraqueal de <i>S. pneumoniae</i>	109
5.4.2	Modulació de l'activitat inflamatòria per l'administració conjunta de <i>S.pneumoniae</i> i l'antagonista del factor activador de les plaquetes	109
5.4.3	Modulació de l'activitat inflamatòria per l'administració conjunta de <i>S.pneumoniae</i> i l'anticòs IB4	110

5.4.4	Modulació de l'activitat inflamatòria de <i>S. pneumoniae</i> per l'administració simultània de l'antagonista del factor activador de les plaquetes i l'anticòs IB4	111
5.5	Neutralització creuada de la inflamació produïda pel factor activador de les plaquetes i la paret cel·lular pneumocòcica, per mitjà d'anticossos anti-paret i l'antagonista del factor activador de les plaquetes	113
5.5.1	Administració intracisternal de paret cel·lular pneumocòcica	113
5.5.2	Modulació de l'activitat inflamatòria de la paret cel·lular pneumocòcica per l'anticòs TEPC-15	114
5.5.3	Modulació de l'activitat inflamatòria generada per la paret cel·lular pneumocòcica, per l'antagonista del factor activador de les plaquetes	114
5.5.4	Administració intracisternal de l'àcid lipoteicoic	115
5.5.5	Modulació de la inflamació provocada per l'àcid lipoteicoic pneumocòcic per l'antagonista del factor activador de les plaquetes	116
5.5.6	Modulació de l'activitat inflamatòria generada per el factor activador de les plaquetes per l'anticòs TEPC-15	116
5.6	Assaig <i>in vitro</i>	129
5.6.1	Inducció d'agregació plaquetar	129
5.6.2	Inducció de degranulació de neutròfils	130

6. DISCUSSIO

6.1	Activitat inflamatòria del factor activador de les plaquetes	136
-----	--	-----

6.2	Paper del factor activador de les plaquetes en la meningitis i la pneumònia pneumocòciques	139
6.3	Reactivitat creuada entre la paret cel.lular i el factor activador de les plaquetes	142
7.	CONCLUSIONS	148
8.	BIBLIOGRAFIA	152

1. PRESENTACIO

1. PRESENTACIO.

La meningitis pneumocòcica, per les seves especials característiques de gravetat, i les dificultats terapèutiques que comporta, ha estat sempre especial objecte d'estudi al Servei de Malalties Infeccioses de l'Hospital de Bellvitge.

Personalment, he tingut l'oportunitat i el privilegi durant la meva formació com a especialista, d'aprendre al costat de grans mestres en aquest tema, com el Dr. P. Fernàndez Viladrich.

Avui en dia, les meningitis bacterianes continuen essent un problema greu. El nostre país, té una situació d'endèmia respecte a la malaltia meningocòcica, sempre dramàtica per la seva rapidesa, tanmateix la mortalitat d'aquesta està situada al voltant del 5 %. La meningitis pneumocòcica, que és la segona en freqüència en adults al nostre país, presenta encara una mortalitat més alta, al voltant del 30 %, malgrat els adequats tractaments antibiòtics. Aquest problema és actualment objecte d'estudi per part de molts grups i s'està intentant arribar a una comprensió de tots els mecanismes de la malaltia en termes moleculars, per tal de trobar les claus que permetin millorar el tractament actual i reduir la mortalitat.

Els avenços en aquest terreny, es fan sobre models animals de meningitis experimental, i el Servei de Malalties Infeccioses, com a continuació lògica del seu treball clínic i terapèutic anterior, s'ha iniciat recentment en els estudis sobre fisiopatologia de la meningitis pneumocòcica. Gràcies a la iniciativa del Dr. F. Gudiol vaig tenir l'oportunitat de desplaçar-me al Laboratori de Microbiologia de la Universitat Rockefeller (Nova York, EEUU), per tal d'aprendre els models de meningitis experimental en conills, i realitzar alguns d'aquests projectes, com aquest estudi sobre el paper del factor activador de les plaquetes en la meningitis pneumocòcica, que intenta apuntar un detall més en el complicat entramat de la activitat inflamatòria en el curs de la meningitis pneumocòcica. També s'han fet alguns experiments amb un model de pneumònia per comparar el paper del factor activador de les plaquetes en altres localitzacions de malaltia pneumocòcica.

Creiem que els resultats d'aquest treball aporten dades noves a la literatura mèdica que podriem resumir en: la demostració de la capacitat inflamatòria del factor activador de les plaquetes a l'espai subaracnoïdal i el seu significat biològic, ja que l'antagonista del factor activador de les plaquetes és capaç de disminuir l'activitat inflamatòria generada pel propi pneumococ a l'espai subaracnoïdal. També s'intenta discutir les

diferències trobades entre la meningitis i la pneumònia, i apuntar noves hipòtesis sobre la extraordinària capacitat inflamatòria de *S. pneumoniae*, algunes de les quals s'estan investigant actualment.

Finalment vull manifestar el meu agraïment a totes les persones que, d'una manera o d'una altra, m'han ajudat en l'elaboració d'aquest treball:

La Dra Elaine I. Tuomanen, Professora associada del Laboratori de Microbiologia de la Universitat Rockefeller, que va guiar aquest projecte, i els meus companys allà, especialment les Dres Margaret H. Burroughs, Kirsi Saukkonen i Christine Cioffe, que em van ajudar amb la seva amistat i la seva inestimable col.laboració en la realització del projecte. També la Dra Rosario Muñoz, amb qui vaig compartir "l'aventura americana".

Els directors d'aquest treball, el Prof. F. Fernández Nogués, cap del Servei de Medicina Interna, i el Dr. Román Pallarés que més que director, ha estat un amic de qui he abusat constantment.

El Dr. Pedro F. Viladrich, que m'ha ensenyat el que sé sobre meningitis bacterianes, tanmateix només una petita part de tot el que ell sap. El Dr. Francesc Gudiol, cap del

Servei de Malalties Infeccioses, home de brillants idees, com la d'enviar-me a "l'emigració". Quan vaig marxar no sabia si era una bona idea; ara la hi agraeixo profundament. Els Drs. Xavier Ariza i Gabriel Rufí, mestres que m'han ensenyat l'ofici, i amics sempre. Tota la resta de companys del Servei de Malalties Infeccioses, Daniel Podzamczar, Carme Peña, Jordi Carratalà, Ferran Bolao, Juan Corredoira, Jordi Mascaró, Miguel Santín i Miquel Pujol, i els meus companys de residència, Joan MV. Pons i Francesca Mitjavila. Tots els membres del Servei de Medicina Interna, que m'han ensenyat tantes coses.

També vull expressar el meu agraïment a tots els membres del Servei de Microbiologia de l'hospital, que em van iniciar en el treball de laboratori, especialment al Dr. Rogelio Martín i la Dra Josefina Liñares, i a tants companys d'altres serveis i de tantes guàrdies, que no puc esmentar aquí.

Agraeixo al "Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social" la concessió de la beca d'ampliació d'estudis 90/987, que m'ha permés en part realitzar aquest treball.

Finalment a tots aquells que m'han donat el seu suport i la seva amistat durant aquest temps.

2. FONAMENTS

2. FONAMENTS

2.1 Característiques generals i estructura de *S. pneumoniae*

S. pneumoniae és un patogen àmpliament distribuït per tot el món. Es pot trobar en la flora orofaríngea d'un 10 a un 60% de la població sana en qualsevol moment (1), i és causa molt freqüent de malaltia ja sigui pneumònia, meningitis, otitis, sinusitis, etc, tant en la població prèviament sana com en la immunodeprimida.

S. pneumoniae ha acompanyat l'home al llarg de la història. El descobriment de la penicil·lina va suposar un canvi radical i malalties fins aleshores mortals es van transformar en malalties que es podien curar. Malgrat això, les infeccions pneumocòciques continuen essent potencialment molt greus per les característiques de la seva fisiopatologia, i per l'aparició, en els últims anys, de soques resistents als antimicrobians als que els pneumococs eren tradicionalment sensibles, fet que ha complicat el seu tractament (2,3).

L'estudi de les característiques i propietats biològiques de *S. pneumoniae* i la seva relació amb les manifestacions clíniques de la malaltia, han contribuït a alguns dels descobriments més importants de les ciències biomèdiques.

2.1.1 Introducció històrica.

La primera descripció d'un microorganisme que podria correspondre a *S. pneumoniae* va ser feta per Klebs l'any 1875 (4) en examinar exudats de pulmons de malalts morts de pneumònia. Klebs va arribar a fer créixer el microorganisme en albúmina d'ou, però no va poder identificar-lo completament.

El pneumococ va ser aïllat per Pasteur l'any 1881 en la saliva d'un malalt i per Sternberg en la seva pròpia saliva el mateix any.

La relació entre el pneumococ i la pneumònia lobar va ser descrita inicialment per Friedlander i Talamon al 1883, i posteriorment per Frankel i Weichselbaum al 1884 i 1886 respectivament.

Neufeld, un altre investigador important en la història del pneumococ, va descobrir l'any 1910 que els antisèrums conferien immunitat tipus-específica en ratolins, i això va constituir el fonament pel tractament de la pneumònia amb sèrums anti-tipus-específic.

Entre 1915 i 1945 es va avançar en el coneixement de l'estructura química i la capacitat antigènica de l'antigen capsular pneumocòcic i la seva relació amb la virulència.

Aquests estudis, realitzats en gran part al laboratori del Dr. Avery a l'Institut Rockefeller, van representar les primeres demostracions del paper immunològic dels polisacàrids bacterians en la malaltia humana. Fruit de molts d'aquests treballs va ser el desenvolupament, entre 1944 i 1945 , per McLeod i altres col.laboradors, d'una vacuna de polisacàrids polivalent per la pneumònia pneumocòcica.

A més a més d'aquests estudis immunobioquímics, el treball de McCarty, McLeod i Avery durant molts anys a l'Institut Rockefeller, va portar el 1944 a identificar l'àcid desoxirribonucleic com el "principi transformador", és a dir, el principi responsable de la transformació genètica dels pneumococs, establint per primera vegada que l'àcid desoxirribonucleic era el suport del còdi genètic (5). Aquest descobriment constitueix probablement el fruit més important d'aquesta "col.laboració" entre l'home i el pneumococ.

2.1.2 Morfologia i identificació.

Com està ben descrit als llibres de text, els pneumococs són cocs Gram positius, ovals o esfèrics de 1.2 a 1.8 μm de diàmetre major i 0.5-1.0 μm de diàmetre menor. Típicament tenen forma lanceolada, estan recoberts per una càpsula polisacàrida i es presenten en parelles. No són

mòbils i no formen espores. (6)

Degut a l'associació en parelles, van ser denominats inicialment *Diplococcus pneumoniae* per Weichselbaum, però també poden formar cadenes curtes i això va portar a Sternberg a afirmar que "de fet, és un estreptococ" (7). Altres similituds, com el seu metabolisme, l'estructura antigènica, la possibilitat de transformació genètica i l'homologia dels àcids nucleics, han portat a confirmar la seva classificació en el gènere *Streptococcus*, i *Streptococcus pneumoniae* és el nom específic amb que apareix al Manual Bergey (8). En aquest treball farem servir indistintament *S. pneumoniae* i el nom més familiar de pneumococ.

Els pneumococs tenen un creixement pobre en medis de cultiu ordinaris i necessiten medis enriquits amb sang, sèrum o glucosa. Creix bé entre 25° C i 42° C, però la temperatura òptima són 37° C. El pH òptim per al seu creixement està entre 7.4 i 7.8. Requereix colina per a créixer en medis definits, i té també necessitat de 4 vitamines B, de 7 a 10 aminoàcids i d'adenina, guanina i uracil.

Després d'incubades en agar sang o agar xocolata durant 18 hores, les colònies són petites, circulars i elevades, amb superfície llisa i brillant de 0.5-1 mm de

diàmetre. Després de 48 hores, la zona central de la colònia es col.lapsa per autolisi i les colònies presenten aspecte umbilicat. Després de 72 hores, tota la colònia es lisa i només queda una depressió sobre l'agar. En agar sang, les colònies estan envoltades d'un halo verdós (alfa hemòlisi).

Actualment, per diferenciar els pneumococs dels altres estreptococs, es fan servir diverses proves, com la lisi per bilis o sals biliars, la sensibilitat a l'optoquina, la reacció de quellung i la incorporació de colina.

La bilis i les sals biliars provoquen la dissolució de la cèl.lula, ja que activen l'amidasa del pneumococ, que és una enzima autolítica que trenca unions internes dels peptidoglicans de la paret cel.lular. Hi ha algunes soques, però, que no es comporten així i és una prova en desús.

El procediment que s'utilitza amb més freqüència als laboratoris clínics per identificar els pneumococs és la prova de sensibilitat al disc d'optoquina. Es col.loquen discs de paper impregnats amb 5 μ g o 1:400 d'optoquina sobre la superfície de l'agar on s'ha sembrat prèviament un cultiu pur de microorganismes; l'optoquina inhibeix el creixement del pneumococ, però no el d'altres estreptococs i, així, si el cultiu és de pneumococs, apareix un halo d'inhibició.

La prova de quellung va ser descrita per Neufeld el 1902, pot proporcionar una identificació ràpida dels pneumococs en diverses mostres clíniques incloent líquid cefalorraquidi, esput o cultius en medi líquid. Es barregen una suspensió de bacteries, sèrums antipneumocòcics i blau de metilè a la superfície d'un porta i s'examina. Es considera positiva quan es veu una càpsula ampla. Aquesta prova es pot fer servir tant per identificar aïllats quan es fa servir un sèrum polivalent (Omni-sèrum, produït per l'Statens Seruminstitut, Copenhage), com per serotípia quan es fan servir sèrums monovalents contra els 84 serotipus existents.

Actualment, el desenvolupament de la biologia molecular està portant a posar a punt noves tècniques d'identificació, com sondes genètiques d'autolisina etc. (9,10).

2.1.3 Anàlisi estructural.

Els pneumococs presenten l'estructura característica de les bacteries gram positives. Estan envoltats d'una càpsula polisacàrida que ha estat àmpliament estudiada en tots els seus aspectes. Més internament està situada la paret cel.lular que, en els darrers anys, ha estat assenyalada com a part important en la patogènia de les malalties produïdes pel pneumococ, com es veurà més

endavant en aquest treball, i la membrana plasmàtica, també important en la fisiologia de l'organisme.

Càpsula

La càpsula del pneumococ està formada per polisacàrids complexos, que formen gels hidrofílics a la superfície del microorganisme. Aquests polisacàrids capsulars són antigènics, i aquest fet és la base per a la separació dels pneumococs en els diferents serotipus coneguts. No es coneix amb detall l'estructura química de tots els serotipus, i és diferent entre ells. Pot demostrar-se la presència de polisacàrids capsulars per aglutinació, precipitació, i per la reacció de quellung. També es poden detectar per contraimmuno- electroforesi a la sang, al líquid cefalorraquidi o a l'orina.

La virulència dels pneumococs està relacionada amb la presència de càpsula. Els pneumococs encapsulats, anomenats S, de l'anglès "smooth", llis, per la textura llisa de les colònies que forma, en contrast amb les colònies rugoses dels pneumococs no encapsulats o R, de l'anglès "rough", rugós, són virulents per a l'home i l'animal d'experimentació, mentre que els no encapsulats no ho són. Els pneumococs poden perdre la càpsula per mutació espontània.

Els pneumococs no encapsulats són captats i destruïts per les cèl.lules fagocítiques molt més fàcilment que els pneumococs encapsulats, i això explica la diferència en la capacitat de produir malaltia.

Existeixen reaccions creuades entre els polisacàrids capsulars de diferents serotipus, els d'altres bacteries, inclosos bacils gram negatius, i els isoantígens del grup sanguini ABO.

Actualment existeix una vacuna polivalent, basada en els polisacàrids capsulars, per als 23 serotipus més freqüents.

Paret cel.lular

El pneumococ té una paret cel.lular típica de les bacteries gram positives. Es una macromolècula complexa composta de dos polímers principals: mureïna, també anomenat peptidoglicà, glicopéptid o mucopéptid, i àcid teicoic, una estructura especialment complexa, que conté fosforilcolina.

La paret cel.lular té un gruix de 140-160 nm, és a dir, que si s'admet el model estructural de polímers de mureïna, aquest gruix pot estar format per 6 o 8 capes paral.leles de mureïna (11). Les mureïnes representen el 60

‡ de la paret cel.lular i són molècules de gran tamany, que mantenen la forma de les bactèries i les defensen dels canvis de pressió osmòtica. Tenen dos components bàsics: N-acetil glucosamina, i àcid N-acetil muràmic. Es pot considerar la mureïna com una molècula única, gegant i rígida on s'enllacen transversalment les molècules polisacàrides per mitjà d'enllaços peptídics. A les bactèries gram positives, aquests enllaços es fan en dos plans diferents que donen lloc a una capa tridimensional de mureïna molt gruixuda.

Els àcids teicoics són polímers lineals compostats per grups alternants de ribitol i fosfat, on els dos extrems del ribitol s'uneixen als grups fosfat per mitjà d'enllaços ester. L'àcid teicoic fa de resina d'intercanvi iònic i facilita el transport de soluts a través de la cèl.lula. També té un paper antigènic. L'àcid teicoic conté el determinant antigènic conegut com a substància C o polisacàrid C, que sembla correspondre a un residu de N-acetilgalactosamina fosfat. Convé recordar que polisacàrid C és un terme immunològic, mentre que àcid teicoic és refereix a una entitat definida bioquímicament.

Algunes característiques dels àcids teicoics pneumocòccics són úniques, com la presència de fosforilcolina com a component estructural, ja que aquest és l'únic cas conegut a la natura en què residus de colina

formen part d'un polisacàrid, i la colina és un requeriment nutricional per als pneumococs.

Si la colina del medi de cultiu és canviat per un altre aminoalcohol, com ara etanolamina, els pneumococs creixen i sintetitzen àcid teicoic i parets cel.lulars, però la seva fisiologia està alterada. Alguns trets d'aquests pneumococs alterats són la incapacitat per desenvolupar transformació genètica, la resistència a la infecció per diferents fagos, la resistència a la lisi, i la formació de cadenes, que representa la incapacitat de les cèl.lules de separar-se al final de la divisió. Totes aquestes anomalies poden explicar-se per defectes en el sistema autolític de la bacteria, ja que són resistents a l'acció de l' autolisina pneumocòcica. Sembla que la interacció entre els residus de colina de l'àcid teicoic i l'enzima és un requisit previ per la hidròlisi, i que la colina actuaria com a regulador intern de l'estructura de la paret (12-14).

Moltes persones tenen anticossos anti-fosforilcolina i s'ha demostrat que aquests protegeixen contra la sepsis en ratolins (15-18) si bé, hi ha algun estudi que no confirma aquesta protecció en l'home (19). Malgrat que s'ha demostrat que diferents components de la paret cel.lular són inflamatoris, els fragments que contenen àcid teicoic són els que tenen més capacitat inflamatòria i són capaços

d'activar la via alternativa del complement *in vitro* (20). Són també capaços de produir leucocitosi i augment de permeabilitat vascular en models de meningitis i pneumònia (21-24) i poden induir la secreció d'Interleuquina 1 a partir dels macròfags a concentracions 100 vegades menors que les endotoxines (25). Totes aquestes dades suggereixen que l'àcid teicoic i l'àcid lipoteicoic, del que parlarem més endavant, tenen una extraordinària capacitat inflamatoria.

Membrana plasmàtica

La membrana plasmàtica es troba a la cara interna de la paret cel·lular i, com la resta de membranes biològiques, presenta el model de mosaic segons el qual les proteïnes estan englobades a la matriu fosfolipídica. Té una bicapa lipídica de 75 nm. La membrana plasmàtica forma invaginacions al llarg de la seva superfície, anomenades mesosomes, aquestes invaginacions poden formar també invaginacions secundàries, terciàries, plecs, etc que donen lloc a una estructura molt complexa.

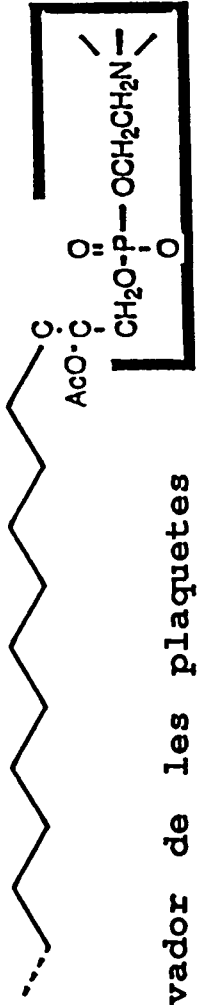
A la membrana plasmàtica es troben localitzades proteïnes que tenen un paper important com a enzims, com l'autolisina, endonucleases, proteïnes activadores i inhibidores, i les proteïnes fixadores de penicil·lina (més conegudes per les inicials del seu nom en anglès PBPs)

imprescindibles perquè la penicil·lina pugui actuar contra els pneumococs i que, si estan alterades, són responsables de la resistència del pneumococ a aquest antibiòtic.

