

	AGENTES ANTIPLAQUETARES	AGENTES ANTICOAGULANTES
PRIMERA GENERACIÓN	Aspirina, Trifusal Tienopiridinas (Ticlopidina, Clopidogrel)	Heparina Warfarina
SEGUNDA GENERACIÓN	Combinación Aspirina/Clopidogrel Antagonistas GP IIb/IIIa	Heparina de bajo peso molecular Hirudina
NUEVAS APROXIMACIONES	Inhibidores de la interacción Vwf-GP ^{IIb} * Inhibidores de la interacción colágeno-plaqueta* Inhibidores de la activación dependiente de trombina Antagonistas directos del receptor ADP Sustancias antiplaquetares liberadas por NO	Inhibidores de la vía TF-factor VII Inhibidores selectivos del factor Xa Inhibidores selectivos de la trombina Proteína C humana activada Trombomodulina recombinante soluble

Tabla 3.- Agentes Antitrombóticos.

6.1.1 ANTIPLAQUETARES DE PRIMERA GENERACIÓN

a) La aspirina

Un gran número de meta-análisis demuestran la eficacia de la aspirina en la prevención secundaria de la cardiopatía isquémica en pacientes de alto riesgo (Antithrombotic Trialists' Collaboration., 2002). La aspirina es un derivado sintético del ácido salicílico; el ácido acetilsalicílico. En la plaqueta, la aspirina produce la acetilación irreversible de la COX, con lo que se reduce la producción de TXA₂ (Roth GJ & Calverley DC., 1994). Como las plaquetas son anucleadas y por tanto incapaces de llevar a cabo la síntesis proteica, no pueden reponer la actividad enzimática, por lo que la inhibición plaquetaria se prolonga durante toda la vida de la plaqueta (8-9 días). La aspirina no inhibe ni la adhesión, ni la degranulación ni la agregación plaquetaria en respuesta a estímulos como el ADP, trombina, el colágeno, las catecolaminas y el estrés de cizallamiento.

Hasta el 40% de los pacientes presentan resistencia a la aspirina. Esta es más común en ancianos y mujeres y se caracteriza por la falta de respuesta a dosis moderadas de aspirina (80 a 325 mg) (Cambria-Kiely JA & Gandhi PJ., 2002). Algunos pacientes no toleran la aspirina por efectos adversos gastrointestinales o alergia. Pese a estas limitaciones, la aspirina reduce el riesgo de muerte/infarto en aproximadamente un 30% en pacientes con síndrome coronario agudo y se recomienda como la primera opción de

agente antiplaquetar. La aspirina tiene diversos efectos no plaquetarios: inhibe las prostaglandinas, la síntesis de la interleukina-6 en los leucocitos y la actividad de los inhibidores del eNOS. Estas acciones podrían explicar el por qué sus efectos beneficiosos son mayores de los que cabría esperar de la simple inhibición de la agregación plaquetaria dependiente del TXA₂. La aspirina, sin embargo, puede tener algunos efectos adversos como la reducción de la producción de PGI₂ por el endotelio, sobre todo si se administra a dosis altas.

b) Los antagonistas del receptor del ADP

Ticlopidina y clopidogrel son tienopiridinas y antagonizan la agregación plaquetaria inducida por el ADP (Escolar G & Heras M., 2000; Savi P y cols., 2000), constituyendo una eficaz alternativa al ácido acetil salicílico, en caso de contraindicaciones de éste último. En un estudio abierto en 652 pacientes con síndrome coronario agudo, la ticlopidina redujo la tasa de muerte e infarto a los 6 meses del 13,6 % al 7,3 %, aunque no era efectiva durante los primeros 15 días. Debido a ese comienzo de acción tardío (que se demora hasta 2 o 3 días) la terapia con ticlopidina no se recomienda en los síndromes coronarios agudos. Además, el uso de ticlopidina va asociado a efectos secundarios adversos (neutropenia severa) (Gill S y cols., 1997).