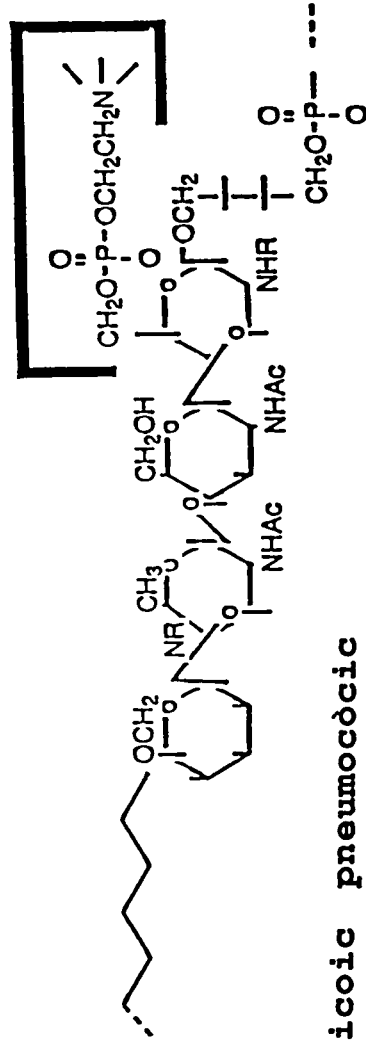
Un altre component important que es troba a la membrana plasmàtica és l'àcid lipoteicoic, també conegut com a antigen de Forssman o antigen F.(26-31). Aquesta molècula sembla estar composta per àcid teicoic, de composició química i estructura similar a la de l'àcid teicoic de la paret cel·lular, però unit de forma covalent a un material lipídic. D'un 15 a un 20 % de la colina de l'envoltura cel·lular està a l'antigen de Forssman, mentre que la resta està a l'àcid teicoic de la paret.

L'antigen de Forssman és un inhibidor potent i altament específic de l'autolisina i s'ha suggerit que la regulació de l'activitat de la hidrolasa de mureïna és una important funció fisiològica de l'antigen de Forssman, així com d'altres àcids teicoics que contenen lípids (32).

Examinant l'estructura química de l'àcid teicoic i lipoteicoic pneumocòcic existeix una semblança amb el factor activador de les plaquetes, com es pot veure a la figura adjunta. El factor activador de les plaquetes és un mediador de la inflamació que descriurem més endavant. Aquesta semblança és en part motiu del present treball.



Factor Activador de les plaquetes



Acid lipoteicoic pneumocòcic

Estructura química del factor activador de les plaquetes i de l'àcid lipoteicoic pneumocòcic. L'estructura emmarcada correspon a la fosforilcolina.

2.2 Fisiopatologia de la infecció pneumocòcica.

Els pneumococs són patògens molt importants per l'home, tant per la freqüència, com per la gravetat de la malaltia que produeixen i per tant la morbiditat i mortalitat que ocasionen.

Un tret característic de la infecció pneumocòcica és la gran activitat inflamatòria que desencadena, en qualsevol localització.

Els pneumococs poden produir inflamació perquè resisteixen la fagocitosi i poden envair els teixits i multiplicar-se a l'interior. Aquesta resistència a la fagocitosi els ve donada per la càpsula, la qual també interfereix amb l'activitat bactericida de la via clàssica del complement. L'acció d'enzims i toxines sembla ser poc important en la patogènia de la malaltia pneumocòcica i sembla més aviat que la paret cel·lular té un paper en aquesta patogènia, ja sigui en la infecció meningia, pulmonar, òtica etc.(22-24,33)

Des de la nasofaringe, on pot trobar-se habitualment en un 10-60 % de la població sana, pot causar infecció de vies respiratòries superiors, bé sigui otitis, sinusitis o conjuntivitis. Per microaspiracions es pot produir la infecció de vies respiratòries inferiors, amb embolització

bronquial de secrecions infectades. Després, els microorganismes es multipliquen ràpidament als alvèols i es va extenent la infecció, acompanyada d'una gran reacció inflamatòria. Els leucòcits i posteriorment els macròfags inicien el procés de fagocitosi, ajudats per l'aparició d'anticossos, primer al pulmó i després a la circulació general. Quan es poden detectar anticossos específics, comença generalment la recuperació de la malaltia. Els pneumococs poden arribar per contigüitat a la pleura i al pericardi i ocasionar allà també malaltia i, si els mecanismes defensius fracassen, a través dels ganglis limfàtics hiliars pot arribar a la sang, i així ocasionar infecció metastàsica a les meninges, les articulacions, el peritoni o l'endocardi com a localitzacions més freqüents. La bacterièmia es detecta aproximadament en un 25 % de casos, si bé pot donar-se de forma transitòria en molts més casos. La infecció distant del pulmó, i fins i tot sense pneumònia, pot donar-se també a través dels limfàtics cervicals directament a la circulació sanguínia i donar lloc a meningitis o endocarditis sense focus clar. (34,35)

2.2.1 Meningitis pneumocòcica.

Inici de la infecció a l'espai meningi.

Els pneumococs s'adhereixen a receptors de superfície de la nasofaringe, i poden envair la mucosa i arribar al

torrent circulatori. La seva presència , especialment de la paret cel.lular i del polisacàrid capsular, desencadena alguns mecanismes defensius , com la via alternativa del complement, que facilita la quimiotaxi, l'opsonització i, en definitiva, la fagocitosi. Al mateix temps, la pròpia càpsula impideix l'acció fagocítica dels neutròfils i l'activitat desencadenada per la via clàssica del complement, establint-se, com en la majoria dels casos d'infecció bacteriana, una autèntica "batalla", responsable en part de la clínica de la malaltia.

Com ja s'ha comentat anteriorment, a través de la sang els pneumococs arriben a l'espai meningi. Aquest és el mecanisme que ocasiona les meningitis secundàries a pneumònia, 20 % dels casos, o sense focus aparent, on hem d'assumir que hi ha hagut bacterièmia. En altres casos l'arribada a l'espai meningi és per contigüitat, o a través dels drenatges venosos, com les secundàries a otitis mitja aguda (30 % dels casos), sinusitis (5 % dels casos) o fístula pericranial, per fractura o cirurgia (30 % dels casos) (36-39). En qualsevol cas, un cop la infecció meníngia està establerta pot també ser font de bacterièmia persistent i resembra (40).

Es desconegut com els pneumococs travessen la barrera hematoencefàlica intacta. Es possible que existeixin receptors bacterians específics a l'endoteli dels plexes

coroïdals o dels capil.lars cerebrals que permetin l'adhesió i penetració de les bactèries. En models animals s'ha demostrat la presència de receptors per la paret cel.lular del pneumococ, a l'espai subaracnoïdal i al teixit cerebral adjacent (41).

Un cop els pneumococs han arribat a l'espai subaracnoïdal, els mecanismes de defensa de l'hoste són ineficaços per controlar la infecció, ja que aquest espai constitueix un terreny autènticament immunodeprimit. El LCR normal té quantitats mínimes o inexistentes de complement i d'immunoglobulines. Després de la infecció es troben quantitats lleugerament més altes, però tanmateix baixes (42,43). Aquest dèficit és important perquè els anticossos específics i l'opsonització són imprescindibles per a realitzar una fagocitosi eficaç dels microorganismes encapsulats, com ara els pneumococs (41,44-46).

A l'espai meningi, les bactèries, no controlades per aquesta manca de mecanismes defensius, es multipliquen de forma logarítmica durant les primeres 24 hores. El temps de generació bacterià és aproximadament d'una hora i a les 24 hores el número de bactèries arriba a ser de 10^7 ufc/ml i pot demostrar-se el seu pas cap als sins venosos i a la circulació sistèmica (44).

No es coneix quin és el mecanisme que permet el pas

del neutròfils a través de la barrera hematoencefàlica. Aquesta arribada de neutròfils es produeix aproximadament a les 12 hores de la infecció. El LCR infectat és quimiotàctic per als neutròfils (47,48), principalment per mitjà de les proteïnes inflammatòries del macròfag (MIP-1 i MIP-2), i el factor C5a del complement. Aquest últim també augmentaria l'adhesió dels neutròfils a les cèl.lules endotelials. També s'ha demostrat en models experimentals de meningitis pneumocòcica, que la pleocitosi pot evitar-se utilitzant anticossos monoclonals contra receptors endotelials (49).

No està clar quin paper juga la pleocitosi del LCR infectat, ja que pot tenir efectes beneficiosos i d'altres clarament nocius. La neutropènia s'ha associat amb una mortalitat més alta, tant en models animals experimentals com en l'experiència clínica, si bé hi ha estudis contradictoris d'aquestes dades (50,51). Els leucòcits tenen, en qualsevol cas, molta importància en la generació de la resposta inflammatòria que acompanya la infecció, i aquesta disminueix amb la utilització d'anticossos monoclonals que eviten la seva entrada al LCR. La resposta inflammatòria és en gran part responsable del mal que causa la meningitis pneumocòcica i, per tant, els leucòcits tindrien més efectes nocius que beneficiosos.

Inflamació de l'espai meningi.

Els models animals de meningitis experimental han permès, en part, estudiar la fisiopatologia de la meningitis pneumocòcica, si bé queden encara molts interrogants i cada pas que es coneix obre noves preguntes. La meningitis pneumocòcica té com a característica el desencadenament d'una gran i exagerada reacció inflamatòria que és en part responsable de l'elevada morbiditat i mortalitat que es produeix en aquesta infecció, malgrat l'ús correcte d'antibiòtics.

S'han identificat components bacterians específics, que són molt actius biològicament i que són responsables de l'inici de la cascada inflamatòria que genera la presència dels pneumococs a l'espai subaracnoïdal. Malgrat que els patògens meningis clàssics són tots encapsulats, s'ha demostrat que els polisacàrids capsulars pneumocòcics no són inflamatoris i sí ho són els fragments de paret cel.lular que contenen àcid teicoic (21). Usant el model de meningitis pneumocòcica experimental en conills, es va demostrar que l'administració intracisternal de soques encapsulades mortes per calor o aïllats de polisacàrids capsulars pneumocòcics no produïen canvis inflamatoris al LCR, mentre que l'administració de soques encapsulades i no encapsulades, la de soques no encapsulades mortes per calor i la de paret cel.lular pneumocòcica si produïen canvis

inflamatoris al LCR (23). També s'ha demostrat que es genera activitat inflamatòria amb la inoculació intracisternal dels fragments de la paret cel.lular pneumocòcica que contenen àcid teicoic (21). El fet que els antibiòtics més útils i més freqüentment usats en el tractament de la meningitis pneumocòcica, que són antibiòtics betalactàmics, tinguin un efecte bacteriolític, és a dir produeixin la destrucció de la bacteria i l'alliberament de multitud de peces de paret cel.lular, pot ser un factor que multipliqui i amplifiqui la resposta inflamatòria generada i pot explicar per què alguns malalts amb meningitis pneumocòcica moren amb la infecció controlada (52-55).

No es coneix de forma exacta els mecanismes pels quals la paret cel.lular pneumocòcica provoca inflamació al SNC, si bé sembla que el camí pot ser l'estímul de la producció de citoquines, com ara interleuquina-1, factor de necrosi tumoral o prostaglandines, a través de l'activació de la via alternativa del complement, la interacció amb els macròfags, les plaquetes, i l'endoteli vascular. (56-61). Aquestes citoquines, com a mediadores de la inflamació, promouen la leucocitosi, l'alteració de la barrera hematoencefàlica que permet l'acúmul de proteïnes etc, amb les seves conseqüències d'edema cerebral, augment de la pressió intracranial, alteracions de la circulació cerebral i, finalment, alteració del metabolisme i mal neuronal.

(62,63,41). La cronologia exacta dels fets, i tots els passos i mediadors implicats en aquest procés no es coneixen encara, si bé estan essent objecte de molts estudis en models animals.

Alteracions de la barrera hematoencefàlica.

La barrera hematoencefàlica separa el LCR i el cervell del compartiment intravascular i actua com a interfase reguladora. Les seves funcions inclouen el transport actiu, la difusió facilitada, la secreció d'aigua que permetrà formar LCR i, com a més important, el manteniment de l'homeostasi dins del sistema nerviós central.

Els principals components de la barrera hematoencefàlica són la membrana aracnoïdal, l'epiteli dels plexes coroïdals i les cèl.lules endotelials microvasculars cerebrals. La meningitis bacteriana augmenta la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica per a diverses substàncies com proteïnes, hexoses i ions. L'augment de permeabilitat en la meningitis bacteriana té lloc a nivell de l'epiteli dels plexes coroïdals, l'endoteli microvascular cerebral o ambdós (41).

Usant models animals s'ha demostrat que l'augment de permeabilitat es correlaciona amb un augment precoç i mantingut de la formació de vesícules pinocítiques així com

un augment progressiu en la separació de les primes unions intercel·lulars de l'endoteli vascular cerebral. Aquest augment de la permeabilitat, estudiat amb la inoculació intracisternal de soques encapsulades i no encapsulades de *H. influenzae*, es va demostrar tant en animals neutropènics com no neutropènics.

També la inoculació intracisternal de citoquines com interleuquina-1 produeix alteracions a la barrera hematoencefàlica, mentre que la inoculació de factor de necrosi tumoral sol no augmenta la permeabilitat, i si ho fa combinat amb dosis de interleuquina-1 que per si soles no són suficients per a provocar l'apertura de la barrera (41).

Edema cerebral i augment de la pressió intracranial.

L'edema cerebral que acompanya la meningitis pneumocòcica pot ser d'origen vasogènic, citotòxic o intersticial. L'edema cerebral vasogènic, és conseqüència de l'augment de permeabilitat de la barrera hematoencefàlica. L'edema cerebral citotòxic pot ser secundari a l'alliberament de factors tòxics per part dels neutròfils i possiblement també del pneumococ. Les membranes cel·lulars de les cèl·lules nervioses s'alteren i es produeix un augment en el contingut d'aigua, la pèrdua de potassi, l'augment en el consum de glucosa i la

producció de lactat. També es produeix un augment en la concentració d'hormona antidiurètica que contribueix a facilitar l'entrada d'aigua al parènquima cerebral (64).

La meningitis bacteriana produeix també canvis en els vasos que travessen l'espai subaracnoïdal produint vasculitis amb estretament dels vasos i formació de trombus, i amb la possibilitat que aparegui isquèmia. Les complicacions neurològiques greus poden ser conseqüència de l'afectació d'artèries de la base o de la presència de vasoespasmes per l'elaboració de factors humorals al LCR.

L'augment de la pressió intracranial que acompanya la meningitis pneumocòcica és producte d'una combinació de factors i pot, en ocasions, ser el fet que posa en perill la vida.

La pressió intracranial és el resultat de la suma del volum cerebral total, el volum sanguini intracranial i el volum del LCR. L'augment és conseqüència del procés inflamatori. En models de meningitis experimental s'ha vist que la pressió intracranial augmenta precoçment després de la inoculació de bactèries o fragments de paret cel·lular, però no se'n coneix el mecanisme. Pot ser que els leucòcits hi tinguin algun paper; en qualsevol cas, sembla que no depèn exclusivament de l'edema cerebral, ja que l'administració de metilprednisolona o d'indometacina poden

reduir l'edema cerebral en la meningitis experimental, mentre que no modifiquen la pressió intracranial. L'administració de dexametasona actua sobre ambdós. (45,53,65-68).

Les alteracions del flux sanguini cerebral consisteixen en canvis en la circulació que provoquen hipoxèmia regional: hi ha àrees corticals hipoperfundides mentre el tronc cerebral pot estar hiperperfós (69). La reducció en el flux sanguini s'ha relacionat amb l'augment en la presència de lactat al LCR, l'augment en la utilització de la glucosa, i també la disminució de la pressió arterial sistèmica. En el model de meningitis pneumocòcica en conills s'ha vist una pèrdua en la capacitat d'autorregulació del flux sanguini cerebral, passant a dependre exclusivament de la pressió arterial (70).

El coneixement complet de la fisiopatologia de la meningitis pneumocòcica està encara lluny. Es, però, un coneixement imprescindible per a poder actuar adequadament intentant reduir la mortalitat. Sabem que hi ha una reacció inflamatòria molt important i que aquesta interacció entre el pneumococ i l'hoste és responsable del mal neurològic i, en definitiva, de la mortalitat. El coneixement detallat dels mecanismes fisiopatològics ha de portar al descobriment dels tractaments coadjuvants adequats,

antiinflamatoris, anticossos monoclonals, bloquejants de diverses substàncies etc, que, junt amb els antibiòtics, aconseguixin reduir la mortalitat i morbiditat que la meningitis pneumocòcica encara ocasiona. Els múltiples estudis fisiopatològics, usant els models animals de meningitis pneumocòcica experimental, poden portar, a més a més, a que es coneguin tots els mecanismes de la malaltia fins al nivell molecular.

2.2.2 Pneumònia pneumocòcica.

Molts microorganismes penetren en les vies respiratòries baixes de tothom, cada dia. El fet de que es produeixi o no pneumònia, depèn de la quantitat d'inòcul, de la seva virulència i de les defenses de l'hoste.

Quan una quantitat prou gran de pneumococs prou virulents ha arribat als alvèols, i es produeix pneumònia, els alvèols s'omplen de líquid provinent dels capilars, que es va extenent cap en fora pels porus de Kohn i les vies aèries petites, fins a omplir els alvèols contigus. Així els pneumococs van passant a les àrees contigües fins que es troba una barrera anatòmica. La interacció dels pneumococs amb les opsonines del sèrum i el complement a l'exudat alveolar genera factors quimiotàctics, que estimulen l'arribada de neutròfils a l'alvèol. Aquestes cèl.lules fagocítiques, i els hematies que surten dels

capilars trencats, contribueixen a formar la consolidació. Els neutròfils no fagociten d'una manera eficaç en medi líquid, però sí ho fan contra una superfície com la paret alveolar o immobilitzats enmig de la consolidació. Sense tractament antibiòtic, aquesta resposta inflamatòria és capaç de contenir la progressió de la infecció en molts casos.

En aquesta localització, el tractament antibiòtic només fa que la balança es decanti a favor de l'hoste, i els mecanismes defensius curin. Finalment, els macròfags emigren als alvèols consolidats i fagociten tots els restes deixats enrera mentre la infecció aguda es resolia.

Usant models en conills de pneumonitis experimental, s'ha estudiat quins components de la superfície del pneumococ provoquen la resposta inflamatòria (24). Els conills eren inoculats intratraquealment amb pneumococs vius, polisacàrid capsular, paret cel.lular purificada, i components de la paret cel.lular, i es quantificava la presència de leucòcits i la concentració de proteïnes al rentat broncoalveolar, durant les primeres 24 hores. Les preparacions de paret cel.lular purificada eren les que tenien una capacitat específica més alta per provocar reacció inflamatòria, amb una resposta ràpida i dosi depenent. La membrana plasmàtica i els components citoplasmàtics van resultar practicament incapaços de

generar resposta inflamatòria. La càpsula, malgrat ser important com a obstacle per l'opsonització i l'eliminació dels pneumococs del pulmó (71), no ha demostrat tenir un paper com a generadora d'exudat inflamatori, altres estudis també han demostrat que la càpsula és un activador molt debil del complement i no reacciona bé amb la proteïna C reactiva (72,73). Estudis realitzats *in vitro* (20,74,18) confirmen que la paret cel.lular és un potent activador de la via alternativa del complement, i que es capaç d'unir-se a la proteïna C reactiva.

L'activació del complement és un dels mecanismes responsables de la quimiotaxi. S'ha demostrat que el complement reacciona amb els pneumococs en el pulmó *in vivo* (75) i te un paper important en l'eliminació dels pneumococs del pulmó (76,77).

També en altres models animals s'ha estudiat la resposta inflamatòria. La instillació de pneumococs vius en pulmons de ratolins causa una resposta inflamatòria que inclou l'aparició de leucòcits circulants i proteïnes als alvèols. El número de leucòcits que apareixen en el líquid del rentat durant les primeres 4 hores es correlaciona directament amb el número de bacteries de l'inòcul (78,79). En aquest mateix model, s'ha demostrat que el nombre de leucòcits que apareixen al líquid de rentat de ratolins deficients en complement, després de la inoculació

intratraqueal de pneumococs vius, és més petit, comparat amb els de ratolins normals, però tot i això hi són presents. En el model en conills es van obtenir resultats similars amb la inoculació amb parets cel.lulars, i s'ha suggerit que a més a més del complement, hi ha altres vies d'estimular la quimiotaxi a les fases primerenques, com la via de l'àcid araquidònic (24).

2.3 Factor activador de les plaquetes.

2.3.1 Perspectiva històrica.

El factor activador de les plaquetes és un fosfolípid, biològicament molt actiu, amb un ampli espectre de cèl.lules que el produeixen, de cèl.lules sobre les que exerceix acció i de respostes que és capaç de desencadenar (80,81).

Al 1971, Henson (82) va proposar la hipotesi, per primera vegada, que hi havia un "mediador de fase líquida" entre els leucòcits i les plaquetes que era produït pels leucòcits de conills immunològicament sensibilitzats. Aquest mediador activava les plaquetes de manera que aquestes segregaven amines vasoactives.

Posteriorment dos grups d'investigadors, Sirgianian i Osler (83) i Benveniste, Henson i Cochrane (84) van

confirmar, independentment, aquesta observació. L'últim grup també va proposar el nom de factor activador de les plaquetes i es van iniciar investigacions per identificar bioquímicament aquest mediador. Les primeres observacions van portar a pensar que es tractava d'un lípid, però no va ser fins el 1979 que el grup de Demopoulos i Hanahan va realitzar la síntesi d'una alquil acetil glicerofosfocolina que reproduïa exactament les accions biològiques del material produït de forma natural (85), i poc després, Benveniste i col.laboradors (86) van trobar una via semisintètica alternativa per arribar al mateix compost. Al mateix temps Snyder (87) i col.laboradors van publicar una via per sintetitzar l'acetil glicerol eter fosforilcolina, que ells consideraven que era un agent hipotensor que estaven estudiant al seu laboratori. Uns 9 mesos després el grup de Demopoulos i Hanahan va trobar l'estructura química del factor activador de les plaquetes generat de forma natural pels basòfils de conill (88).

Aquestes diverses vies per arribar a conèixer l'estructura química del factor activador de les plaquetes ha donat lloc al fet que es conegui amb diferents noms, com ara factor activador de les plaquetes (platelet activating factor en anglès, llengua en què van ser publicats tots aquests estudis, PAF, paf) acetil glicerol eter fosforilcolina (AGEPC) etc.

A partir d'aquests estudis realitzats pels grups de San Antonio, Oak Ridge i París sobre la bioquímica i biologia d'aquest compost, va començar un espectacular interès per estudiar totes les accions biològiques i les possibles implicacions en la patogènia de diverses malalties o processos patològics que, avui dia, és encara incomplet. Tanmateix el nombre creixent d'àrees i processos en què sembla jugar un paper, manté aquest interès.

2.3.2 Estructura química i característiques del factor activador de les plaquetes.

L'estructura química del factor activador de les plaquetes es mostra a la Figura 2.1.

El factor activador de les plaquetes és una substància única per diverses raons: representa el primer exemple conegut de fosfoglicèrid actiu biològicament. Posseeix un residu O-alquil-eter a la posició *sn*-1. A la posició *sn*-2 hi ha una cadena curta acil o acetil. A la posició *sn*-3, en tots els factors activadors de les plaquetes produïts de forma natural hi ha un grup O-fosfocolina (89).

S'ha demostrat que el derivat 1-O-alquil-substituit és 300 vegades més actiu que l'anàleg derivat acil-substituit (88). Les variacions en la posició *sn*-2 i en la longitud de la cadena tenen molta influència en l'activitat biològica.

Oda i col.laboradors (90) van trobar dos tipus químics diferents de factor activador de les plaquetes: 1-O-hexadecil 2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina, que és l'estructura més potent produïda de forma natural, i 1-O-octadecil 2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina. En la majoria de cèl.lules, la molècula hexadecil-substituida sembla ser la que es produeix de forma dominant.

El factor activador de les plaquetes es produeix després de l'activació de diversos tipus de cèl.lules. La síntesi d'aquest potent mediador es pot fer per dues vies enzimàtiques diferents. Una, l'anomenada de remodelació, consisteix en una modificació estructural d'un lípid de membrana que es troba en grans concentracions a les cèl.lules fagocítiques, l' 1-alkil-2-acil-sn-glicerol-3-fosfocolina, reemplaçant el grup acil per un grup acetat (91). Aquesta està considerada la via més important i és catalitzada per l'enzim acetil-CoA:1-O-alkil-2-liso-glicero-3-fosfocolina acetil transferasa. La via alternativa implica la conversió d'un O-alkil-2-acetil-glicerol anàleg del factor activador de les plaquetes amb una sèrie de reaccions d'acetilació, defosforilació i addició de fosfocolina (80).

Una qüestió que no està encara aclarida és què passa un cop el factor activador de les plaquetes és sintetitzat. S'ha demostrat que un cop les cèl.lules són estimulades i

el factor activador de les plaquetes és sintetitzat se n'allibera una quantitat molt petita, si bé la seva gran potència fa que siguin efectives per cèl.lules i teixits. En experiments amb cultius de cèl.lules endotelials humanes s'ha demostrat que un cop estimulades amb histamina, bradiquinina o ATP es forma factor activador de les plaquetes en un període de 45 minuts, mentre que la prostaciclina per exemple es produïa només en 7.5 minuts després de l'estimulació amb els mateixos agents, però la prostaciclina era alliberada totalment, mentre que el factor activador de les plaquetes restava unit a les cèl.lules (92). S'ha proposat la idea que, potser, la funció del factor activador de les plaquetes pot ser important en interaccions cèl.lula-cèl.lula (93).

Moltes de les cèl.lules que poden sintetitzar el factor activador de les plaquetes poden també respondre a ell suggerint que pot tenir també accions autocrines i/o paracrines. La retenció de quantitats importants de la substància dins de les cèl.lules, afavoreix aquesta hipòtesi. S'ha especulat també sobre la seva possible participació en un cicle de l'alquil fosfatidil colina que és important en la remodelació de la membrana durant l'activació de la cèl.lula i sobre els seus possibles efectes en l'estructura i funció de la membrana, incloent fusió de membranes etc.

El factor activador de les plaquetes no existeix com a tal emmagatzemat a les cèl.lules, sinó més aviat hi és present com un producte en forma de reserva, dins de les cèl.lules, que passa ràpidament a ser sintetitzat sota l'estímul adequat. Sembla ser particularment important com a estímul perquè s'alliberin d'altres mediadors i pot, per tant, actuar com a amplificador de les respostes (94).

El factor activador de les plaquetes és un mediador. Els mediadors es defineixen com molècules de comunicació que deriven d'un tipus cel.lular (o en alguns casos de proteïnes del plasma) que actuen en un altre tipus cel.lular per mitjà de receptors específics. La durada de la seva vida és intermèdia entre la llarga durada de la vida de les hormones i la curta durada i l'actuació "local" dels neurotransmissors, encara que algunes molècules i les seves accions constitueixen un contínuum i se sap que alguns neuropèptids tenen activitat de mediador, i alguns mediadors, el factor activador de les plaquetes entre ells, poden tenir accions neuromoduladores. Per a limitar l'acció dels mediadors, ha d'existir un control efectiu o uns processos d'eliminació en els teixits. Això pot ser per disminució espontània, metabolització per enzims plasmàtics o dels teixits, captació i eliminació (i/o metabolisme) per cèl.lules properes i potser dilució a la sang amb posterior captació o metabolisme pel ronyó o el fetge. Les cèl.lules diana han de tenir receptors específics pels mediadors,

limitant l'esfera d'influència del mediador a les cèl.lules que tenen aquests receptors, i les respostes al mediador queden limitades a les respostes que aquestes cèl.lules són capaces de realitzar. Totes aquestes condicions es donen al factor activador de les plaquetes (95).

El factor activador de les plaquetes es metabolitza ràpidament als teixits per mitjà d'una fosfolipasa, l'acetil hidrolasa, que es troba al plasma i a moltes cèl.lules (96). El grup acetil de la posició sn 2 és separat, donant lloc a liso-factor activador de les plaquetes, que és inactiu biològicament. Aquest liso-factor activador de les plaquetes és, tanmateix, no tan sols el producte del seu metabolisme sino també un precursor, ja que pot ser acetilat de nou a les cèl.lules per una acetil transferasa per generar factor activador de les plaquetes. De fet, aquest és un camí normal de formació de factor activador de les plaquetes: primer es genera liso-factor activador de les plaquetes a partir de alquil acil fosforilcolina seguit per acetilació (95).

2.3.3 Activitat biològica del factor activador de les plaquetes.

El factor activador de les plaquetes va ser descobert per primera vegada com un producte dels basòfils immunològicament sensibilitzats, però més tard s'ha trobat

com a producte d'una gran varietat de cèl.lules inflammatòries, com els neutròfils, monòcits, macròfags, i les plaquetes, així com de les cèl.lules endotelials (93,97-100), després d'un estímul adequat d'activació. També se sap que hi ha producció del factor activador de les plaquetes per les cèl.lules epidèrmiques, i és possible que segons s'avança en el coneixement d'aquest mediador, augmenti el número de tipus cel.lulars que se sap li poden donar origen.

S'ha demostrat que el factor activador de les plaquetes actua *in vitro* en un gran nombre de cèl.lules, fins i tot en algunes de les que li donen origen. La llarga llista de cèl.lules sobre les que actua inclou neutròfils, eosinòfils, monòcits i macròfags, fibroblastes, cèl.lules de múscul llis, cèl.lules endotelials, cèl.lules alveolars tipus II, i algunes línies cel.lulars derivades de cèl.lules nervioses a més a més de les plaquetes (101-104).

El factor activador de les plaquetes pot actuar directament en molts tipus cel.lulars i indirectament en molts més quan les seves cèl.lules diana generen nous mediadors després de la seva actuació, participant així en tota una xarxa de mediadors (95).

Es de suposar que les cèl.lules que responen al factor

activador de les plaquetes presenten receptors per aquest mediador. Hi ha una abrumadora sèrie de dades circumstancials que indiquen que existeixen receptors específics, com l'activació de cèl.lules a concentracions subnanomolars, l'existència de desensitització específica, la unió saturable a cèl.lules o membranes cel.lulars, i el desenvolupament recent d'un gran nombre d'antagonistes del factor activador de les plaquetes. El que falta en realitat és l'aïllament d'aquest receptor, la demostració de la seva unió a la membrana i els mecanismes pels quals el factor activador de les plaquetes el reconeix i s'uneix a ell. Les dades que hi ha fins ara fan pensar que pot haver-hi més d'un tipus de receptor en cèl.lules diferents, i fins i tot potser diferents receptors en un mateix tipus cel.lulars que portin a diferents respostes. Aquesta és una àrea on és difícil avançar, i falta encara molt terreny per investigar (95,105). Molt recentment (1991) Honda et al. han informat de la clonació d'un receptor del factor activador de les plaquetes en pulmó de conillets d'India. Aquest receptor seria un membre de la superfamília de proteïnes G (106).

El factor activador de les plaquetes provoca una àmplia gama de respostes biològiques que van des d'agregació i degranulació de plaquetes i neutròfils fins a una varietat d'efectes cel.lulars: l'estimulació de la quimiotaxi, quimioquinesi, formació de superoxide, fosforilació de proteïnes, activació de proteïn quinasa C,

d'àcid araquidònic i del metabòlits fosfoinositol, glucogenolisi, i producció de factor de necrosi tumoral i altres citoquines com Interleuquina 1 (102,107). Aquest últim punt és controvertit, perquè també s'ha descrit que el factor activador de les plaquetes o un antagonista disminueixen els nivells de factor de necrosi tumoral α en el plasma de ratolins tractats amb endotoxina (108), sembla que, el factor activador de les plaquetes pot provocar l'alliberament de citoquines, i aquestes les del factor activador de les plaquetes, generant mecanismes de retroalimentació per control de la producció (107). També produeix augment de la permeabilitat vascular i vasodilatació (91,109). Les seves accions estan estretament relacionades amb les d'altres mediadors lípids, com ara les prostaglandines, els tromboxans i els leucotriens, que són productes del metabolisme de l'àcid araquidònic (110).

Amb aquesta diversitat d'activitats biològiques no és d'estranyar que el factor activador de les plaquetes hagi estat considerat un component clau en moltes malalties relacionades amb la hipersensibilitat (111), la resposta inflamatòria, i en síndromes com el xoc, el distress respiratori de l'adult i d'altres. També s'ha demostrat que el factor activador de les plaquetes té un paper en processos fisiològics especialment de reproducció i desenvolupament fetal.

El factor activador de les plaquetes té un paper dual, amb efectes en la cascada inflamatòria i en la cascada de la coagulació . A continuació repasarem alguns dels seus efectes en diversos teixits, i els efectes fisiopatològics pels que sembla estar implicat en algunes malalties.

El factor activador de les plaquetes ha estat identificat en una sèrie de teixits relacionats amb la reproducció com ara l'embrió, l'ovari, l'úter, i l'espermatozoide. També l'hipotàlam. A l'úter, els nivells de factor activador de les plaquetes estan controlats hormonalment, essent més alts per l'acció de la progesterona i la prostaglandina E₂. Els antagonistes del factor activador de les plaquetes interfereixen amb la funció de l'esperma, l'ovulació i la implantació (112). Altres estudis han demostrat que el factor activador de les plaquetes augmenta la fertilització in vitro dels oòcits de conill (113). Aquestes dades suggereixen que el factor activador de les plaquetes pot ser un regulador fisiològic important en la reproducció.

Una de les seves accions més impressionants és la capacitat per activar i agregar plaquetes. De fet, és la substància més potent quant a agregació plaquetar que es coneix fins ara. En estudis en plaquetes de diverses espècies animals, l'activació del factor activador de les plaquetes, que produeix canvi en la forma i agregació de

les plaquetes, està estretament relacionada amb la degranulació de serotonina i de factor plaquetar 4 (114-118).

El factor activador de les plaquetes provoca un augment en la permeabilitat vascular i la consegüent pèrdua de plasma ric en proteïnes. Aquest augment de la permeabilitat sembla degut a una disrupció de la integritat de les unions postcapil.lars. Es un efecte transitori, però és prou per permetre el pas de tota classe de macromolècules del plasma. Aquesta alteració de la permeabilitat capil.lar no està relacionada amb la seva acció en les plaquetes o els neutròfils, sinó que sembla un efecte directe sobre l'endoteli. L'augment de la permeabilitat microvascular i l'hemoconcentració provocats pel factor activador de les plaquetes són dosi i via depenents (118,119). També s'ha assenyalat el factor activador de les plaquetes com a mediador de la resposta anafilàctica a complexos immunes solubles en rates (120).

La relació entre el factor activador de les plaquetes i la hipotensió i el xoc va ser una de les primeres estudiades *in vivo* i s'ha demostrat en multitud d'espècies animals.

La infusió de factor activador de les plaquetes reproduïx la hipotensió produïda per l'endotoxèmia en les

rates. La infusió d'antagonistes com el kadsurenò disminueix la hipotensió produïda pel factor activador de les plaquetes i per l'endotoxèmia (121). Usant altres antagonistes com el CV3988 s'han aconseguit efectes similars (122,123).

Aquest efecte hipotensor del factor activador de les plaquetes és independent de la seva acció en les plaquetes, i és dosi i via dependent (87). Seguint la injecció de factor activador de les plaquetes per via jugular es produeix en 15 segons un descens en la pressió arterial mitjana. S'observa amb dosis entre 10 i 2000 ng Kg⁻¹. Tant el grau de descens com el temps de recuperació són dosi dependents (124). Malgrat això, també s'ha demostrat que les plaquetes de malalts amb sepsis presentaven ocupació dels seus receptors pel factor activador de les plaquetes, mentre que les plaquetes de voluntaris sans o de malalts amb patologia cardiovascular o respiratòria amb hemocultiu negatiu tenien un nombre 6 vegades més alt de receptors lliures (125).

El factor activador de les plaquetes compleix tots els criteris d'un factor implicat en el xoc. S'ha detectat en líquids biològics d'animals durant estats de xoc. També, injectant factor activador de les plaquetes en suspensions cel.lulars, aïllats de teixits i animals vius, s'han produït la majoria d'efectes atribuïts al factor activador

de les plaquetes endògen que s'allibera després d'estímuls immunològics o hipòxics. Les accions fisiopatològiques que se li han atribuït en aquests estudis inclouen depressió cardíaca, és a dir, efecte inotròpic negatiu, hipotensió, pèrdua de volum des de la microvasculatura, broncoconstricció i agregació plaquetar. Totes aquestes accions del factor activador de les plaquetes poden iniciar o exacerbar el xoc, i les lesions isquèmiques en múltiples òrgans i sistemes.

També en estudis animals, els antagonistes del factor activador de les plaquetes atenuen clarament la severitat del xoc endotòxic, anafilàctic, hemorràgic i traumàtic, així com la isquèmia miocàrdica aguda.

S'ha suggerit també que el seu paper al xoc es fa a través d'una complexa interacció entre el factor activador de les plaquetes i les citoquines que porten a la reacció de fase aguda i al colapse circulatori (126).

En totes aquestes condicions, antagonistes de receptor del factor activador de les plaquetes, ja siguin anàlegs del factor activador de les plaquetes o bé substàncies totalment diferents, milloren la supervivència i retarden els processos fisiopatològics que semblen importants per provocar el dany tisular (127).

El pulmó és un òrgan extraordinàriament sensible a l'acció del factor activador de les plaquetes. La injecció de factor activador de les plaquetes en dosis de picomols Kg^{-1} indueix broncoconstricció, de manera que el factor activador de les plaquetes és un dels més poderosos constrictors pulmonars coneguts fins ara. Els efectes del factor activador de les plaquetes al pulmó, inclouen broncoconstricció, hipertensió pulmonar, edema pulmonar i inflamació, i han estat estudiats en diversos models animals. El factor activador de les plaquetes, també s'ha pogut detectar en el plasma de conills als qui s'havia provocat dany tisular amb edema pulmonar per mitjà d'anticossos (128).

L'acció broncoconstrictora i d'hipertensió pulmonar després de l'administració parenteral del factor activador de les plaquetes depenen de la presència de plaquetes circulants, però l'efecte no és a través de l'agregació o segrestament de plaquetes a la vasculatura pulmonar.

A més a més de les seves propietats broncoconstrictores, el factor activador de les plaquetes pot induir hiperreactivitat persistent de les vies aèries, definida com un augment de la resposta a altres broncoconstrictors com ara la histamina, l'acetilcolina, o estímuls físics com l'exercici o l'aire fred. Aquesta hiperreactivitat es creu que representa un estat

inflamatori subjacent dels pulmons, caracteritzat per augment en la producció de moc, pèrdua d'epiteli, infiltració d'eosinòfils i altres cèl.lules inflamatòries, i edema bronquial i traqueal. Usant factor activador de les plaquetes s'han produït estats d'hiperrreactivitat de via aèria en una gran varietat d'espècies animals. Basant-se en aquestes dades, s'ha atribuït des de fa molt temps un paper al factor activador de les plaquetes en l'asma bronquial (118,129-132) i s'estan estudiant antagonistes del factor activador de les plaquetes com a possible tractament.

En casos d'asma en persones al.lèrgiques a l'aspirina, s'ha invocat el paper del factor activador de les plaquetes, especialment a través de l'alliberament d'histamina i l'activació de basòfils (133).

En un estudi realitzat per González-Crussi i Hsueh (134) es va demostrar que en rates tractades amb factor activador de les plaquetes i/o lipopolisacàrids per via de l'aorta abdominal, les rates tractades amb lipopolisacàrids sols no presentaven lesions en els òrgans toràcics o abdominals, mentre que els tractats amb 2 μg de factor activador de les plaquetes sol, o amb 1 μg de factor activador de les plaquetes i 20 μg de lipopolisacàrid combinats, provocaven les típiques lesions necrotitzants de la isquèmia intestinal. Estudis posteriors realitzats sobre enterocolitis necrotitzant (135) semblen confirmar el paper

del factor activador de les plaquetes en aquest terreny. També s'ha relacionat el factor activador de les plaquetes amb la malaltia inflamatòria intestinal, ja que en un estudi (136) en un model experimental de colitis crònica en rates, els anatagonistes del factor activador de les plaquetes van aconseguir accelerar la curació d'ulceres i reduir la incidència de diarrea.

Un estudi realitzat per estudiar el paper del factor activador de les plaquetes al fetge, per mitjà de l'efecte d'un antagonista, el WEB 2086, en les lesions hepàtiques produïdes a les rates per l'administració de galactosamina/endotoxina, va demostrar que l'ús d'aquest antagonista va disminuir significativament les elevacions de les transaminases del sèrum. També els canvis histològics van millorar significativament indicant que el factor activador de les plaquetes té un paper en la fisiopatologia del dany hepàtic (137).

El factor activador de les plaquetes és un dels més potents ulcerògens coneguts fins ara, i s'ha demostrat la síntesi de factor activador de les plaquetes per part de la mucosa gàstrica (138). El seu paper sembla també important en l'aparició de les lesions gàstriques durant el shock sèptic (139,140).

S'ha demostrat (141,142) que en coronàries aïllades de

cor de mamífer hi ha alliberament de factor activador de les plaquetes, i que administrant factor activador de les plaquetes a cors aïllats no sensibilitzats prèviament es produeix una disminució de la contractibilitat, del flux coronari i de la funció atrioventricular.

El factor activador de les plaquetes ha estat relacionat també amb el rebuig de trasplantaments, tant renals, cardíacs com hepàtics. Els mecanismes implicats en el rebuig, com ara dany de l'endoteli vascular per anticossos, acumulació de neutròfils, agregació plaquetar, coagulació intravascular etc, poden estar relacionats amb el factor activador de les plaquetes. S'ha demostrat en models animals prolongació de la supervivència de l'empelt usant antagonistes del factor activador de les plaquetes, i, també amb l'ús d'antagonistes s'ha demostrat un augment de l'acció immunosupresora de la ciclosporina A, i la prevenció de la nefrotoxicitat que aquesta pot generar (143-151).

També al SNC s'ha estudiat el paper del factor activador de les plaquetes, i sembla ser un mediador clau en el dany cerebral. Ha estat relacionat, novament, amb la isquèmia cerebral i el neurotrauma (152,153). El factor activador de les plaquetes té efectes citotòxics sobre les cèl.lules neuronals, produeix vasoconstricció i augmenta la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica.

En diversos models d'isquèmia cerebral s'han demostrat efectes beneficiosos dels antagonistes del factor activador de les plaquetes. L'administració pre i post isquèmica d'aquests antagonistes produeixen reducció de l'edema i millora de la microcirculació cerebral. Aquests efectes es correlacionaven amb millora de la supervivència neuronal i reducció en l'acumulació de leucòcits (153). S'ha trobat que el factor activador de les plaquetes pot ser produït per les cèl.lules granulars del cerebel en cultiu i s'ha pogut extreure de teixit cerebral. També s'han demostrat receptors del factor activador de les plaquetes al teixit cerebral. Quan s'administra *in vivo*, el factor activador de les plaquetes té potents accions sobre els vasos cerebrals i el metabolisme cerebral. Usant antagonistes del factor activador de les plaquetes, s'ha demostrat prevenció o inversió de fets claus en el dany cerebral com ara la hipoperfusió que segueix la isquèmia, reperfusió i edema, acumulació de cèl.lules inflamatòries, dèficits motors/neurològics etc (154).