El clopidogrel muestra su máxima actividad tras 2 h. de su administración (Herbert JM y cols., 1993). El estudio CAPRIE (clopidogrel vs. aspirina en pacientes con riesgo de eventos isquémicos) demostró que, en pacientes con historia de infarto de miocardio, infarto cerebral o enfermedad arterial periférica, el clopidogrel reducía la recurrencia de eventos isquémicos en aproximadamente un 9% (p=0.043) cuando se comparaba con la aspirina sola (CAPRIE steering Committee, 1996). Sin embargo, la presencia de oclusión trombótica, en casi un 5% de los pacientes sometidos a stenting coronario, sugiere resistencia al clopidogrel (Müller I y cols., 2003; Gurbel PA y cols., 2003).

El clopidogrel está indicado, por tanto, en la fase aguda y en el tratamiento a largo plazo de los pacientes con síndrome coronario agudo de alto riesgo. No se sabe si el clopidogrel es superior a los antagonistas del receptor IIb/IIIa en la fase aguda y si se debe emplear conjuntamente asociados a la aspirina. Lo habitual es asociar aspirina, heparina y antagonistas IIb/IIIa inicialmente en los pacientes de alto riesgo y añadir clopidogrel en el momento de la intervención coronaria percutánea (implantación de stent).

6.1.2 ANTIPLAQUETARES DE SEGUNDA GENERACIÓN

a) Terapia combinada: aspirina y clopidogrel

Debido a que múltiples vías contribuyen en la activación plaquetar, la combinación de agentes antiplaquetares con distintos modos de actuación parece ser una estrategia prometedora para pacientes con alto riesgo de sufrir eventos trombóticos. La actuación independiente y complementaria del clopidogrel y la aspirina permite que su combinación inhiba, tanto a la agregación plaquetar inducida por ADP como la producción de TXA₂. El ensayo CURE ha demostrado la superioridad (30% de reducción en la frecuencia de trombosis) de esta combinación, sobre todo en pacientes en los que se les ha implantado un stent, en comparación con la administración sola de aspirina. La combinación ASA y ticlopidina es mucho menos tolerada y presenta más efectos adversos que cuando se combinan aspirina y clopidogrel (Bossavy JP y cols., 1998; Bertrand ME y cols., 2000; Taniuchi M y cols., 2001).

b) Antagonistas de la GPIIb/IIIa

La activación plaquetaria se produce en respuesta a diversos estímulos, trombina, catecolaminas, serotonina, ADP, colágeno, etc. Cada uno de estos agonistas produce la activación plaquetaria por caminos metabólicos independientes, de modo que es posible bloquear cada uno de ellos sin afectar a los restantes. Estas vías metabólicas terminan en un efector final común, el receptor de membrana plaquetar IIB/IIIa, destinado a unirse con otros receptores IIB/IIIa de otras plaquetas mediante puentes de fibrinógeno. Los antagonistas plaquetarios de los receptores IIB/IIIa (abciximab, eptafibatide, tirofibán) pueden afectar la agregación, independientemente del estímulo actuante o de la vía metabólica utilizada y por esta razón, pueden generar un grado mayor de inhibición plaquetaria con respecto a las clásicas drogas de primera generación. Estos fármacos inhiben la agregación plaquetar al impedir la unión del fibrinógeno al receptor GPIIb/IIIa. Diversos ensayos clínicos (CAPTURE, PRISM-PLUS, PURSUIT) han demostrado el beneficio asociado a la administración intravenosa de los inhibidores del receptor GPIIb/IIIa (i.e. abciximab) en la fase aguda de los síndromes coronarios y en pacientes con previsión de intervención coronaria percutánea. Su administración oral, a pesar de que en un principio parecía una estrategia prometedora, ha demostrado producir un aumento de la mortalidad.

6.1.2 NUEVAS APROXIMACIONES ANTIPLAQUETARES

En cuanto a las nuevas aproximaciones antiplaquetares, debido a los objetivos de esta tesis, nos centraremos en las aproximaciones desarrolladas con el fin de modular la adhesión plaquetar (**Tabla 3*** y **Tabla 4**).

DIANA	AGENTE	PROBADO EN ANIMALES	PROBADO EN HUMANOS
INHIBIDORES DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL VWF Y LA GPIIb	Fragmento F(ab') ₂	SI	NO
	Vwf recombinante segmento VCL		
	Vwf recombinante fragmento AR545C		
	Acido Aurintricarboxílico		
INHIBIDORES DE LA INTERACCIÓN COLÁGENO-PLAQUETA	Flavonoide	SI	NO
	Inhibidores naturales *		
	Péptidos relacionados al colágeno		
	Anicuerpos anti Gp VI		

Tabla 4.- Nuevos agentes antiplaquetares: inhibidores de la adhesión plaquetar.