La investigació sobre el factor activador de les plaquetes, així com d'altres mediadors, està encara a les beceroles. Ha estat en els últims anys que s'ha sortit dels estudis que podríem anomenar del tipus "brou de carn" o en aquest cas de greix, per tenir la capacitat de treballar amb molècules sintetitzades i els seus anàlegs, que s'han pogut trobar antagonistes i inhibidors adequats, i que

finalment es pot començar a provar què està passant realment.

La molècula de fosforilcolina és un determinant crític de l'activitat del factor activador de les plaquetes (155) i dels àcids teicoic i lipoteicoic pneumocòcic (14). La proteïna C reactiva, que és un reactant de fase aguda, interacciona amb ambdues molècules (156-158), si bé la interacció amb el factor activador de les plaquetes no resulta en una neutralització de la seva activitat biològica, sino en un augment de la seva capacitat per induir agregació plaquetar.

Aquesta relació entre les activitats inflamatòries depenents de la fosforilcolina de la paret cel.lular pneumocòcica i el factor activador de les plaquetes suggereix la possibilitat de que el factor activador de les plaquetes jugui un paper especial en la malaltia pneumocòcica. Tot això ens va portar a aquest estudi sobre el paper del factor activador de les plaquetes a la malaltia pneumocòcica.

3. OBJECTIUS

3. OBJECTIUS

El coneixement detallat dels mecanismes de la resposta inflamatòria és imprescindible per portar al disseny de noves estratègies de tractament que junt amb els antibiòtics, millorin el pronòstic de la malaltia pneumocòcica.

El factor activador de les plaquetes és un possible mediador de la resposta inflamatòria, i les seves similituts amb estructures de la paret cel·lular pneumocòcica fan que pugui jugar un paper en la inflamació produïda en la infecció pneumocòcica, be sigui per que s'activa en el curs d'aquesta inflamació o bé perque part de la paret cel·lular pneumocòcica pot actuar directament en els receptors, degut a aquesta similitud.

Els objectius fonamentals d'aquest treball són:

1. Determinar si el factor activador de les plaquetes és capaç de produir inflamació i alterar la fisiologia a l'espai subaracnoïdal i al pulmó.
2. Determinar el paper del factor activador de les plaquetes en el curs de la meningitis i de la pneumònia pneumocòcica.

3. Determinar si els àcids teicoic i lipoteicoic pneumocòcic poden actuar com a anàlegs del factor activador de les plaquetes.

4. MATERIAL I METODEDES

4. MATERIAL I METODES

4.1 Disseny del projecte.

Es tracta d'un treball de tipus experimental en què, per determinar el paper del factor activador de les plaquetes en la meningitis i la pneumònia pneumocòciques, s'han fet diversos tipus d'estudis amb l'ajut de models experimentals animals de meningitis i pneumònia.

Primer es va determinar la capacitat del factor activador de les plaquetes per generar una resposta inflamatòria.

En el model de meningitis, es va estudiar la resposta inflamatòria, quant a presència de pleocitosi, concentració augmentada de proteïnes i presència o absència d'edema cerebral, en resposta a l'administració intracisternal de factor activador de les plaquetes. L'especificitat de la resposta inflamatòria es va comprovar comparant-la amb la que es produïa amb l'administració intracisternal de factor activador de les plaquetes i l'administració simultània de l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

També es va estudiar la modulació de la resposta inflamatòria generada pel factor activador de les plaquetes amb l'administració d'anticòs antiparet cel.lular.

Per estudiar el possible paper del factor activador de les plaquetes a la meningitis pneumocòcica, en un altre grup de conills es va estudiar la resposta inflamatòria produïda per l'administració intracisternal de *S. pneumoniae* soca R6, inactivada per calor, i es va comparar amb la resposta generada per la mateixa soca amb l'administració simultània de l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

De la mateixa manera, la resposta inflamatòria generada per l'administració de paret cel.lular pneumocòcica es va comparar amb la generada per la mateixa paret cel.lular amb l'administració simultània de l'antagonista del factor activador de les plaquetes, i la resposta generada per l'àcid lipoteicoic pneumocòcic, es va comparar amb la produïda pel mateix àcid lipoteicoic més l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

També s'ha comparat la modulació que produeix l'antagonista del factor activador de les plaquetes en l'activitat inflamatòria produïda per la inoculació intracisternal de *S. pneumoniae* viu i *H. influenzae* viu, per tal de veure si es tracta d'una resposta general, o pròpia de les característiques del pneumococ.

Per estudiar el possible paper del factor activador de

les plaquetes en la pneumònia pneumocòcica, en altres grups de conills es va realitzar el model de pneumònia, i es va estudiar la resposta inflamatòria generada en el rentat broncoalveolar, quant a presència de leucòcits i concentració augmentada de proteïnes, per l'administració intratraqueal del factor activador de les plaquetes, i es va demostrar la seva especificitat comparant-la amb la resposta generada per l'administració simultània de factor activador de les plaquetes amb l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

De la mateixa manera que amb el model de meningitis, amb el model de pneumònia, també es va estudiar el possible paper del factor activador de les plaquetes a la pneumònia pneumocòcica estudiant la resposta inflamatòria produïda per l'administració intratraqueal de *S. pneumoniae* R6 mort per calor, i comparant-la amb la produïda per la mateixa soca inactivada per calor amb la administració simultània de l'antagonista del factor activador de les plaquetes, l'administració simultània d'anticòs IB4 o ambdós.

En el projecte s'han fet servir un total de 88 conills. Els experiments es van realitzar en grups de 8, estudiant en cada grup 4 variables per experiment, amb 2 animals per substància o combinació a estudiar. En conjunt es van usar un mínim de 4 conills per variable, excepte en algunes dosis baixes, en que només es van fer servir dos.

4.2 Factor activador de les plaquetes.

4.2.1 Factor activador de les plaquetes.

Preparació, dosi i vies d'administració.

Es va utilitzar, en tots els experiments, factor activador de les plaquetes (1-O-alkil-2-O-acetil-sn-glicero-3-fosfolina) adquirit a SIGMA, Chemical Co, St. Louis, MO, EEUU.

El factor activador de les plaquetes es va diluir en cloroform/metanol en una proporció 9:1 i va ser emmagatzemat a -20 °C.

Immediatament abans de la seva utilització, en qualsevol tipus d'experiment, es van separar les alíquotes necessàries i es va evaporar el cloroform/metanol sota un corrent d'aire.

El factor activador de les plaquetes es va rediluir en 0.2 ml de sèrum fisiològic i es va sonicar durant 2 minuts per aconseguir una adequada dissolució.

En els experiments amb el model de meningitis es van estudiar dosis de 20 µg i 100 µg que es van instil·lar intracisternalment. En tots els experiments en què es va

fer servir també antagonista del factor activador de les plaquetes es van fer servir dosis de 100 µg de factor activador de les plaquetes administrats intracisternalment.

En els experiments amb el model animal de pneumònia es van fer servir dosis de 100 µg que es van administrar intratraquealment.

4.2.2 Antagonista del factor activador de les plaquetes.

Preparació, dosi i vies d'administració.

Es va utilitzar un antagonista del factor activador de les plaquetes per competència de receptors, L-659,989 [trans-2-(3-metoxi-5-metilsulfonyl-4-propoxifenil)-5-(3,4,5-trimetoxifenil) tetrahidrofurà], actiu en conills (159, 160), que va ser cedit per Merck Sharp and Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ, EEUU.

Es va preparar com a solució 5 mM en dimetilsulfòxid.

Immediatament abans de ser utilitzat, es van separar les alíquotes i van ser diluïdes en sèrum fisiològic isotònic preescalfat a 55 °C i es van injectar per via endovenosa o intracisternal.

El diluent va demostrar no ser inflamatori en cap dels models animals.

En el model de meningitis es van utilitzar dosis de 0.2 i 40 μg per via intracisternal i 0.2 i 20 μg per via endovenosa. En el model de pneumònia es van fer servir dosis de 200 μg per via endovenosa.

4.3 Components bacterians.

4.3.1 Soques utilitzades.

La soca R6 de *S. pneumoniae* és una soca no encapsulada, derivada originalment de la soca A_{II}. Aquesta soca A_{II} és una soca de laboratori, no encapsulada, del serotipus II, desenvolupada a la Rockefeller University.

Es va cultivar fins a una fase logarítmica, 10^8 unitats formadores de colònies per ml, (verificat per titolació d'unitats formadores de colònies). El cultiu es va realitzar en un medi semisintètic que es detalla en la Taula. Un cultiu de 10 ml. es va col·locar en un bany d'aigua a 100 °C. i es va bullir durant 20 minuts en el medi. Posteriorment es va centrifugar a 2000 x g durant 10 minuts, i es va resuspendre en sèrum fisiològic apirogen per ser emmagatzemats a - 4 °C. La recuperació de cèl.lules bacterianes (partícules amb tamany de cèl.lula) es va determinar per mitjà d'un comptador (Coulter Counter Model T AII, Coulter Electronics, Harpenden, Anglaterra).

Es van utilitzar en els experiments 10^5 equivalents cel.lulars que van ser administrats per via intracisternal o per via intratraqueal en un volum de 0.2 ml.

Utilitzant aquesta soca inactivada per calor, es produïa una resposta inflamatòria molt reproduïble i similar a la malaltia natural.

La soca R6 de *S. pneumoniae* i la soca Eagan de *H. influenzae* tipus b es van cultivar fins a una fase logarítmica, es van rentar i es van resuspendre en sèrum fisiològic apirogen (22,67). Es van administrar per via intracisternal 10^5 equivalents cel.lulars d'una o altra bacteria, en un volum de 0.2 ml de sèrum fisiològic, en els experiments amb bacteries vives.

4.3.2 Paret cel.lular de *S. pneumoniae*.

Preparació, dosi i via d'administració.

La paret cel.lular de pneumococ es va preparar d'acord amb un protocol preestablert (23). La soca R6 es va cultivar en 1 l de medi de cultiu semisintètic fins a una concentració de 5×10^8 ufc/ml, les cèl.lules es van recollir per centrifugació i es van resuspendre en 5 ml de sèrum fisiològic, i la suspensió resultant es va submergir en un

bany d'aigua bullint durant 15 minuts, per inactivar l'enzim autolític, després es van barrejar amb un volum igual de contes de vidre, i van ser agitades per desintegrar-les durant 1 hora. Les contes de vidre es van separar per sedimentació. La suspensió es va centrifugar a 3000 g durant 3 minuts per separar les cèl.lules no trencades, i el sobrenedant es va centrifugar a 10000 g durant 30 minuts per separar el material corresponent a paret cel.lular.

En examinar amb microscopi de contrast de fase es va revelar només material amorf en aquestes preparacions. Aquest material cru es va extreure amb SDS al 2 % a 90-100 °C durant 30 minuts. El detergent es va treure amb 6 cicles de rentat per centrifugació amb aigua destil.lada. Les cèl.lules es van resuspendre en tampó Tris-HCl 0.1 M (pH 8), contenint 1 mM Cl₂Mg, i van ser tractades a 37 °C amb ADNasa pancreàtica I (50 µg/ml) i ARNasa 100 µg/ml durant 2 hores, seguit per tripsina 100 µg/ml amb 10 mM Cl₂Ca, durant 10-12 hores. Totes les preparacions enzimàtiques es van obtenir de Worthington Biochemicals, Freehold NJ, EEUU.

Les parets cel.lulars es van sedimentar per centrifugació i es van resuspendre en 5 ml de SDS al 2 % a 90-100 °C en un bany d'aigua durant 30 minuts. El detergent es va treure amb 8 cicles de rentat, primer amb solució de ClNa 1 M i després amb aigua destil.lada i,

finalment, la paret cel.lular es va liofilitzar.

La paret cel.lular es va utilitzar en els experiments de meningitis experimental, en una dosi de 50 μg per conill diluïts en un volum de 200 μl i es van instil.lar intracisternalment.

4.3.3 Àcid lipoteicoic pneumocòcic.

Preparació, dosi i vies d'administració.

L'àcid lipoteicoic pneumocòcic o antigen de Forssman, es va preparar a partir d'un cultiu de 16 litres de la soca R6 cultivada en el mateix medi que es detalla en la Taula per mitjà d'una modificació (30) del procediment original (29) descrit per Goebel et al. a l'any 1943.

Un cultiu més petit, d'un litre, es va cultivar en paral.lel en un medi sintètic que contenia [H_3] metilcolina (5 uCi i 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) per utilitzar com a traçador. El sediment bacterià d'aquest cultiu es va afegir al sediment del cultiu de 16 litres en començar el procediment d'extracció.

Es van utilitzar dosis de 100 μg diluïts en aigua, injectats intracisternalment, en els experiments de meningitis experimental.

Composició del medi de cultiu

Pre C	400 ml
Suplement	13 ml
Glutamina (1 mg/ml)	10 ml
Adams III	10 ml
Piruvat (2%)	5 ml
PO ₄ K	15 ml
Llevat Difco (5%)	10 ml

Suplement

"3 sals en una"	60 ml
Glucosa (20 %)	120 ml
Sucrosa (50 %)	6 ml
Adenosina (2 mg/ml)	120 ml
Uridina (2 mg/ml)	120 ml

"3 sals en una"

Cl ₂ Mg·6H ₂ O	100 g
Cl ₂ Ca anhidric	0.5 g
SO ₄ Mn (0.1 M)	0.2 ml
en aigua destil.lada	1000 ml

Pre C

Acetat sòdic (anh.)	14.5 g
Difco Casamino-acids	60 g
L-Triptòfan	0.06 g
L-Cisteina ClH	0.60 g
afegir aigua destil.lada fins a 12000 ml.	

Adams I

Biotina (0.5 mg/ml)	0.06 ml
Acid nicotínic	30 mg
Piridoxina	35 mg
Pentitotat de Ca	120 mg
Tiamina ClH	32 mg
Riboflavina	14 mg
en aigua destil.lada	200 ml

Adams II

$\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 mg
SO_4Cu	50 mg
$\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 mg
$\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	20 mg
ClH	1 ml
en aigua destil.lada	100 ml

Adams III

Adams I	64 ml
Adams II	16 ml
Asparagina	800 mg
Colina	80 mg
Cl ₂ Ca (1 %)	0.64 ml
en aigua destil.lada	400 ml

4.4 Anticossos.

4.4.1 Anticòs monoclonal IB4.

L'anticòs monoclonal IB4 és un anticòs contra l'epítot CD18 de la molècula d'adhesió dels leucòcits CR3.

Va ser subministrat per Merck Sharp and Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ. EEUU, i es va administrar per via endovenosa a una dosi de 0.5 mg de proteïna purificada per conill.

Es va utilitzar exclusivament en els experiments de pneumònia experimental, ja que l'efecte d'aquest anticòs en el model de meningitis s'havia estudiat previament en el mateix model animal i en el mateix laboratori (49).

4.4.2 Anticòs TEPC-15.

L'anticòs TEPC-15 (Hazelton Laboratories, Rockville, MD) és un anticòs que reconeix la fosforilcolina.

Es va injectar com a 0.1 mg de proteïna purificada per conill per via endovenosa.

4.5 Models animals de meningitis i pneumònia.

4.5.1 Animals.

Es van utilitzar per tots els experiments conills blancs de Nova Zelanda, específicament lliures de patògens, de 2 Kg de pes (entre 1.6-2.4 Kg) adquirits a Hare Marland, Nutley, NJ. EEUU.

Els animals arribaven una setmana abans de ser utilitzats en els experiments, i es mantenien en observació durant aquella setmana per garantir que no presentessin cap patologia. Estaven allotjats en condicions estandaritzades de llum i humitat en un pis de l'estabulari on tots els animals allotjats eren específicament lliures de patògens. Hi havia un esquema de llum des de les 6.30 hores fins les 18.30 hores per mantenir el seu ritme circadià.

Una vegada al dia eren revisats per un tècnic per comprovar el seu estat de salut. Podien disposar d'aigua i pinso *ad libitum*.

4.5.2. Model animal de meningitis.

El model de meningitis es va realitzar segons lleugeres modificacions del descrit per Dacey i Sande al

1974 (161).

El dia anterior a la realització de l'experiment es realitzava una fase de preparació. Els conills s'anestesiaven amb 0.7 ml de Ketamina HCl (100 mg/ml) (Ketaset, Aveco Co Inc. Fort Dodge, Io, EEUU) i 0.5 ml de Xylazina (20 %) (Rompun, Haver Mobay Co. Shawnee, KA, EEUU) intramuscular, en una mateixa xeringa. Un cop anestesiats s'afaitaven les orelles, la part superior del cap i la part posterior del coll. Es desinfectava amb solució iodada i es passaven a la zona quirúrgica.

En condicions d'asèpsia (bata, guants, màscara, talles estèrils etc.) es realitzava una incisió a línia mitjana sobre la pell del cap d'uns 4 cm, es retirava el periosti i sobre el crani i amb l'ajut d'un perforador, es realitzaven 4 forats equidistants a la intersecció de les sutures. Allà es fixaven 4 cargols, que alhora servien per a la fixació d'una forquilla que permetia al moment de realitzar l'experiment fixar l'animal a una estructura de control estereoatàxic, i mantenir-lo a la mateixa posició durant tot l'experiment. Es cobria tot amb ciment acrílic (Fastray Dental Acrilyc, H.J. Bosworth Co. Skokie, IL, EEUU) formant un cub, que cubria tota la ferida quirúrgica i les peces metàl·liques. Es mullava el cap sota un raig d'aigua per refredar-lo i s'observava l'animal fins la recuperació de l'anestèsia. El temps aproximat d'anestèsia

era de 1 hora, i l'animal era retornat a la gàbia.

L'endemà, els animals s'anestesiaven amb 15 ml d'uretà (Aldrich Chemical Co. Inc EEUU) al 25 %, per via subcutània, una hora després es col.locava un catèter 24 G (Angiocath, Deseret Medical Inc. Sandy, UT, EEUU) a la vena marginal de l'orella i es complementava l'anestèsia amb 0.2 ml de pentobarbital sòdic (Nembutal^R) endovenós. Aquesta anestèsia és suficient per a mantenir els animals anestesiats al llarg de tot l'experiment i es suplementava amb 0.1 ml de pentobarbital endovenós quan s'observava algun signe d'activitat.

Quan els animals estaven perfectament adormits es roscava un piu a la forquilla i els conills podien fixar-se a l'estructura de control estereotàxic. S'introduïa una agulla de punció lumbar 25 G (Beckton Dickinson, Sandy, UT, EEUU) a la cisterna magna i un cop obtinguda una mostra de LCR, l'agulla es deixava en aquesta posició i s'injectava l'inòcul, ja fos el factor activador de les plaquetes, o bé els pneumococs R6 inactivats per calor, la paret cel.lular de pneumococs, l'àcid lipoteicoic pneumocòcic, els pneumococs R6 vius o *H. influenzae*.

En alguns experiments l'antagonista del factor activador de les plaquetes es va instil.lar també intracisternalment, i en altres experiments, l'antagonista

del factor activador de les plaquetes, o els anticossos, es van administrar per via endovenosa al mateix temps.

Cada hora al llarg de 4 hores en els experiments en què s'utilitzava el factor activador de les plaquetes, i cada 2 hores, durant 6 hores, en els experiments en què es feien servir pneumococs morts per calor, es treia una mostra de 0.3 ml de LCR.

Els conills es vigilaven contínuament per mantenir el nivell de l'anestèsia en tot moment i evitar que es poguessin fer mal involuntàriament.

Un cop acabat l'experiment els animals es sacrificaven amb una sobredosi de pentobarbital endovenós. En els experiments en què era necessari conèixer l'existència d'edema cerebral, se'ls extreia el cervell.

4.5.3 Processament de les mostres.

Les mostres es van processar immediatament per recompte leucocitari. Quaranta μ l de la mostra es diluïen en 20 ml de tampó salí isotònic i es determinava el nombre d'hematies per μ l usant un comptador de partícules (Coulter Electronics Inc, Hialeh, FL. EEUU), seguidament a la mateixa mostra s'afegien unes gotes de detergent (Zapoglobin azide-free, Coulter Diagnostics, Hialeh, FL,

EEUU)) per hemolitzar els hematies, i es determinava el nombre de leucòcits.

Les mostres originals eren immediatament centrifugades a 10000 x g durant 5 min i el sobrenedant congelat a -70 °C fins que es feia la determinació de proteïnes.

La determinació de proteïnes es realitzava habitualment l'endemà de l'experiment. Primer es construïa una corba estàndard amb concentracions de proteïna conegudes. Usant albúmina sèrica bovina fracció V (Sigma, Chemical Co St. Louis, MO EEUU), es feien dilucions d'albumina des de 0.2 mg/ml fins a 1.2 mg/ml. De cada una de les dilucions es transferia una mostra de 100 µl a un altre tub i s'hi afegien 2 ml de reactiu BCA (Pierce Chemical Co, Rockford, IL EEUU) preparat amb 50 parts de reactiu A i 1 part de reactiu B (segons fabricant). Seguidament s'incubaven en un bany a 37 ° C durant 30 minuts. Després eren llegides amb un espectrofotòmetre (Ultrospec II, LKB Biochrom Ltd, Cambridge, Anglaterra) a 562 nm en cubetes d'un sol ús. Amb les absorbàncies d'aquestes concentracions conegudes d'albumina es construïa una corba estàndard amb què es comparaven les absorbàncies de les mostres de LCR.

Per llegir l'absorbància de les mostres de LCR s'utilitzaven 50 µl de LCR amb 1 ml de reactiu BCA,

s'incubaven a 37 ° C durant 30 minuts, i eren llegides a 562 nm en cubetes d'un sol ús.

Els cervells eren pesats en una balança (pes humit) i eren deixats en una estufa a 100 °C durant 7 dies. Després de 7 dies, els cervells dessecats es tornaven a pesar a la mateixa balança i en les mateixes condicions (pes sec).

L'edema cerebral es calculava per mitjà de la diferència entre el pes humit i el pes sec (grams d'aigua), dividit entre el pes sec i multiplicat per 100 (grams d'aigua /100 g pes sec) i es considerava presència d'edema cerebral quan la xifra era superior a 400 (65).

4.5.4 Model animal de pneumònia.

El model animal de pneumònia es va fer segons una adaptació del descrit per Onofrio et al. (162).

Els animals s'anestesiaven amb Ketamina 0.7 ml i xylazina 0.5 ml per via intramuscular (en una mateixa xeringa).

Quan els animals estaven adormits es col.locava un catèter a la vena marginal de l'orella i en decúbit supí es feia una incisió de 2 cm sobre la tràquea. S'identificava la tràquea i es feia una petita incisió, suficient per

permetre el pas d'un catèter de palometa 19 G 7/8 (Abbott Hospitals, Inc., North Chicago, IL. EEUU), que s'introduïa en el bronqui principal dret, s'enclavava i es retirava 1 cm.

L'inòcul, factor activador de les plaquetes o bé pneumococs morts per calor, era introduït pel catèter en 0.2 ml de sèrum fisiològic, seguit de 5 cm d'aire, i la incisió es grapava. En alguns experiments, l'antagonista del factor activador de les plaquetes o l'anticòs IB4 o ambdós es van administrar per via endovenosa al mateix temps.

Una hora després en els animals en què s'utilitzava el factor activador de les plaquetes i 3 hores després en els animals en què s'utilitzaven pneumococs morts per calor, es realitzava un rentat broncoalveolar de la següent manera: es retiraven les grapes, i la tràquea era recanulada fins a una profunditat de 2 cm, es comprovava per la presència de tos que estaven al lloc adequat, i els animals eren en aquell moment sacrificats, amb una sobredosi de pentobarbital sòdic endovenós.

S'introduïa pel catèter sèrum fisiològic suplementat amb heparina al 5% i blau de metilè al 0.1%, en dos volums de 10 ml. Es feia massatge en el tòrax durant 1 minut i es reaspirava el fluid a través del catèter. El volum de

líquid recuperat en cada ocasió, s'anotava.

4.5.5 Processament de les mostres.

El líquid obtingut es centrifugava a 1000 g durant 10 minuts. El sediment es resuspensia en 10 ml de tampó salí isotònic (American Scientific products, EEUU) i es va determinar el recompte leucocitari amb un comptador de partícules (Coulter Electronics Inc., Hialeh, FL. EEUU) seguint la mateixa sistemàtica que per a les mostres de LCR.

El contingut de proteïnes del sobrenedant es determinava amb el mateix mètode descrit per al tractament de les mostres de LCR.

Les determinacions originals de concentració de proteïnes i de recompte leucocitari eren corregides per reflectir els valors en el fluid pulmonar original per mitjà d'una adaptació (163) del mètode descrit per Baughman et al. (164), usant el blau de metilè com a marcador extern.

Amb un espectrofotòmetre es llegia a 690 nm l'absorbància del líquid que s'utilitzava pel rentat (sèrum fisiològic suplementat amb heparina 5% i blau de metilè 0.1%), i la de les mostres de rentat. Aquesta absorbància

control es dividia per la diferència entre el mateix control (líquid original) i cada mostra i donava un número que era el factor de correcció o factor de dilució.

La concentració de proteïnes determinada segons hem descrit prèviament, es dividia per aquest factor de correcció per a obtenir els mil.ligrams de proteïna/ml de fluid pulmonar.

La xifra donada pel recompte leucocitari segons s'ha descrit prèviament, es dividia pel número resultant de multiplicar el factor de correcció pel volum de líquid recuperat, per tal d'obtenir el recompte leucocitari/ ml de fluid pulmonar.

Formules:

$$FD = \frac{A - B}{B}$$

A = Concentració blau de metilè al líquid introduït

B = Concentració blau de metilè al líquid aspirat

FD = Factor de dilució

$$\text{Proteïnes/ml líq. pulm.} = \frac{\text{proteïnes/ml líquid aspirat}}{FD}$$

$$\frac{\text{Cèl.lules totals}}{\text{ml líquid pulmonar}} = \frac{\text{cèl.lules totals}}{\text{ml líquid aspirat} \times FD}$$

4.6 Assaigs in vitro.

4.6.1 Inducció d'agregació plaquetar.

La capacitat de la paret cel.lular pneumocòcica per a reproduir les accions del factor activador de les plaquetes es va estudiar en un assaig d'inducció d'agregació de plaquetes de conillets d'India en plasma ric en plaquetes (160,165). La paret cel.lular pneumocòcica i l'àcid lipoteicoic pneumocòcic es van estudiar de dues maneres: directament per veure els seus efectes anàlegs al del factor activador de les plaquetes junt a un control de factor activador de les plaquetes, i indirectament per veure la seva capacitat per inhibir competitivament els efectes induïts pel factor activador de les plaquetes.

4.6.2 Inducció de degranulació de neutròfils.

Els components pneumocòcics es van comparar també amb el factor activador de les plaquetes quant a la seva capacitat per produir degranulació de neutròfils humans monitoritzant l'aparició d'elastasa mesurat per l'escisió de metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-aminometilcumarin per alliberar una porció fluorogènica (E. McIntyre, manuscrit en preparació).

4.7 Anàlisi estadística.

Les dades s'han expressat com a mitja \pm desviació estàndar.

Per a la comparació de dues mitges, s'ha utilitzat el test de Mann Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W en els casos en que la mostra era petita o no tenien distribució normal. En els casos que complien criteris de normalitat s'ha utilitzat el test de la t de Student. La determinació dels càlculs estadístics s'ha realitzat amb el paquet estadístic SPSS/PC.

5. RESULTATS

5. RESULTATS

5.1 Activitat inflamatòria del factor activador de les plaquetes a l'espai subaracnoïdal.

5.1.1 Inoculació intracisternal de factor activador de les plaquetes.

La capacitat del factor activador de les plaquetes per provocar una resposta inflamatòria a l'espai subaracnoïdal es va estudiar, sobre el model de meningitis experimental, injectant a la cisterna magna dues dosis diferents, 20 μg i 100 μg del factor activador de les plaquetes.

La inoculació de 20 μg de factor activador de les plaquetes en 4 conills va produir un augment en la concentració de proteïnes, detectable a la primera hora i que es va mantenir com a mínim durant 4 hores, arribant a 1.343 ± 0.21 mg/ml de LCR, però l'ascens va ser més lent (1.121 ± 0.32 mg/ml de LCR a les 2 hores) que amb dosis més altes, com es pot veure a la Taula I.

Amb aquesta dosi, l'augment en la concentració de proteïnes al LCR que és un índex de permeabilitat anormal de la barrera hematoencefàlica no es va acompanyar sistemàticament de l'aparició d'edema cerebral (398 ± 11 grams d'aigua per 100 grams de teixit sec, a les 4 hores, límit superior de la normalitat 400 grams d'aigua per 100

grams de teixit sec), si bé el 75 % d'aquests animals el van presentar. Aquesta dosi del factor activador de les plaquetes no va produir una pleocitosi important (Taula II).

La inoculació intracisternal de 100 μ g de factor activador de les plaquetes en 14 conills va produir un augment mantingut en la concentració de proteïnes detectable a l'hora i que va persistir un mínim de 4 hores (1.551 ± 0.334 mg/ml a les 4 hores) ($p < 0.05$) com es pot veure a la Taula I i a la Figura 1.

Amb aquesta dosi, l'augment de proteïnes es va acompanyar de la ràpida aparició d'edema cerebral (413.43 ± 15 grams d'aigua per 100 grams de teixit sec a les 4 hores, normal fins a 400 grams), com es pot veure a la Figura 2.

L'administració de 100 μ g del factor activador de les plaquetes no va provocar una important pleocitosi, màxim de 138 ± 199 , com es pot veure a la Taula II i a la Figura 3.

5.1.2 Modulació de la resposta inflamatòria per l'administració conjunta de factor activador de les plaquetes i l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

Onze conills van ser inoculats simultàniament amb factor activador de les plaquetes i el seu antagonista. Es van fer servir diverses dosis i les vies endovenosa i intracisternal.

La inoculació intracisternal de 100 μg de factor activador de les plaquetes amb 40 μg de l'antagonista per via intracisternal en 4 conills va produir un retard en l'influx de proteïnes com es pot veure a la Taula III i a la Figura 1.

L'administració intracisternal de 100 μg de factor activador de les plaquetes i 40 μg de l'antagonista del factor activador de les plaquetes va prevenir l'aparició d'edema cerebral (413.43 ± 15 vs 396 ± 4 grams d'aigua per 100 grams de teixit sec a les 4 hores, $p < 0.05$), com es veu a la Figura 2.

La discreta pleocitosi provocada per la inoculació intracisternal de 100 μg de factor activador de les plaquetes no es va veure modificada per la co-administració de l'antagonista del factor activador de les plaquetes, com

es pot veure a la Taula IV i la Figura 3.

La inoculació intracisternal de 100 μg del factor activador de les plaquetes, amb 0.2 μg , 4 μg i 20 μg de l'antagonista del factor activador de les plaquetes per via endovenosa, (en grups de 2 conills cada dosi) no va produir un bloqueig de l'augment de proteïnes, com es pot veure a la Taula V.

L'administració intracisternal de 0.2 μg de l'antagonista amb el factor activador de les plaquetes, tampoc no va bloquejar l'augment en la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica (Taula V).

L'administració de les dosis més baixes de l'antagonista del factor activador de les plaquetes, 0.2 μg per via endovenosa o intracisternal, no va prevenir l'aparició d'edema (403 i 417 \pm 3 grams d'aigua per 100 grams de teixit sec, respectivament).

L'administració simultània de 100 μg del factor activador de les plaquetes per via intracisternal i 4 i 20 μg de l'antagonista del factor activador de les plaquetes per via endovenosa va prevenir també l'aparició d'edema cerebral (393 \pm 3 i 395 \pm 3 grams d'aigua per 100 grams de teixit sec, respectivament, normal fins a 400 grams).

T A U L A I

Concentració de proteïnes (mg/ml) al LCR després de
l'administració de factor activador de les plaquetes.

	Dosi	
	20 µg	100 µg
0 h.	0.421±0.221	0.598±0.308
1 h.	0.685±0.304	1.529±0.417
2 h.	1.121±0.328	1.524±0.419
3 h.	1.203±0.171	1.534±0.437
4 h.	1.343±0.210*	1.551±0.334*

Mitjana ± Desviació estàndard.

* $p < 0.05$ en comparar 0 i 4 hores.

T A U L A II

Presència de leucòcits (cèl.lules/mm³) al LCR després de l'administració de factor activador de les plaquetes.

	Dosi	
	20 µg	100 µg
0 h.	57±18	29±10
1 h.	159±190	53±51
2 h.	158±292	92±50
3 h.	200±234	138±199
4 h.	527±529	110±107

Mitjana ± Desviació estàndard.

Activitat inflamatòria del factor activador de les plaquetes al LCR.

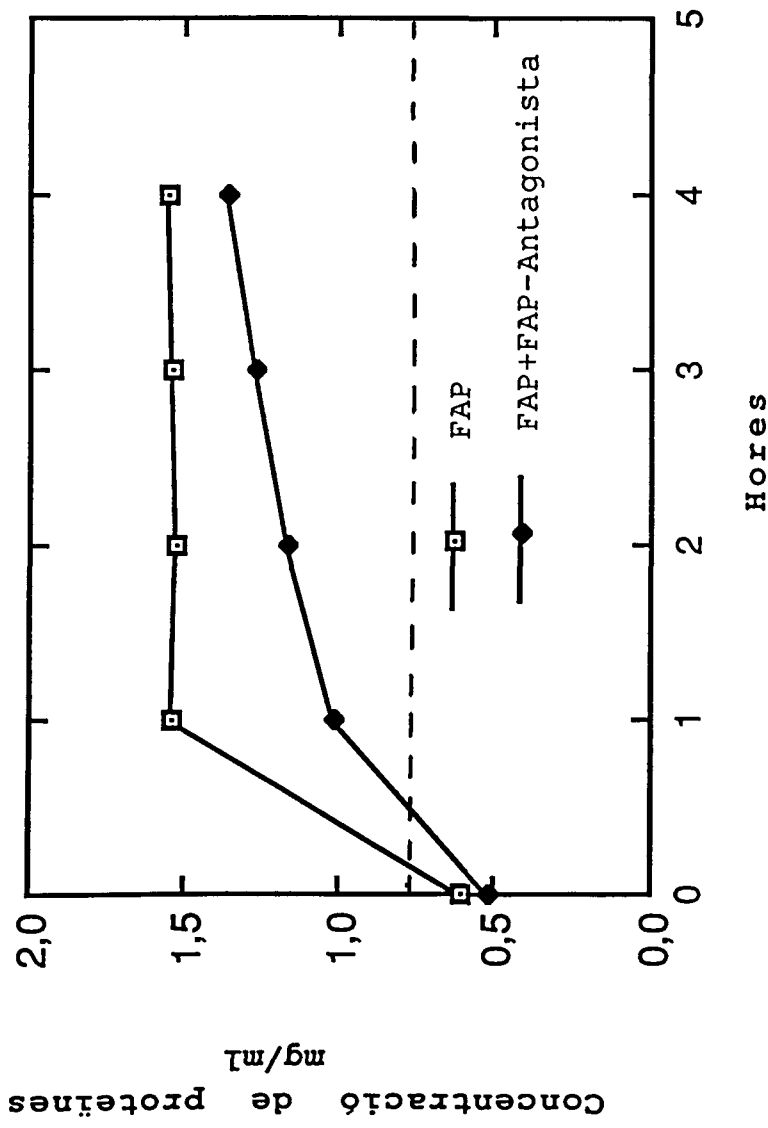


Figura 1

Edema cerebral

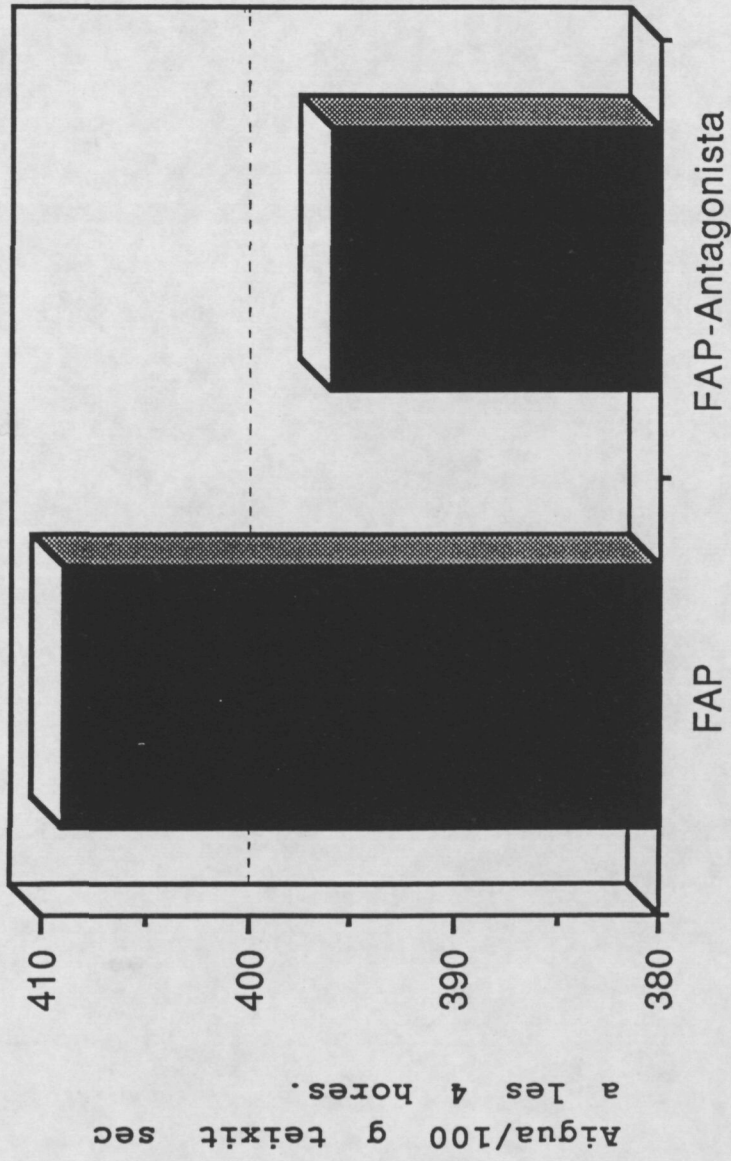


Figura 2

Activitat inflamatòria del factor activador de les plaquetes al LCR.

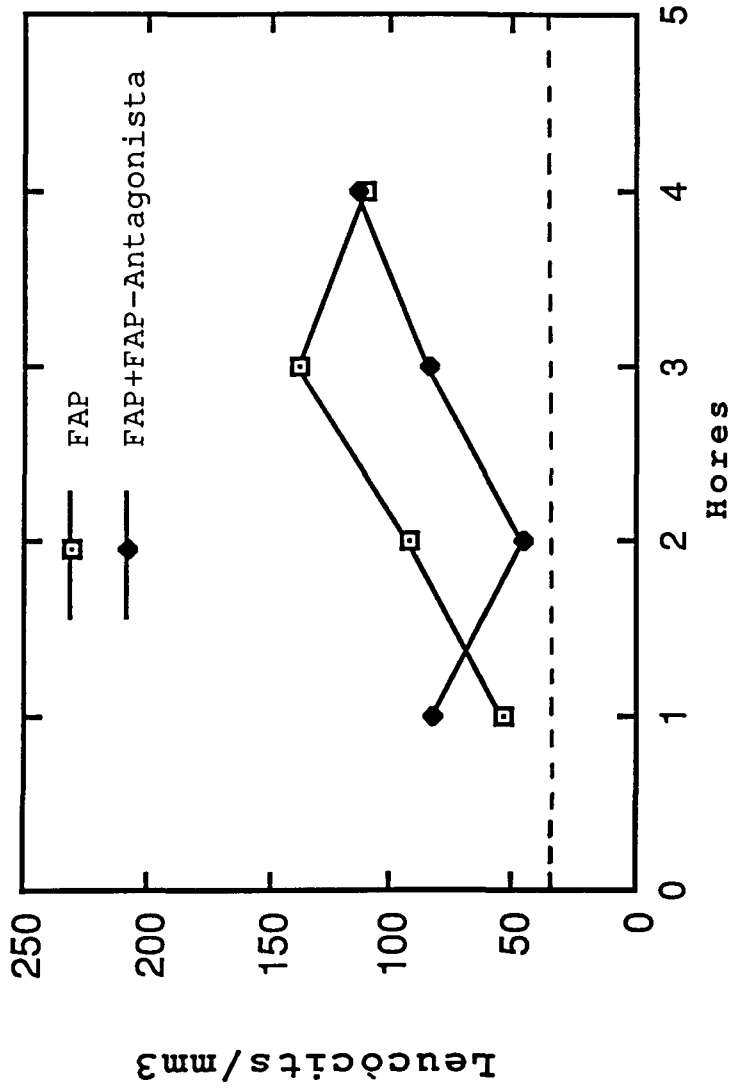


Figura 3

T A U L A III

Concentració de proteïnes (mg/ml) al LCR després de l'administració de 100 µg de factor activador de les plaquetes i modulació per l'administració de 40 µg d'antagonista del FAP.

	FAP	FAP+antagonista
0 h.	0.598±0.308	0.509±0.06
1 h.	1.529±0.417	1.015±0.238
2 h.	1.524±0.419	1.172±0.223
3 h.	1.534±0.437	1.265±0.321
4 h.	1.551±0.334	1.364±0.260

Mitjana ± Desviació estàndard.

FAP: Factor activador de les plaquetes.

T A U L A IV

Presència de leucòcits (cèl.lules/mm³) al LCR després del'administració de factor activador de les plaquetes i modulació per l'antagonista del FAP.

	FAP	FAP+antagonista
0 h.	29±10	151±89
1 h.	53±51	83±59
2 h.	92±50	46±17
3 h.	138±199	84±14
4 h.	110±107	113±88

Mitjana ± Desviació estàndard.

FAP: Factor activador de les plaquetes.

T A U L A V

Concentració de proteïnes (mg/ml) al LCR, després de l'administració de factor activador de les plaquetes (100 µg) i dosis baixes de l'antagonista.

	Dosi			
	0.2 µg e.v.	4 µg e.v.	20 µg e.v.	0.2 µg i.c.
0 h.	0.764±0.141	1.448±0.680	0.623±0.04	0.143±0.013
1 h.	1.425±0.015	2.279±0.065	1.675±0.363	1.252±0.081
2 h.	1.948	1.252±0.753	1.868±0.227	1.495±0.102
3 h.	2.030	2.338±0.206	1.425±0.665	1.448±0.045
4 h.	1.894	2.414±0.217	1.585±0.744	1.468±0.07

Mitjana ± Desviació estàndard.