* Dentro del grupo de los inhibidores naturales encontramos proteínas provenientes de las glándulas salivares de hematófagos. Entre los hematófagos más estudiados se hayan:

a) Los nemátodos (las sanguijuelas):

a.1. *Hirudo medicinalis*: Munro y col. (1991) aislaron y purificaron un inhibidor de la adhesión plaquetar secretado por las glándulas salivares de este nematodo, al que llamaron Calin.

a.2. *Haementeria officinalis*: se extrae la proteína antiplaquetar de la sanguijuela (Leech Anti-Platelet Protein = LAPP) de la que se ha secuenciado y obtenido la forma recombinante (rLAPP) (Huizinga EG y cols., 2001).

LAPP y calin inhiben la interacción Vwf-GPIIb y también la GP Ia-IIa / colágeno, reduciendo así la adhesión plaquetar estimulada por superficies recubiertas de colágeno tipo I o III.

b) Los artrópodos:

b.1 *Triatoma pallidipensis*: se extrae la palladipina que inhibe la agregación plaquetar inducida por colágeno, sin afectar la adhesión plaquetar, ya que actúa en la GPIV.

b.2 *Ornitodoros moubata*: se extrae la moubatina y presenta escasas propiedades inhibitoras de la adhesión plaquetar al colágeno.

6.3 AGENTES ANTIISQUÉMICOS (Donadores de NO).

En los procesos de isquemia y angina, se utilizan fármacos vasodilatadores como los donadores de NO. Como ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, la presencia de síndromes coronarios va asociada a una disminución en la biodisponibilidad de NO, una menor vasorelajación y un aumento de la agregación plaquetar. Para paliar la falta de NO endógeno, la estrategia ha sido proporcionar NO exógeno en forma de nitrato (nitroglicerina, dinitrato isosorbido, 5-mononitrato) o donadores directos de NO (Sin1, nitroprusato, S-nitrosotioles). Estos compuestos presentan la ventaja de que sus efectos vasodilatadores (y en algunos casos antiagregantes) son estrictamente independientes del endotelio; es decir, se mantienen a pesar de la severidad de la disfunción endotelial (Ignarro LJ & Kadowitz PJ., 1985; Murad F., 1986). Desde que Thomas Lauder Brunton (1867) utilizó con éxito el nitrato de amilo en una paciente con angina de pecho (los donadores de NO se han convertido en el tratamiento estándar en pacientes con enfermedad coronaria aterosclerótica y angina de pecho. Dichos fármacos actúan de forma similar a como lo hace el NO derivado del endotelio: mediante la activación de la GC y la consiguiente formación de cGMP (Kukovetz y cols., 1987), que induce la relajación del músculo liso y la disminución de la agregación plaquetaria. Por ello son un excelente sustituto del vasodilatador nítrico endógeno en estados patológicos.

6.3.1 NITRATOS

Los nitratos son pro-fármacos que requieren de un metabolismo enzimático para generar NO bioactivo. Aunque no se ha podido caracterizar la enzima responsable de dicha transformación, las pruebas realizadas hasta el momento, sugieren que el sistema citocromo P-450, en conjunción con la actividad de la NADPH, la presencia de grupos tiol y la glutathione-S-transferasa son requeridas para el proceso metabólico de degradación y reducción de los nitratos orgánicos a nitrosotioles y finalmente, en auténtico NO (Abrams J. 1991).

La administración intravenosa de nitroglicerina es una estrategia convencional en la terapia de isquemia miocárdica inestable aguda (angina inestable y infarto de miocardio) (Werns SW y cols, 1994), pues sus propiedades hemodinámicas permiten compensar el daño isquémico. En cuanto a la administración de nitratos por vía oral, el dinitrato y

mononitrato de isosórbida han demostrado ser muy eficaces en la prevención de las crisis de angina. A pesar de que el efecto potencial de los nitratos como vasodilatadores sobre una base molar está relacionado con el número de moléculas de ácido nítrico que los compuestos son capaces de liberar (los trinitratos liberan tres moléculas de NO, los dinitratos dos y los mononitratos una), la dosis -en miligramos- del compuesto corrige estas diferencias.

A pesar de su uso convencional, los nitratos presentan importantes limitaciones. Una primera limitación es el fenómeno de tolerancia, es decir, la pérdida de efectos vasodilatadores por la aplicación prolongada del fármaco. Para disminuir el efecto de tolerancia la estrategia utilizada es el uso intermitente de nitratos con una ventana libre de nitratos de al menos 8-10 horas al día. Aunque se desconoce su mecanismo de aparición, se ha sugerido que se produce a causa de la progresiva disminución en la biodisponibilidad de grupos tioles. De hecho, se ha observado que la tolerancia adquirida por la administración continuada de nitroglicerina se revierte con la co-administración de N-acetilcisteína (tiol). Lamentablemente, la aparición de importantes efectos adversos tras la administración de esta asociación ha eliminado toda esperanza de uso clínico. De ello se deriva, que los nitratos que no precisan biotransformación enzimática y liberan espontáneamente NO de su molécula (p.ej., molsidomina) parecen ser menos proclives a la tolerancia (Hinz B & Schroder H., 1998).

Otras importantes limitaciones de los nitratos son la necesidad de un metabolismo previo (conversión a nitrosotioles y finalmente en NO), la presencia de efectos hemodinámicos adversos (hipotensión), la falta de selectividad y leves o nulos efectos antiplaquetarios.

6.3.1 S-NITROSOTIOLES

Las principales diferencias entre los S-nitrosotioles y los nitratos son:

1. Los S- nitrosotioles (S-nitrosoglutatión ,GSNO; S-nitroso-penicilamina -SNAP; S-nitroso-albumina, S-nitrosohomocisteína, S-nitrosocisteína) se han identificado *in vivo* en diversos sistemas biológicos (neutrófilos, cerebro, plasma y sangre) (Marley R y cols., 2000).
2. La mayoría de los efectos directos de los nitrosotioles son debidos a su habilidad para interactuar con la GC (Ignarro LJ., 1989) como los nitratos. Sin embargo, varios autores han sugerido que el NO liberado por los S-nitrosotioles también

puede mediar alguno de sus efectos biológicos por vías independientes del cGMP (Pawloski JR y cols., 1998).

3. Los S-nitrosotioles, al contener el grupo tiol en su estructura, no requieren una metabolización previa para la liberación de NO y por ello no presentan el fenómeno de tolerancia (no dependen de la biodisponibilidad de grupos -tiol).
4. Las propiedades antiplaquetares del GSNO son mucho mayores que las presentadas por los nitratos. Los S-nitrosotioles (GSNO), al liberar NO mediante la acción de enzimas asociadas a la membranas plaquetares, presentan efectos antiplaquetares más específicos. La demostración que el efecto antiplaquetar del GSNO se reduce con la presencia de un quelante de cobre (Gordge MP y cols., 1995) sugiere la presencia de una proteína de cobre en la superficie de la plaqueta, lo que induce la liberación del NO. Recientemente, también se ha demostrado que los neutrófilos son capaces de estimular las plaquetas e inducir la consiguiente liberación de GSNO (Hirayama A y cols., 1999).
5. En cuanto al uso clínico de los S-nitrosotioles, el GSNO ha demostrado reducir embolizaciones asintomáticas durante y después de angioplastia carotídea (Kaposzta Z y cols., 2001), reducir marcadores de activación plaquetar como la P-selectina (CD62/GMP140) y reducir la densidad el receptor de la GPIIb/IIIa en pacientes que van a ser sometidos a angioplastia, con efectos hemodinámicas mucho menores que los producidos por la nitroglicerina (Langford EJ y cols., 1994).

Por todo lo expuesto, el GSNO parece presentar una especificidad plaquetar y por ello, un mayor efecto antiplaquetar que sus efectos en el tono vascular. Sin embargo, a pesar de que GSNO puede afectar a la función plaquetar sin alterar el tono vascular, dosis elevadas de GSNO son vasoactivas y no eluden vasodilatación.