5.2 Activitat inflammatòria del factor activador de les plaquetes al pulmó.

5.2.1 Inoculació intratraqueal del factor activador de les plaquetes.

L'administració intratraqueal de 100 µg del factor activador de les plaquetes al pulmó, en 7 conills, va induir un augment ràpid a la concentració de proteïnes al líquid del rentat broncoalveolar (0.630 ± 0.304 mg/ml a la primera hora) similar a la vista al LCR.

Contrastant amb l' absència d'important pleocitosi al LCR, l'administració intratraqueal de 100 µg del factor activador de les plaquetes va produir acúmulo de leucòcits al rentat broncoalveolar (64.4 ± 42 cèl.lules/mm³ a 1 hora) (Taula VI). En els controls el límit superior de la normalitat va ser de 0.4 cèl.lules/mm³ i 0.1 mg/ml de proteïnes.

5.2.2 Modulació per l'administració simultània de l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

L'administració simultània de 100 µg del factor activador de les plaquetes per via intratraqueal i 200 µg de l'antagonista del factor activador de les plaquetes per via endovenosa, en 6 conills, va reduir l'influx de

proteïnes (0.302 ± 0.08 mitja mg/ml a 1 hora $p=0.08$). Quant a la presència de leucòcits al rentat broncoalveolar, es va reduir fins a 40 ± 13 cèl.lules per mm^3 , com es pot veure a la Taula VI.

T A U L A VI

Activitat inflamatòria del factor activador de les plaquetes (100 μg) al rentat broncoalveolar, i modulació per l'antagonista (200 μg).

	Leucòcits/ mm^3	Proteïnes (mg/ml)
FAP	64.4 \pm 42	0.630 \pm 0.304
FAP+Antagonista	40 \pm 13	0.302 \pm 0.08*

Mitjana \pm Desviació estàndard.

Límit superior de la normalitat: 0.4 cèl.lules/ mm^3 ; 0.1 mg de proteïnes/ml de fluid pulmonar.

* $p=0.08$

5.3 Paper del factor activador de les plaquetes a la inflamació pneumocòcica. Model de meningitis.

5.3.1 Inoculació intracisternal de *S. pneumoniae*.

Un cop estudiada l'activitat inflamatòria del factor activador de les plaquetes al LCR i al pulmó, es va determinar la contribució del factor activador de les plaquetes a la infecció pneumocòcica natural, comparant la resposta produïda per la inoculació de *S. pneumoniae*, amb la produïda per l'administració conjunta de *S. pneumoniae* i l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

La inoculació intracisternal de 10^5 equivalents cel·lulars de la soca R6 inactivada per calor, en 4 conills, va produir augment en la concentració de proteïnes detectable a les 2 hores, 1.618 ± 0.506 mg/ml, i fins a 2.210 ± 0.388 mg/ml a les 6 hores ($p < 0.05$), com es veu a la Taula VII i a la Figura 4.

El mateix inòculum va produir una marcada pleocitosi que a les 2 hores era de 134 ± 45 cèl.lules/mm³, per pujar a les 4 hores a 4843 ± 3407 cèl.lules/mm³, i a les 6 hores a 7168 ± 660 cèl.lules/mm³, ($p < 0.05$) com es pot observar a la Taula VIII i a la Figura 5.

Aquest inòculum, no va produir edema cerebral (385 ± 5

grams d'aigua per 100 grams de teixit sec), quan es va examinar a les 6 hores, probablement perquè la infecció natural, precisa més temps per produir edema cerebral.

5.3.2 Modulació de l'activitat inflamatòria per l'administració conjunta de *S. pneumoniae* i l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

L'administració conjunta de *S. pneumoniae* intracisternal i 40 µg de l'antagonista del factor activador de les plaquetes, en 4 conills, va produir un retard en l'augment en la concentració de proteïnes al LCR de dues hores aproximadament, i les concentracions finals van ser de 2.210 ± 0.388 vs 1.505 ± 0.187 mg/ml a les 6 hores, com es pot veure a la Taula VII i la Figura 4, encara que aquest retard i el nivell final més baix no va assolir significació estadística, potser perquè el nombre d'animals que es van poder utilitzar és petit.

La dosi de 40 µg de l'antagonista del factor activador de les plaquetes per via intracisternal, administrada conjuntament amb *S. pneumoniae*, va disminuir la pleocitosi (7168 ± 660 vs 1523 ± 1168 cèl.lules per mm³ a les 6 hores $p=0.06$) com es pot veure a la Figura 5 i a la Taula VIII.

L'administració de dosis més baixes de l'antagonista del factor activador de les plaquetes, 4 µg i 20 µg, per

via endovenosa, en grups de dos conills, no va ser capaç de frenar l'augment a la concentració de proteïnes (2.458 ± 0.156 i 1.937 ± 0.504 mg/ml a les 4 hores i 1.985 ± 0.06 i 2.084 ± 0.330 mg/ml a les 6 hores, respectivament) com es pot veure a la Taula IX.

L'administració de dosis més baixes, $4 \mu\text{g}$ i $20 \mu\text{g}$, per via endovenosa, de l'antagonista del factor activador de les plaquetes no va produir disminució de la pleocitosi (4600 ± 388 i 4933 ± 254 cèl.lules / mm^3 respectivament) com es pot veure a la Taula X.

5.3.3 Inoculació intracisternal de *S. pneumoniae* i *H. influenzae* vius i modulació per l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

La inoculació intracisternal de 10^5 ufc *S. pneumoniae* R6 vius, va produir pleocitosi, que a les 6 hores era de 2257 ± 359 cèl.lules/ mm^3 . Amb l'administració intracisternal de $40 \mu\text{g}$ de l'antagonista del factor activador de les plaquetes al mateix temps de l'inòcul bacterià, aquesta pleocitosi va ser de 335 ± 68 cèl.lules/ mm^3 a les 6 hores ($p < 0.05$), com es veu a la Taula XI. Aquesta capacitat de l'antagonista del factor activador de les plaquetes per reduir la pleocitosi generada pel pneumococ, similar a la vista en els experiments amb pneumococs inactivats per calor i amb components pneumocòcics, no es va reproduir

utilitzant la soca Egan de *H. influenzae*. Després de la inoculació intracisternal de 10^5 ufc, la pleocitosi a les 6 hores era de 2766 ± 228 cèl.lules/mm³, i amb l'administració simultània de 40 µg de l'antagonista del factor activador de les plaquetes era de 2614 ± 365 cèl.lules/mm³, com es pot veure a la Taula XI.



T A U L A VII

Concentració de proteïnes (mg/ml) al LCR després de l'administració i.c. de *S. pneumoniae* R6 inactivat per calor i modulació amb l'antagonista del FAP.

	R6	R6+Antagonista
0 h.	1.081±0.285	0.536±0.07
2 h.	1.618±0.506	1.206±0.324
4 h.	2.145±0.375	1.508±0.102
6 h.	2.210±0.388*	1.505±0.187

Mitjana ± Desviació estàndard.

FAP: Factor activador de les plaquetes.

* $p < 0.05$ en comparar 0 i 6 hores.

T A U L A VIII

Presència de leucòcits (cèl.lules/mm³) després de l'administració i.c. de *S.pneumoniae* R6 inactivat per calor i modulació per l'antagonista del FAP.

	R6	R6+Antagonista
0 h.	252±239	177±216
2 h.	134±45	28±7
4 h.	4843±3407	1719±1222
6 h.	7168±660*	1523±1168**

Mitjana ± Desviació estàndard.

* p<0.05 en comparar 0 i 6 hores.

** p<0.05 en comparar a les 6 hores R6 i R6+Antagonista.

FAP: Factor activador de les plaquetes.

Activitat inflamatòria de *S. pneumoniae* i modulació per l'antagonista del FAP

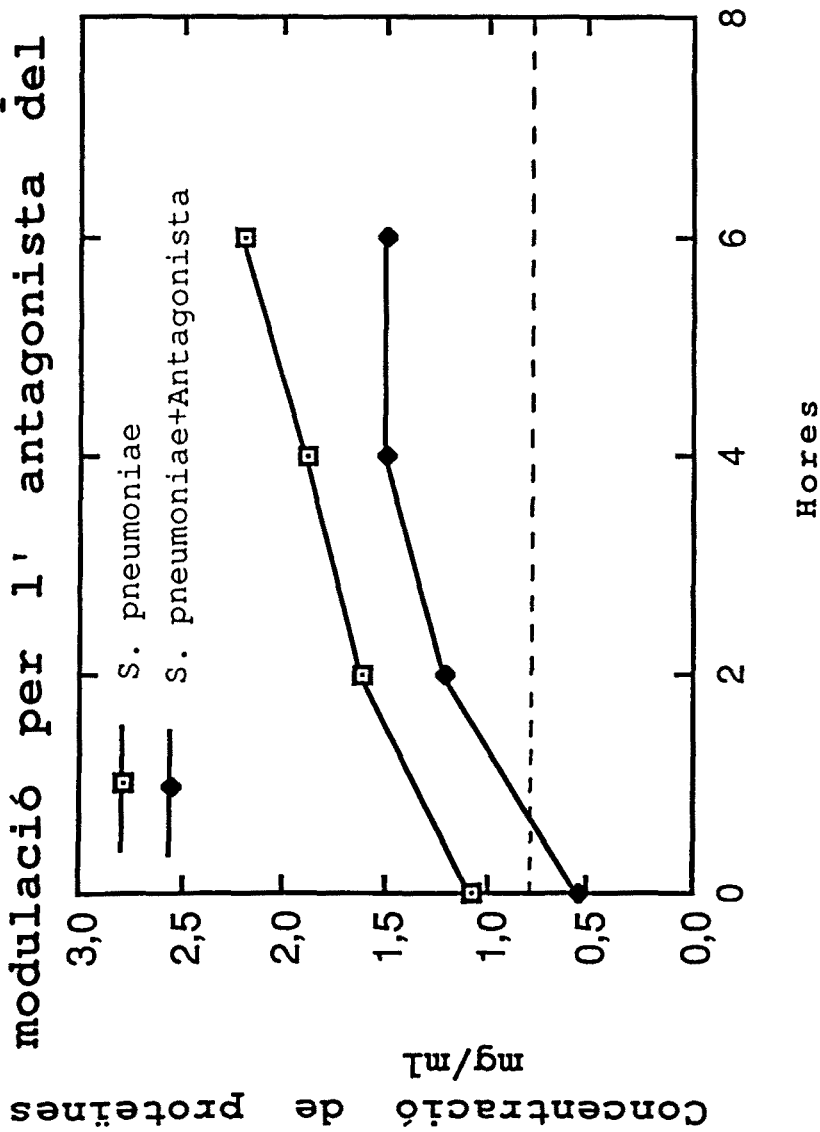


Figura 4

Activitat inflamatòria de *S. pneumoniae* i modulació per l'antagonista del FAP

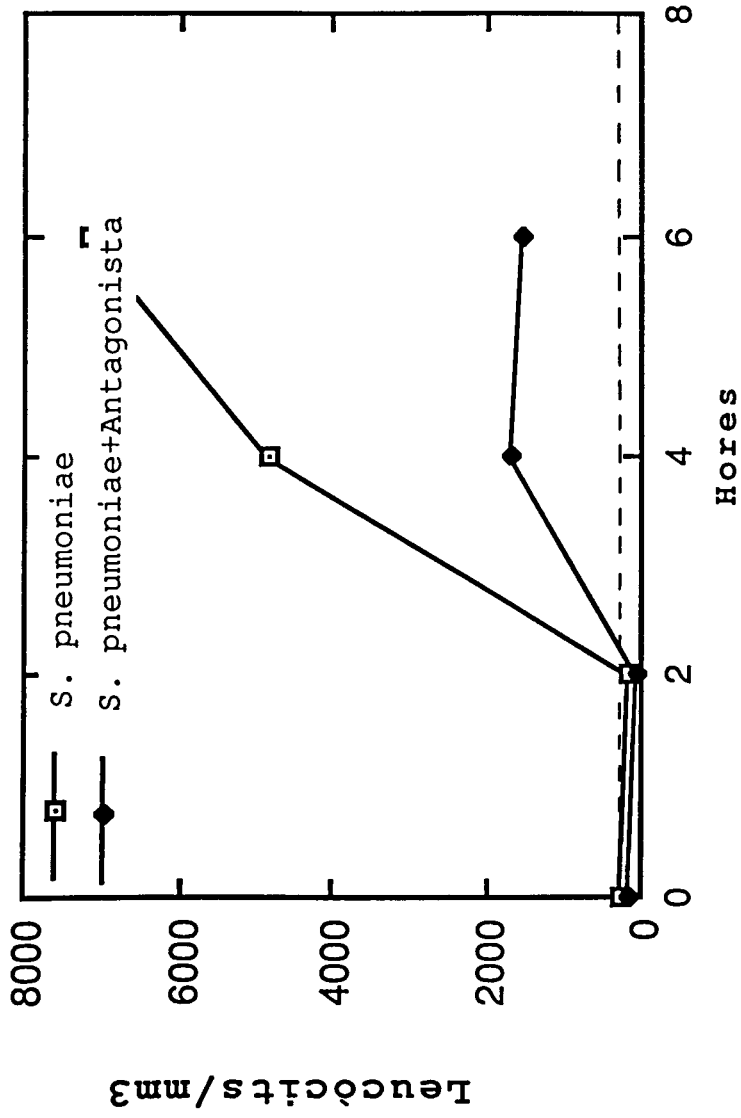


Figura 5

T A U L A IX

Concentració de proteïnes (mg/ml) al LCR després de l'administració i.c. de *S. pneumoniae* R6 inactivat per calor i dosis baixes de l'antagonista del FAP, per via endovenosa.

	R6+4μg antagonista	R6+20μg antagonista
0 h.	1.382 \pm 0.09	0.828 \pm 0.115
2 h.	1.753 \pm 0.153	1.561 \pm 0.584
4 h.	2.458 \pm 0.156	1.937 \pm 0.504
6 h.	1.985 \pm 0.06	2.084 \pm 0.330

Mitjana \pm Desviació estàndard.

FAP: Factor activador de les plaquetes.

T A U L A X

Presència de leucòcits (cèl.lules/mm³) al LCR després de l'administració i.c. de *S. pneumoniae* inactivat per calor i dosis baixes de l'antagonista del FAP.

	R6+4µg antagonista	R6+20µg antagonista
0 h.	153±97	88±6
2 h.	114±85	119±11
4 h.	4289±347	1804±366
6 h.	4600±388	4933±254

Mitjana ± Desviació estàndard.

FAP: Factor activador de les plaquetes.

T A U L A XI

Efecte de l'antagonista del factor activador de les plaquetes en la pleocitosi produïda per la inoculació intracisternal de 10^5 ufc de *S. pneumoniae* viu o *H. influenzae* viu.

	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>
Bactèries soles	2257±359	2766±228
Bactèries+Antagonista	335±68*	2614±365

Mitjana ± Desviació estàndar de cèl.lules/mm³ a les 6 hores.

* $p < 0.05$

5.4 Paper del factor activador de les plaquetes a la inflamació pneumocòcica. Model de pneumònia.

5.4.1 Inoculació intratraqueal de *S. pneumoniae*.

La inoculació intratraqueal de 10^5 equivalents cel·lulars de la soca R6 de *S. pneumoniae* en 5 conills, va provocar augment de la concentració de proteïnes al rentat broncoalveolar (0.467 ± 0.172 mg/ml a les 3 hores), com es pot veure a la Taula XI.

Aquest mateix inòculum va produir presència de leucòcits al rentat broncoalveolar (87 ± 45 cèl.lules /mm³ a les 3 hores), com es pot veure a la Taula XI.

5.4.2 Modulació de l'activitat inflamatòria per l'administració conjunta de *S. pneumoniae* i l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

L'administració endovenosa de 200 µg de l'antagonista del factor activador de les plaquetes, al mateix temps de la inoculació intratraqueal de *S. pneumoniae*, va reduir la concentració de proteïnes al rentat broncoalveolar (0.244 ± 0.04 mg/ml a les 3 hores), com es pot veure a la Taula XI.

La presència de leucòcits al rentat broncoalveolar

només es va veure parcialment reduïda, (64 ± 17 cèl.lules/ mm^3) a les 3 hores, en utilitzar les mateixes dosis i el mateix inòculum (Taula XI).

La capacitat de l'antagonista del factor activador de les plaquetes per prevenir l'acúmul de leucòcits durant la infecció per *S. pneumoniae* va ser molt més gran a l'espai subaracnoïdal que al pulmó.

La presència de leucòcits residual al pulmó, independent de l'activitat del factor activador de les plaquetes, va ser eliminada per l'administració conjunta de l'antagonista del factor activador de les plaquetes i l'anticòs monoclonal IB4, com es detalla a continuació.

5.4.3 Modulació de l'activitat inflamatòria per l'administració conjunta de *S. pneumoniae* i l'anticòs IB4.

L'administració d'anticòs IB4, 400 μl (0.5 mg/proteïna purificada per conill) per via endovenosa, al mateix temps de l'administració intratraqueal de *S. pneumoniae*, no va produir una reducció en la concentració de proteïnes al rentat broncoalveolar (0.424 ± 0.111 mitja mg/ml a les 3 hores), com es pot veure a la Taula XI.

Tampoc va reduir l'acúmul de leucòcits al rentat broncoalveolar (74 ± 2 cèl.lules/ mm^3) (Taula XI).

5.4.4 Modulació de l'activitat inflamatòria de *S. pneumoniae* per l'administració simultània de l'antagonista del factor activador de les plaquetes i l'anticòs IB4.

L'administració conjunta de l'antagonista del factor activador de les plaquetes, 200 µg per via endovenosa, i l'anticòs monoclonal IB4 400 µl (0.5 mg de proteïna purificada per conill) per via endovenosa, al mateix temps de l'administració intratraqueal de 10⁸ equivalents cel·lulars de la soca R6 de *S. pneumoniae*, va aconseguir reduir la concentració de proteïnes al rentat broncoalveolar (0.165 ± 0.102 mg/ml a les 3 hores, p<0.05) (Taula XII).

També la presència de leucòcits, independent de l'activitat del factor activador de les plaquetes, va ser reduïda (35 ± 9 de cèl.lules /mm³ a les 3 hores), com es pot veure a la Taula XII.

T A U L A XII

Activitat inflamatòria de *S. pneumoniae* R6 inactivat per calor al rentat broncoalveolar.

	Cèl.lules/mm ³	Proteïnes mg/ml
R6	87±45	0.467±0.172
R6+antagonista	64±17	0.244±0.04
R6+IB4	74±2	0.424±0.111
R6+antagonista+IB4	35±9	0.165±0.102*

Mitjana ± Desviació estàndard.

* p<0.05

5.5 Neutralització creuada de la inflamació produïda pel factor activador de les plaquetes i la paret cel.lular pneumocòcica, per mitjà d' anticossos anti-paret i l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

5.5.1 Administració intracisternal de paret cel.lular pneumocòcica.

L'administració intracisternal de 50 μg de paret cel.lular pneumocòcica va provocar augment en la concentració de proteïnes al LCR, des de la segona hora (1.243 ± 0.435 mg/ml) fins un màxim de 2.194 ± 0.378 a les 6 hores ($p < 0.05$), (Taula XIII i Figura 6).

La inoculació intracisternal d'aquesta mateixa dosi de paret cel.lular va provocar pleocitosi, des de les 3 hores (547 ± 465 cèl.lules/ mm^3), que a les 6 hores era de 3584 ± 1175 cèlul.les/ mm^3 ($p < 0.05$) (Taula XIV i Figura 7).

Els conills inoculats amb 50 μg de paret cel.lular pneumocòcica van presentar edema cerebral quan es va examinar a les 6 hores, 411 ± 20 grams d'aigua per 100 grams de teixit sec.

5.5.2 Modulació de l'activitat inflammatòria de la paret cel.lular pneumocòcica per l'anticòs TEPC-15.

L'anticòs TEPC-15 és un anticòs anti-fosforilcolina que s'uneix als components de la paret que posseeixen àcid teicoic.

L'administració intracisternal de 0.1 mg de proteïna purificada per conill, al mateix temps de la inoculació intracisternal de 50 µg de paret cel.lular pneumocòcica va bloquejar la pleocitosi generada per la paret cel.lular pneumocòcica (3584 ± 1175 vs 32 ± 10 cèl.lules/mm³ a les 6 hores $p < 0.05$) (Taula XV i Figures 7 i 8). L'anticòs TEPC-15 administrat intracisternalment és també capaç de neutralitzar la pleocitosi generada al LCR per l'administració de pneumococ R6 inactivat per calor, 3338 ± 1175 vs 85 ± 9 cèl.lules/mm³ a les 6 hores $p < 0.05$, com es veu a la Figura 8.

5.5.3 Modulació de l'activitat inflammatòria generada per la paret cel.lular pneumocòcica, per l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

L'augment en la concentració de proteïnes generada per la inoculació intracisternal de 50 µg de paret cel.lular pneumocòcica es va veure considerablement disminuït per l'administració conjunta de 40 µg intracisternals de l'antagonista del factor activador de les plaquetes (1.829

± 0.362 vs 0.877 ± 0.056 mg/ml a les 4 hores i 2.194 ± 0.378 vs 1.309 ± 0.03 mg/ml a les 6 hores) com es pot veure a la Figura 6 i a la Taula XIII.

Quant a la pleocitosi, l'administració conjunta de la mateixa dosi de l'antagonista del factor activador de les plaquetes va bloquejar pràcticament l'acúmulo de leucòcits, 2298 ± 1616 vs 149 ± 49 cèl.lules/mm³ a les 4 hores i 3584 ± 1175 vs 383 ± 50 cèl.lules/mm³ a les 6 hores, $p < 0.05$, com es veu a la Taula XIV i a la Figura 7.

L'antagonista del factor activador de les plaquetes, no va ser capaç de bloquejar l'aparició d'edema cerebral, 411 ± 20 vs 412 ± 1 .

5.5.4 Administració intracisternal d'àcid lipoteicoic.

L'administració intracisternal de $100 \mu\text{g}$ de àcid lipoteicoic pneumocòcic (Antigen de Forssman) va produir un augment en la concentració de proteïnes que era de 1.054 mg/ml a les 3 hores i 2.315 mg/ml a les 6 hores, com es pot veure a la Taula XVI.

La mateixa dosi d'àcid lipoteicoic pneumocòcic va provocar pleocitosi a l'espai subaracnoïdal, que era de 504 cèl.lules/mm³ a les 3 hores i de 1071 cèl.lules/mm³ a les 6 hores, (Taula XVII i Figura 9).

L'àcid lipoteicoic pneumocòcic, va provocar també edema cerebral 410.5 ± 0.5 grams d'aigua per 100 grams de teixit sec.

5.5.5 Modulació de la inflamació provocada per l'àcid lipoteicoic pneumocòcic per l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

L'administració intracisternal conjunta de $100 \mu\text{g}$ d'àcid lipoteicoic pneumocòcic i de $40 \mu\text{g}$ de l'antagonista del factor activador de les plaquetes no va resultar en disminució en la concentració de proteïnes generada per l'acció de l'àcid lipoteicoic pneumocòcic (2.315 vs 1.841 ± 0.175 mg/ml a les 6 hores) Taula XVI.

Tampoc no va ser capaç d'evitar la pleocitosi, 1071 vs 2068 ± 56 mg/ml a les 6 hores, com es pot veure a la Taula XVII i la figura 9.

L'antagonista del factor activador de les plaquetes tampoc no va evitar l'aparició d'edema cerebral 410.5 ± 0.5 vs 410 ± 0.5 grams d'aigua per 100 grams de teixit sec.

5.5.6 Modulació de l'activitat inflamatòria generada pel factor activador de les plaquetes per l'anticòs TEPC-15.

L'administració intracisternal de $100 \mu\text{g}$ del factor

activador de les plaquetes i 100 μ l de TEPC-15 (0.1 mg de proteïna purificada per conill), va reduir l'edema cerebral produït pel factor activador de les plaquetes (413 ± 15 vs 393 ± 4 grams d'aigua per 100 grams de teixit sec, $p < 0.05$, Figura 10).

Quant a la concentració de proteïnes al LCR, l'administració de l'anticòs no va evitar l'augment en la concentració de proteïnes (1.6 ± 0.3 vs 1.8 ± 0.4 mg/ml a les 4 hores, $p > 0.05$, Figura 11), si bé en 2 conills es va produir una ràpida disminució des de 2.904 ± 0.061 mg/ml a les 2 hores fins a 1.485 ± 0.536 a les 4 hores.

La moderada pleocitosi generada per l'administració intracisternal del factor activador de les plaquetes no es va veure influïda per l'administració de l'anticòs (110 ± 107 vs 137 ± 73 cèl.lules/ mm^3 a les 4 hores).

T A U L A XIII

Concentració de proteïnes (mg/ml) al LCR després de l'administració de paret cel.lular pneumocòcica (50 µg) i modulació per l'antagonista del FAP (40 µg).

	Paret cel.lular	Paret cel.lular+antagonista
0 h.	0.757±0.22	0.569±0.028
1 h.	0.746±0.133	0.675±0.074
2 h.	1.243±0.435	0.783±0.069
3 h.	1.644±0.601	0.858±0.058
4 h.	1.829±0.362	0.877±0.056
5 h.	2.087±0.382	1.043±0.079
6 h.	2.194±0.378*	1.309±0.03

Mitjana ± Desviació estàndard.

* p<0.05

FAP: Factor activador de les plaquetes.

T A U L A X I V

Presència de leucòcits (cèl.lules/mm³) al LCR després de l'administració de paret cel.lular pneumocòcica (50 µg) i modulació per l'antagonista del FAP (40 µg).

	Paret cel.lular	Paret cel.lular+antagonista
0 h.	111±22	494±108
1 h.	40±3	24±10
2 h.	53±24	10±1
3 h.	547±465	34±7
4 h.	2298±1616	149±49
5 h.	3901±2018	258±89
6 h.	3584±1175*	383±50**

Mitjana ± Desviació estandard.

* p < 0.05 en comparar 0 i 6 hores.

** p < 0.05 en comparar a les 6 hores paret cel.lular i paret cel.lular+antagonista.

FAP: Factor activador de les plaquetes.

Activitat inflammatòria de la paret cel.lular i modulació per l' antagonista del FAP

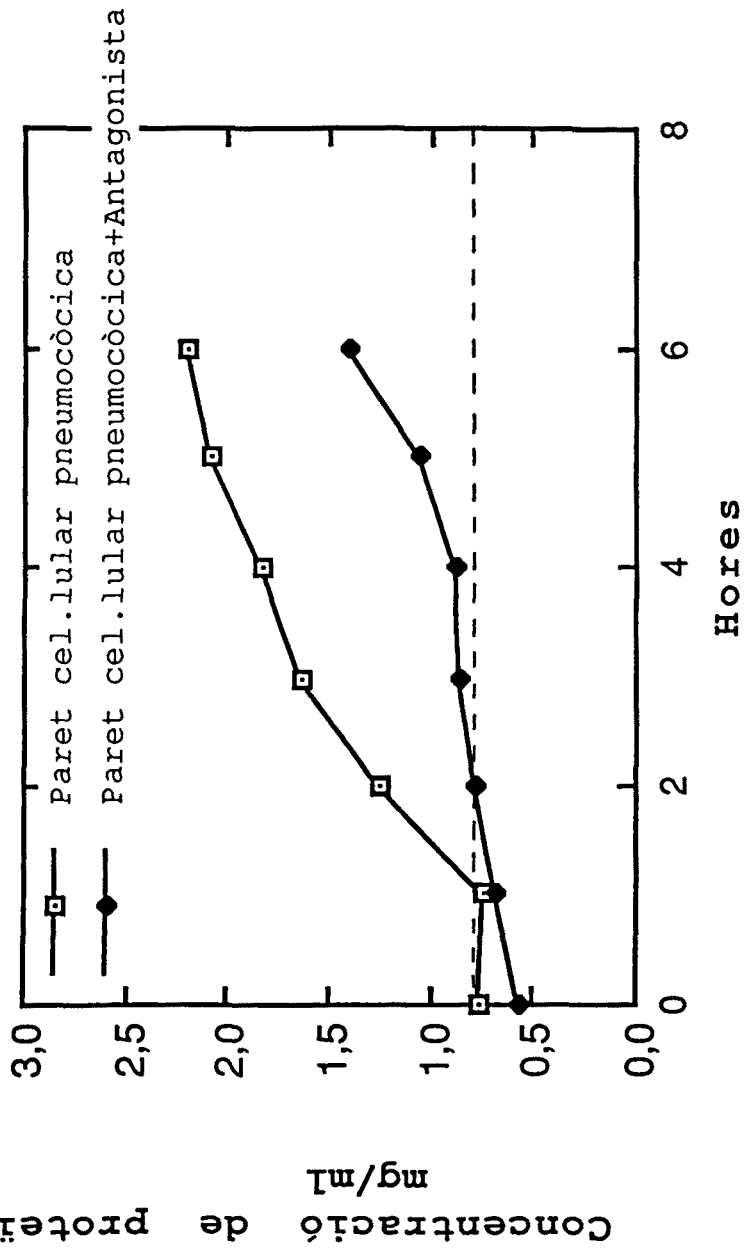


Figura 6

Activitat inflamatòria de la paret cel.lular i modulació per l' antagonista del FAP o TEPC

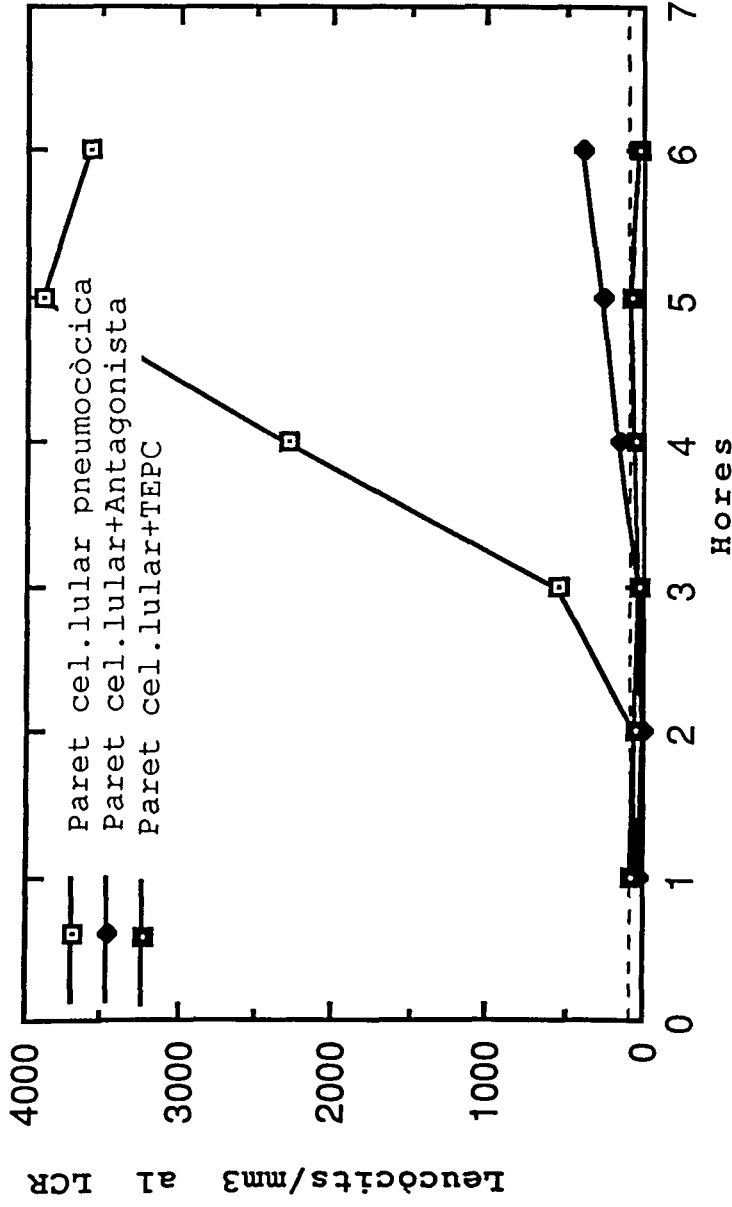


Figura 7

T A U L A XV

Presència de leucòcits (cèl.lules/mm³) al LCR després de l'administració de paret cel.lular pneumocòcica i modulació per l'anticòs TEPC-15.

	Paret cel.lular	Paret cel.lular+TEPC-15
0 h.	111±22	25±1
1 h.	40±3	80±21
2 h.	53±24	44±11
3 h.	547±465	20±6
4 h.	2298±1616	46±10
5 h.	3901±2018	66±40
6 h.	3584±1175	32±10*

Mitjana ± Desviació estandard.

* p < 0.05

Modulació de l'activitat inflamatòria dels components pneumocòccics per l'anticòs TEPC

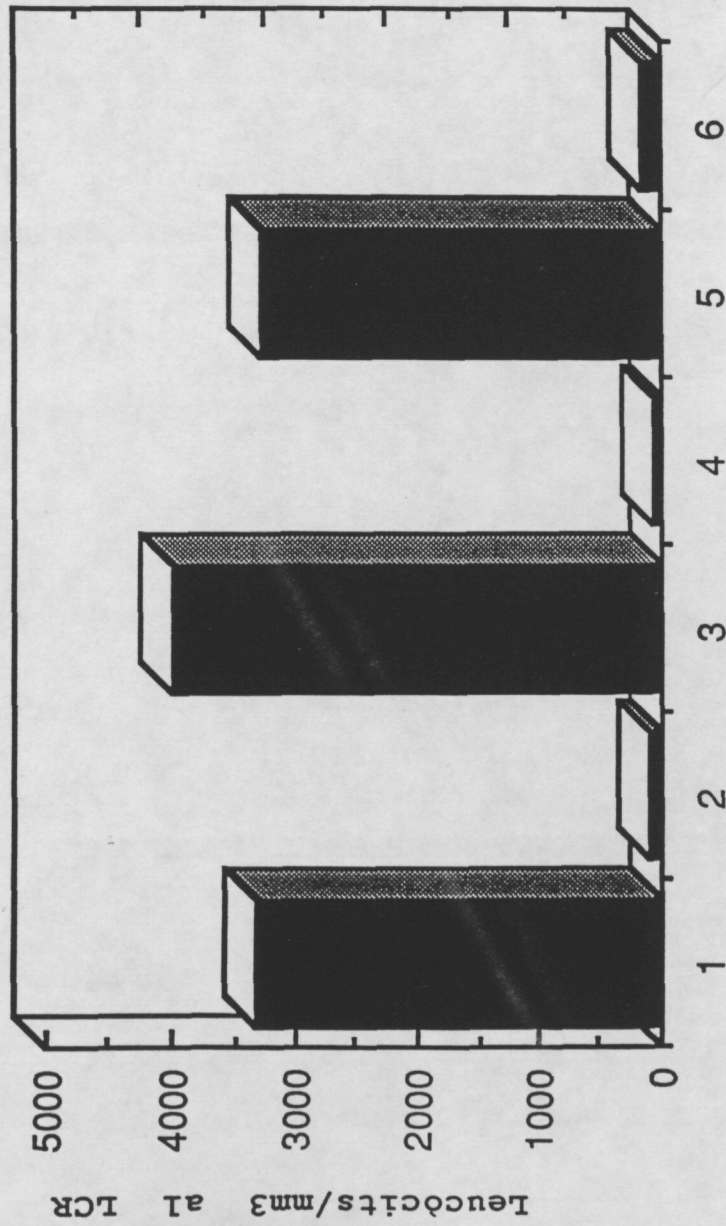


Figura 8

1. *S. pneumoniae*

2. *S. pneumoniae*+TEPC

3. Paret cel.lular pneumocòccica

4. Paret cel.lular pneumocòccica+TEPC

5. Acid lipoteicoic

6. Acid lipoteicoic+TEPC

Modulació de l'activitat inflamatòria dels components pneumocòccics per l'antagonista del FAP

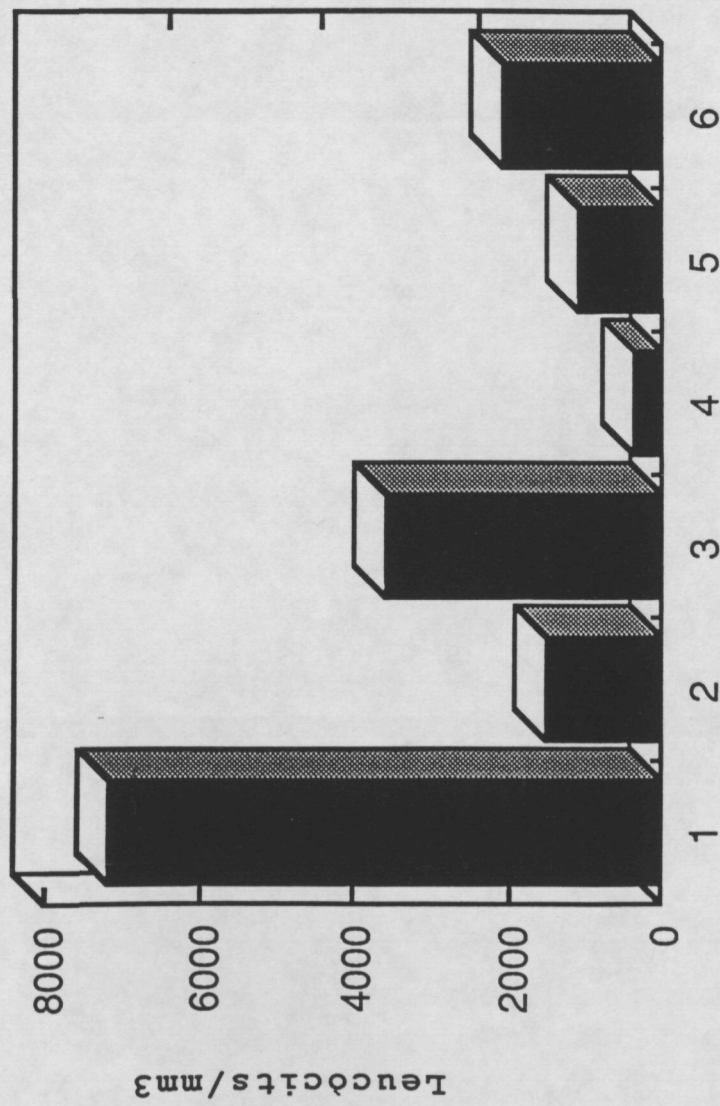


Figura 9

1. *S. pneumoniae*
2. *S. pneumoniae*+A-FAP
3. Paret cel.lular pneumocòccica
4. Paret cel.lular pneumocòccica+A-FAP
5. Acid lipoteicoic
6. Acid lipoteicoic+A-FAP

T A U L A XVI

Concentració de proteïnes (mg/ml) al LCR després de l'administració de 100 µg d'àcid lipoteicoic pneumocòcic i modulació per l'antagonista del FAP (40 µg).

	Acid lipoteicoic	Acid lipoteicoic+antagonista
0 h.	0.522*	0.807±0.126
1 h.	0.778*	0.916±0.158
2 h.	0.900*	0.907±0.074
3 h.	1.054*	1.115±0.027
4 h.	1.758*	1.467±0.230
5 h.	1.764*	1.786±0.315
6 h.	2.315*	1.841±0.175

Mitjana ± Desviació estandard.

* La resta d'animals van morir.

FAP: Factor activador de les plaquetes.

T A U L A XVII

Presència de leucòcits (cèl.lules/mm³) al LCR després de l'administració de 100 µg d'àcid lipoteicoic pneumocòcic i modulació per l'antagonista del FAP (40 µg).

	Acid lipoteicoic	Acid lipoteicoic+antagonista
0 h.	45±5	179±19
1 h.	168±79	12±7
2 h.	55*	29±16
3 h.	504*	725±549
4 h.	1113*	2857±698
5 h.	1635*	4944±474
6 h.	1071*	2968±56

Mitjana ± Desviació estandard.

* La resta d'animals van morir.

FAP: Factor activador de les plaquetes.