7. LAS PROTEÍNAS RHO

El mecanismo molecular que gobierna la activación y agregación plaquetar aún no está bien definido (Nishioka H y cols., 2001). Cuando las plaquetas son inicialmente estimuladas, lo primero que sucede es la reorganización de las proteínas del citoesqueleto

(actina y miosina), que induce el cambio conformacional plaquetar, de modo que las plaquetas inicialmente discoides adoptan una configuración esférica con presencia de filopodios (Benjamín Z y cols., 1999). Desde finales de los años 80 se conoce que las proteínas Rho juegan un papel importante en la organización del citoesqueleto de actina (Chardin P y cols., 1989). Desde entonces, un gran número de estudios han permitido establecer la implicación de estas proteínas en la regulación de la contractilidad, motilidad y migración celulares, extensión y retracción de neuritas, adhesión celular, transducción de señal de numerosos estímulos, control del ciclo celular y de la expresión génica (Mackay DJ & Hall A., 1998). Las proteínas de la familia Rho se encuentran dentro de la familia de proteínas monoméricas, capaces de unir GTP, conocidas también como proteínas G de bajo peso molecular o proteínas de la superfamilia Ras. Se trata de una familia en expansión, de la que, en mamíferos, se conocen al menos diez miembros que desempeñan funciones clave para la biología celular.

La unión de agonistas a los receptores expuestos en la superficie de las plaquetas activan las proteínas Rho-GTPasas, que inducen cambios en las concentraciones de calcio citoplasmáticas, en la organización del citoesqueleto, en la agregación y en la secreción plaquetar (Bodie S y cols., 2001). En términos generales, la actividad de las proteínas Rho se regula de forma cíclica mediante la unión de GTP, que conduce a su activación y su hidrólisis, que devuelve a la proteína a su estado inactivo. Este ciclo se produce gracias a la asistencia de proteínas auxiliares, que promueven el intercambio de nucleótidos unidos a proteína (factores intercambiadores de nucleótidos, conocidos como GEFs) o facilitan la actividad de GTPasa (conocidas como GAPs). Por último, existen proteínas que inhiben el intercambio de nucleótidos unidos a la proteína, con lo que estabilizan la forma inactiva (GDIs) (Geyer M & Wittinghofen A., 1997).

Las proteínas Rho presentan dos formas: inactiva (citoplasmática) y activa (unida a membrana). En su forma activa, las proteínas Rho activan una de sus dianas, la quinasa, dependiente de Rho, RhoK, que a su vez, fosforila e inactiva la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina, que promueve el ensamblaje de los filamentos de miosina y la contractilidad celular (**Figura 9**).

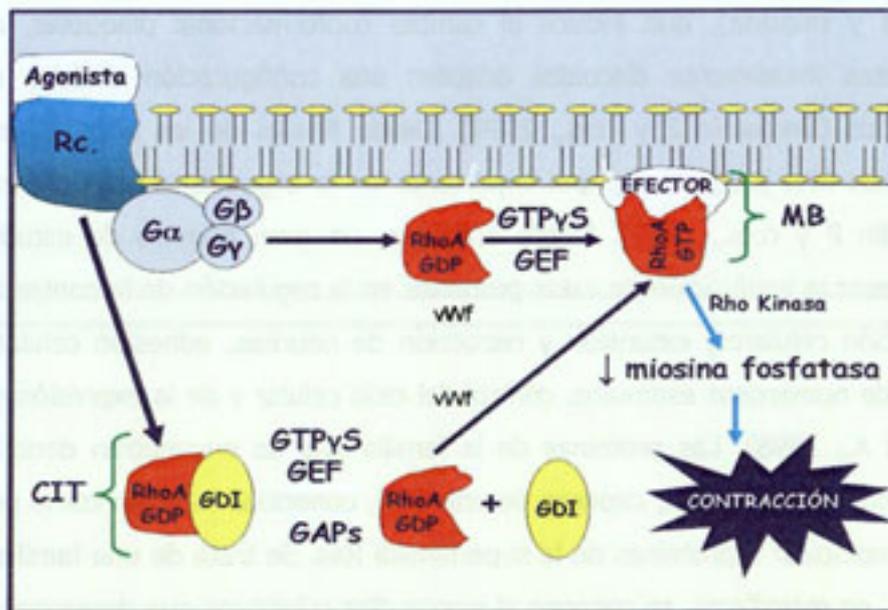


Figura 9.- Esquema de la vía actuación de RhoA.