Modulació de l' edema cerebral induït
pel FAP per l'anticòs TEPC

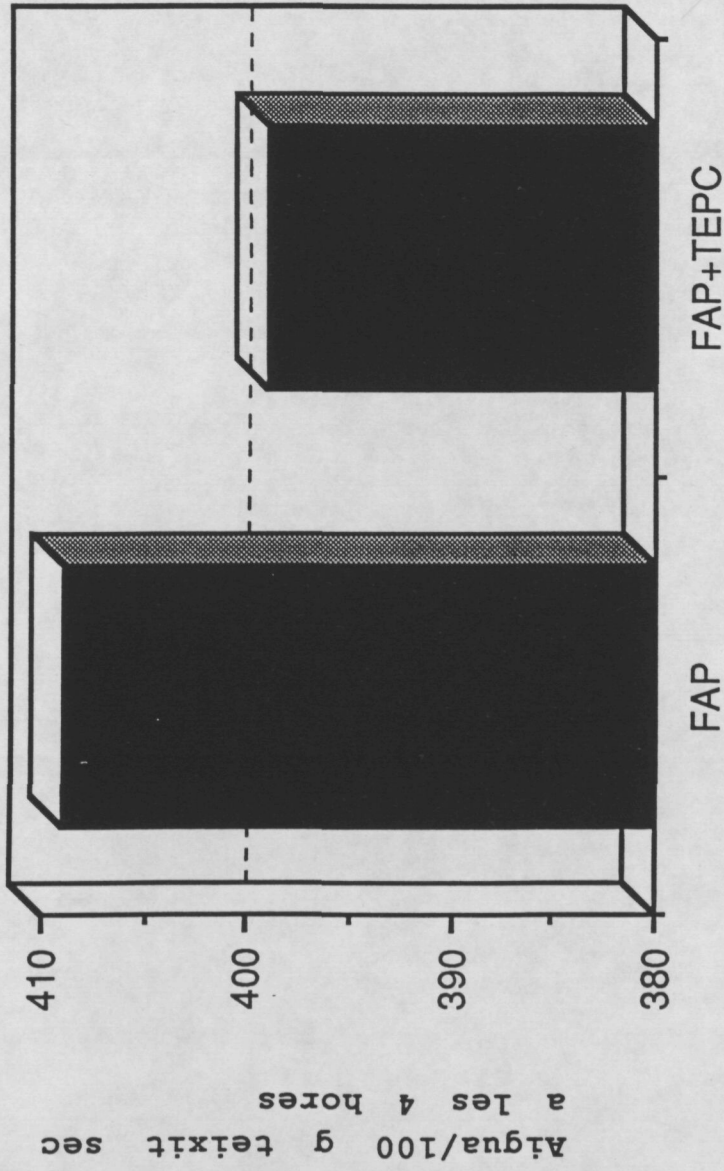


Figura 10

Modulació de l'activitat inflamatòria del factor activador de les plaquetes per l'anticòs TEPC

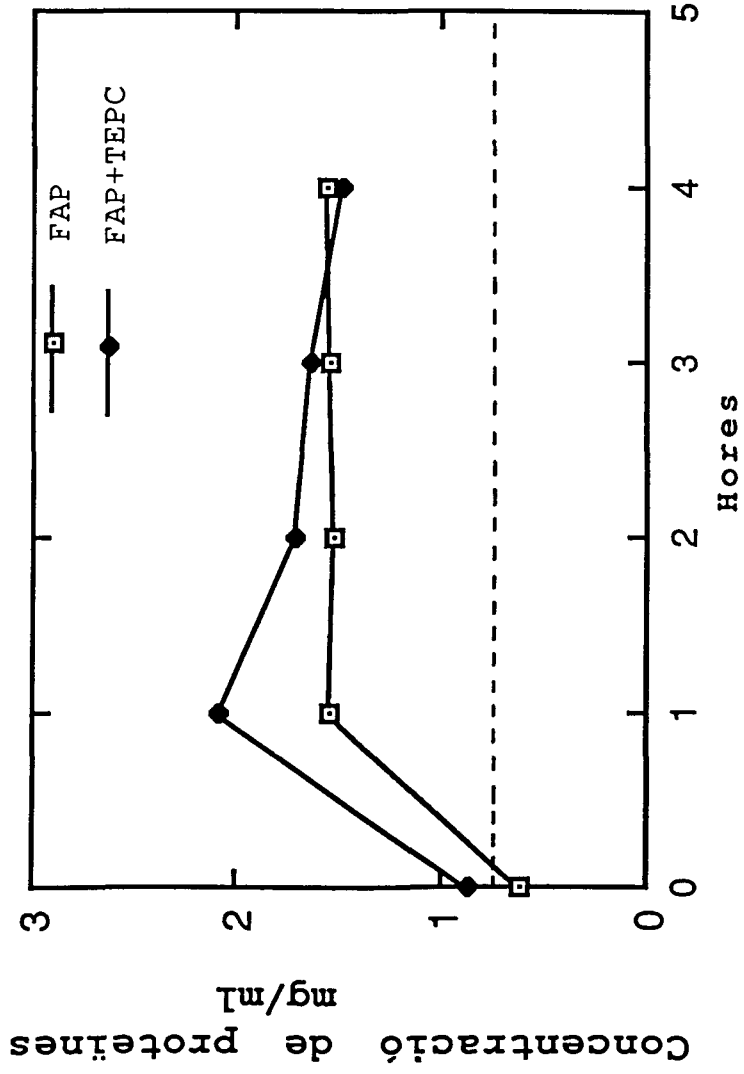


Figura 11

5.6 Assaig *in vitro*.

5.6.1 Inducció d'agregació plaquetar.

La capacitat de la paret cel.lular i de l'àcid teicoic pneumocòcics per reproduir l'acció del factor activador de les plaquetes es va estudiar en un assaig *in vitro* d'agregació plaquetar.

El factor activador de les plaquetes va produir agregació plaquetar dosi-depenent, que amb 0.03 nM de factor activador de les plaquetes va ser de 3.1 ± 4 % de la resposta màxima, i amb 10 nM de 79.8 ± 11 % de la resposta màxima (Taula XVIII).

En el mateix assaig 2 $\mu\text{g/ml}$ de paret cel.lular pneumocòcica van ser totalment inactius i 20 $\mu\text{g/ml}$ van produir 3.1 ± 4 % de la resposta màxima, com es veu a la Taula XVIII. Segons aquests resultats, 20 μg de paret cel.lular conté <1 nM d'equivalent d'activitat de factor activador de les plaquetes.

De la mateixa manera, l'àcid lipoteicoic pneumocòcic també va ser inactiu a l'assaig, i només amb 20 $\mu\text{g/ml}$ es va aconseguir un 2.0 ± 6 % de la resposta màxima, com es veu a la Taula XVIII.

A l'assaig per inhibició competitiva ni la paret cel.lular pneumocòcica ni l'àcid lipoteicoic pneumocòcic, no van aconseguir competir amb el factor activador de les plaquetes, contrastant amb la inhibició competitiva dosi-dependent que va presentar l'antagonista del factor activador de les plaquetes EC_{50} usat com a control.

5.6.2 Inducció de degranulació de neutròfils.

En l'assaig de degranulació de neutròfils el control de sèrum fisiològic va induir una producció d'elastasa, mesurat en unitats de fluorescència de 217 ± 4 . L'antagonista del factor activador de les plaquetes ($1 \mu M$) va produir 1687 ± 6 unitats de fluorescència. Aquesta resposta va ser bloquejada per l'antagonista ja que usant com a estímul el factor activador de les plaquetes i l'antagonista simultàniament es va produir una resposta de 207 ± 24 unitats de fluorescència com es pot veure a la Taula XIX.

La paret cel.lular pneumocòcica va produir una resposta en l'alliberament d'elastasa de 200 ± 3 unitats de fluorescència, i l'administració conjunta de paret cel.lular pneumocòcica i factor activador de les plaquetes va produir 1651 ± 1 unitats de fluorescència, com es veu a la Taula XIX. Per tant, la paret cel.lular pneumocòcica no va demostrar cap activitat similar a la del factor

activador de les plaquetes quant a degranulació de neutròfils, ni va ser capaç de fer inhibició competitiva dels seus efectes.

T A U L A XVIII

Capacitat del factor activador de les plaquetes, la paret cel.lular i l'àcid lipoteicoic per induir agregació plaquetar.

Estímul	Concentració	% Resposta màxima±DE
FAP	0.03 nM	3.1±4
	1.0	16.3±23
	3.0	46.3±63
	10.0	79.8±11
Paret cel.lular	2 µg/ml	0
	20	3.1±4
Acid lipoteicoic	0.02 µg/ml	0
	0.2	0
	2	0
	20	2.0±6

FAP: Factor activador de les plaquetes.

T A U L A X I X

Capacitat del factor activador de les plaquetes i la paret cel.lular per produir degranulació de neutròfils.

Estímul	Alliberament d'elastasa Unitats de fluorescència±DE
Sèrum fisiològic	217±4
FAP (1 µM)	1687±6
FAP+Antagonista (1 mM)	207±24
Paret cel.lular (1 µg/ml)	200±3
Paret cel.lular + FAP	1651±1

FAP: Factor activador de les plaquetes.

6. DISCUSSIO

6. DISCUSSIO

La mortalitat de les meningitis bacterianes és encara alta (166-169) i molts dels malalts que sobreviuen tenen seqüeles neurològiques (170).

La meningitis pneumocòcica encara té pitjor pronòstic. La mortalitat actual està al voltant del 30 % malgrat que els antibiòtics que es fan servir maten adequadament les bactèries. Els canvis anatomo-patològics que s'associen amb la inflamació meníngia inclouen arteritis, tromboflebitis, augment de la pressió intracranial, edema cerebral i alteració en el flux sanguini cerebral (62,167,171-175).

La quantitat d' inflamació en l'espai subaracnoïdal es correlaciona amb el pronòstic de la malaltia (176), per tant, és important entendre els detalls de la cascada inflamatòria que es produeix en el curs de la meningitis per tal de dissenyar millors estratègies terapèutiques.

L'espai subaracnoïdal està segrestat darrera la barrera hematoencefàlica i té poques, per no dir cap, defenses naturals de l'hoste (42). Així, la generació d'inflamació en aquest espai necessita comunicació a través de la barrera hematoencefàlica i l'arribada de les defenses de l'hoste des de la sang fins al líquid cefalorraquidi. Això fa que no es puguin extrapolar les dades conegudes

dels mecanismes de la inflamació a les infeccions perifèriques al sistema nerviós central.

La presència de pneumococs, en una quantitat crítica, que s'ha definit com a 10^5 ufc/ml o l'equivalent de paret cel·lular purificada, a l'espai subaracnoïdal, (177) posa en marxa la cascada inflamatòria. Fins ara hi ha evidència que alguns mediadors estan directament implicats en aquesta cascada inflamatòria. S'ha demostrat que el factor de necrosi tumoral α , la interleuquina 1 α , (però no la interleuquina 1 β), la proteïna inflamatòria del macròfag 1 i la proteïna inflamatòria del macròfag 2 indueixen augment de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica, pleocitosi i edema cerebral (178,179). Els anticossos contra algunes d'aquestes citoquines, interleuquina 1 α i factor de necrosi tumoral, prevenen la inflamació produïda per la inoculació de pneumococs, mentre que els anticossos contra les proteïnes inflamatòries del macròfag només la retarden (178).

6.1 Activitat inflamatòria del factor activador de les plaquetes.

El factor activador de les plaquetes és el primer fosfolípid, ben caracteritzat, que es considera un mediador en la inflamació aguda (180).

El factor activador de les plaquetes està produït per moltes cèl.lules, i és metabolitzat ràpidament a metabòlits inactius. Això suggereix que la seva activitat biològica està regulada molt estretament. Actua en una àmplia varietat de tipus cel.lulars, neutròfils, eosinòfils, monòcits, cèl.lules musculars, fibroblastes, cèl.lules endotelials i línies cel.lulars neuronals, i produeix augment de la permeabilitat capilar amb exudació de proteïnes i acumulació de plaquetes i leucòcits (181).

Recentment, al factor activador de les plaquetes se li ha atribuït un paper en trastorns circulatoris, com ara la hipertensió pulmonar (182) o la hipotensió sistèmica en el curs del xoc d'origen endotòxic (121).

Aquest treball suggereix que el factor activador de les plaquetes és també inflamatori en el sistema nerviós central, provocant augment de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica amb el consegüent augment en la concentració de proteïnes i edema cerebral, però només moderada pleocitosi. Aquest efecte inflamatori és evident tant amb dosis baixes com altes del factor activador de les plaquetes.

Això és consistent amb les troballes de Humphrey et al (183) on es va trobar que les propietats vasoactives del factor activador de les plaquetes eren independents de les

seves propietats leucotàctiques en un model d'inflamació dèrmica en rates.

Així el factor activador de les plaquetes ve a sumar-se a la llista de mediadors que poden provocar una resposta inflamatòria a l'espai subaracnoïdal per inoculació intracisternal, reproduint en part la que desencadena la infecció natural o la paret cel·lular pneumocòcica.

Això és consistent amb el fet que el factor activador de les plaquetes ha estat detectat al líquid cefalorraquídi de nens amb meningitis bacteriana, i la concentració de factor activador de les plaquetes es pot correlacionar amb el pronòstic de la malaltia (184).

El fet que l'antagonista del factor activador de les plaquetes no pogués eliminar totalment l'activitat inflamatòria, creiem que és degut al fet que no comptem encara amb "l'antagonista perfecte", i existeixen dificultats tècniques per fer servir grans dosis en models *in vivo*.

En comparar el paper del factor activador de les plaquetes a l'espai meningi i al pulmó, vam trobar que també té capacitat de desencadenar activitat inflamatòria al pulmó, demostrat per les característiques del rentat broncoalveolar després de la inoculació intratraqueal del

factor activador de les plaquetes, però en contrast amb el seu comportament a l'espai subaracnoïdal, va provocar augment en l'exudació de proteïnes i augment en la presència de leucòcits.

Aquest efecte quimiotàctic al pulmó, però no al sistema nerviós central, pot ser degut al fet que el reclutament de leucòcits en resposta a aquest mediador al pulmó, es fa per vies diferents que al sistema nerviós central.

6.2 Paper del factor activador de les plaquetes a la meningitis i la pneumònia pneumocòcica.

El significat biològic de les activitats inflamatòries del factor activador de les plaquetes va ser determinada per la capacitat de l'antagonista del factor activador de les plaquetes per inhibir la inflamació causada per la inoculació de *S. pneumoniae* a l'espai subaracnoïdal i al pulmó.

En els dos teixits, el pulmó i el sistema nerviós central, l'antagonista del factor activador de les plaquetes va reduir àmpliament l'exudació de proteïnes, indicant un paper substancial del factor activador de les plaquetes en la inducció de permeabilitat vascular durant la infecció pneumocòcica en aquestes localitzacions.

Tanmateix, la participació del factor activador de les plaquetes en la generació de leucocitosi va ser diferent i només va evitar la pleocitosi a l'espai subaracnoïdal. És difícil interpretar per què l'antagonista del factor activador de les plaquetes és capaç de disminuir la pleocitosi generada per *S. pneumoniae* al LCR, ja que hem vist que el factor activador de les plaquetes no sembla generar pleocitosi i, per tant, no deu ser responsable de l'acúmulo de neutrofils a l'espai subaracnoïdal en el curs de la meningitis. Una possible explicació seria que l'antagonista fos capaç de bloquejar o modular efectes directes del pneumococ, la paret cel·lular o altres components bacterians.

Experiments previs amb el mateix model animal, i realitzats al mateix laboratori (49), han demostrat que l'anticòs monoclonal IB4, que actua contra el receptor CR3, que és una molècula que promou l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli i la posterior diapedesi, és capaç de prevenir, pràcticament del tot, l'acúmulo de leucòcits al líquid cefalorraquidi causat per la inoculació intracisternal de *S. pneumoniae*, però només és capaç de reduir parcialment l'acúmulo de leucòcits al rentat broncoalveolar dels conills inoculats amb *S. pneumoniae* intratraqueal.

S'ha demostrat un efecte similar usant un altre anticòs, anti-CD18, en experiments amb conills també

inoculats intratraquealment amb *S. pneumoniae*, però no amb bacteries gram negatives (185).

Aquestes dades fan pensar que el reclutament de leucòcits en la seva resposta específica a *S. pneumoniae* és mecànicament diferent al pulmó i al cervell.

El fet que la combinació de l'antagonista del factor activador de les plaquetes i l'anticòs monoclonal IB4 sigui capaç de reduir en gran mesura l'acúmulo de leucòcits al pulmó, però que l'administració de l'anticòs monoclonal IB4 sol no ho sigui, pot indicar que pot haver-hi acúmulo de leucòcits depenent del factor activador de les plaquetes i independent de la molècula CR3 al pulmó, però no al sistema nerviós central i que el factor activador de les plaquetes té un paper significatiu però diferent a la meningitis i pneumònia pneumocòcica.

A més a més d'aquestes diferències segons la localització, també s'han trobat diferències en comparar la capacitat de l'antagonista del factor activador de les plaquetes per evitar la pleocitosi generada en resposta a *S. pneumoniae* i *H. influenzae*. L'antagonista redueix la pleocitosi generada pel pneumococ, però no la generada per *H. influenzae*, suggerint que el paper del factor activador de les plaquetes en la generació d'inflamació en resposta al pneumococ és especialment pronunciada.

Aquest significat biològic de l'activitat inflammatòria del factor activador de les plaquetes a la meningitis pneumocòcica, es va veure confirmat per la clara disminució que es va aconseguir, en l'activitat inflammatòria generada per l'administració de paret cel.lular pneumocòcica en administrar conjuntament l'antagonista del factor activador de les plaquetes. La paret cel.lular pneumocòcica s'ha mostrat com la part del pneumococ amb una més gran capacitat inflammatòria.

6.3 Reactivitat creuada entre la paret cel.lular i el factor activador de les plaquetes.

El factor activador de les plaquetes es genera normalment com a part de la cascada inflammatòria i podria suposar-se que apareix després de la interacció de les parets cel.lulars pneumocòciques amb els receptors de l'hoste.

Tanmateix, donat que l'activitat inflammatòria més intensa de les parets cel.lulars pneumocòciques resideix en els seus subcomponents que contenen àcid teicoic (21), i aquests components mostren similituds estructurals amb el factor activador de les plaquetes, com la presència de fosforilcolina com un requeriment per a la seva activitat biològica, es pot suggerir la hipotesi que aquests components poden també actuar directament com anàlegs del

factor activador de les plaquetes.

Dues troballes en el model animal de meningitis sostenen aquesta hipotesi, el fet que anticossos anti-paret cel.lular neutralitzin l'edema cerebral induït pel factor activador de les plaquetes en el model de meningitis, i per una altra banda, en el mateix model, que els antagonistes del factor activador de les plaquetes disminueixin la inflamació induïda per la paret cel.lular pneumocòcica, tant en la concentració de proteïnes com en la pleocitosi.

L'estudi del paper inflamatori de l'àcid teicoic totalment aïllat i la seva hipotètica modulació per l'antagonista del factor activador de les plaquetes, no s'ha pogut realitzar perquè els mitjans tècnics de què es disposa avui dia no permeten purificar totalment l'àcid teicoic i separar-lo totalment de la porció peptidoglicana.

Els experiments amb l'àcid lipoteicoic pneumocòcic, substància que seria un bon candidat per tenir acció similar al factor activador de les plaquetes, per tenir també component lipídic, van demostrar que aquest és inflamatori, però la seva resposta inflamatòria no es va veure influïda, ni quant a la pleocitosi, la concentració de proteïnes, ni la presència d'edema cerebral, per l'administració conjunta de l'antagonista del factor activador de les plaquetes.

Per a poder conèixer adequadament si la paret cel.lular pneumocòcica, o els seus components poden, a més a més de desencadenar la presència del factor activador de les plaquetes com a part de la complexa cascada inflamatòria, per si mateixos tenir acció similar al factor activador de les plaquetes per acció directa sobre els receptors, es van realitzar els assaigs *in vitro* sobre la capacitat de la paret cel.lular i l'àcid lipoteicoic per induir degranulació de neutròfils i agregació plaquetar en assaigs específics pel factor activador de les plaquetes.

No es va demostrar una acció directa anàloga al factor activador de les plaquetes per part de la paret cel.lular ni de l'àcid lipoteicoic, usant dosis creixents, en l'assaig d'agregació plaquetar, ni en l'assaig de degranulació de neutròfils. Tampoc s'ha pogut demostrar cap inhibició competitiva al factor activador de les plaquetes per part dels components pneumocòcics.

Creiem que es pot deduir que l'activitat inflamatòria de *S. pneumoniae* no està en relació amb una acció directa de la seva paret o altres components sobre els receptors del factor activador de les plaquetes.

El fet que existeixi neutralització creuada entre anticossos i antagonistes de paret cel.lular i del factor activador de les plaquetes però, fa pensar que hi ha alguna

relació entre l'especial capacitat inflamatòria del factor activador de les plaquetes i la de *S. pneumoniae*.

Anticossos anti-paret cel.lular es poden trobar al sèrum de malalts amb pneumònia pneumocòcica. Es possible que aquests anticossos modifiquin el curs de la malaltia fent algun efecte sobre la contribució del factor activador de les plaquetes a la inflamació que es produeix al pulmó (186).

La intensitat de la inflamació que s'associa a la infecció pneumocòcica al sistema nerviós central i al pulmó pot estar augmentada per una especial participació del factor activador de les plaquetes endogen en la resposta inflamatòria als components de la paret cel.lular pneumocòcica. Si a més a més existeixen altres tipus d'interaccions degudes a la similitud estructural, no és pot respondre ara per ara i calen noves investigacions en aquest camp per a tenir respostes més definitives.

Les troballes d'aquest estudi mostren també que la resposta inflamatòria a un patogen pot ser diferent depenent de l'òrgan implicat, i també aquesta resposta pot ser diferent en el mateix òrgan depenent del tipus de patogen causant de la infecció.

La malaltia pneumocòcica, té una exagerada capacitat

per provocar reacció inflamatòria. La reacció inflamatòria és en realitat una espasa de doble tall. Davant un microorganisme viu o un altre noxa, es provoca un senyal d'alarma i l'organisme posa en marxa les seves defenses per tal de destruir, limitar, o bloquejar l'element agressor, i ho fa desencadenant una sèrie de complexes accions: activació de cèl.lules de tots tipus, producció de substàncies mediadores, i una complexíssima xarxa d'interaccions, regulacions i contraregulacions. Aquestes cèl.lules activades i substàncies generades, actuen sobre les seves cèl.lules dianes. Els efectes de totes aquestes accions i interaccions formen la resposta o cascada inflamatòria i són inherents a la "curació" de qualsevol d'aquests processos, però aquesta mateixa reacció, no pot distingir i evitar que en el seu afany de destruir, limitar o bloquejar l'element agressor, es lesionin teixits, la reacció sigui exagerada a la agressió que la va desencadenar, o es mantingui malgrat que aquesta desaparegui.

En el cas de la meningitis pneumocòcica, sabem que aquesta inflamació és exagerada, i sovint ineficaç. El seu mecanisme és molt complex, s'ha atribuït un paper a la majoria de citoquines conegudes, i les dades que es coneixen impliquen la reacció inflamatòria en el pronòstic de la malaltia. Aquest treball, mostra que el factor activador de les plaquetes també té un paper a la

meningitis pneumocòcica.

Els camins d'investigació actual estan encaminats a conèixer amb més profunditat la reacció inflamatòria, per poder determinar quines accions són beneficioses i imprescindibles per al control de la infecció, i quines són nocives i provoquen el dany neuronal, i així poder completar el tractament antibiòtic, amb tractaments coadjuvants, anticossos monoclonals, antiinflamatoris esteroïdals i no esteroïdals etc, que ajudin a reduir l'exagerada reacció inflamatòria a la imprescindible per aconseguir curació sense seqüeles.