Estudios recientes, llevados a cabo en modelos experimentales en células en cultivo, atribuyen a Rho un papel clave en la disfunción endotelial, puesto que constituyen eslabones importantes en las vías de señalización de los procesos que regulan la expresión de eNOS. Se ha comprobado que las proteínas Rho regulan, negativamente, la expresión de eNOS por mecanismos postranscripcionales a nivel de la estabilidad del transcrito (Laufs U & Liao JK., 1998). Estos cambios en expresión génica estarían íntimamente relacionados con la capacidad de las proteínas Rho para regular las funciones del citoesqueleto y de hecho, parece ser que serían los cambios en la estructura del citoesqueleto los responsables de las variaciones en la expresión de la eNOS, tanto en células en cultivo como en animales intactos (Laufs U y cols., 2000).

OBJETIVOS

Las plaquetas juegan un papel fundamental en los procesos trombóticos, sus manifestaciones clínicas y en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. A pesar de que los antitrombóticos convencionales han demostrado importantes progresos en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular, la incidencia de eventos isquémicos cardiovasculares sigue siendo elevada; por ello es actualmente prioritario la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos o estrategias antitrombóticas que permitan reducir la presencia de eventos cardíacos.

Por todo ello, los objetivos de este trabajo se han dirigido a determinar la eficacia antitrombótica de diferentes compuestos farmacológicos, que están todavía en fase experimental, diseñados con el fin de reducir la adhesión y/o agregación plaquetar y prevenir así la manifestación clínica de eventos cardiovasculares.

PRIMER OBJETIVO : Artículo Primero

A pesar del reciente progreso en el desarrollo de agentes antitrombóticos, estos fármacos actúan a lo largo de distintas fases involucradas en la activación y agregación plaquetar, pero no en el estadio inicial de la formación del trombo; la adhesión plaquetar. Por ello, el desarrollo de fármacos que prevengan la adhesión plaquetar, puede contribuir a una inhibición mucho más eficiente de la respuesta plaquetar al daño vascular.

El primer objetivo de este trabajo se centra en evaluar el efecto de saratina, un inhibidor de la interacción del colágeno tipo I/III, con el dominio A3 del VWF en la trombosis desencadenada por distintas lesiones ateroscleróticas humanas.

SEGUNDO OBJETIVO : Artículos Segundo / Tercero / Cuarto

Los agentes antiplaquetares/antitrombóticos, anticoagulantes, trombolíticos y antiisquémicos (vasodilatadores) son los fármacos clave en el tratamiento de pacientes con riesgo a sufrir enfermedad isquémica, pacientes que han sufrido eventos vasculares de mayor importancia tales como infarto o angina pectoris y pacientes a los que se les ha realizado intervenciones para el tratamiento de la enfermedad aterosclerótica sintomática (angioplastias, stents, etc).

La nitroglicerina y los nitratos en general, son mayoritariamente usados para paliar la falta de NO endógeno, tanto en síndromes anginales estables, inestables e infarto de miocardio (Werns SW et al , 1994), pues sus propiedades hemodinámicas (aumentan el flujo sanguíneo coronario) permiten compensar el daño isquémico (Abrams J, 1996). Sin embargo, el tratamiento convencional con nitratos está limitado por sus escasas propiedades antitrombóticas (debido a que su efecto no es selectivo para plaquetas), efectos hemodinámicos adversos (hipotensión) y el desarrollo de tolerancia. En contraposición, la administración de GSNO puede afectar a la función plaquetar de un modo mucho más selectivo, sin alterar el tono vascular; sin embargo, dosis elevadas de GSNO, al ser vasoactivas, no eluden la vasodilatación. Para superar estas limitaciones y alcanzar el correcto tratamiento de pacientes con enfermedad cardiaca isquémica, con alto riesgo de sufrir un síndrome coronario agudo, es necesario el desarrollo de nuevos donadores de NO selectivos para plaquetas con propiedades antitrombóticas i antiisquémicas y nulos efectos hipotensores.

En base a estos datos, el segundo objetivo pretende:

2.1) Evaluar la eficacia antitrombótica/antiplaquetar de **LA419**, un nuevo nitratotiol específico para plaquetas y con las propiedades antiisquémicas previamente descritas, y compararlo con el isosórbido-5-mononitrato, un nitrato convencional en el tratamiento de angina estable. Ambos nitratos se administrarán diariamente en 2 tomas (mañana/tarde), durante 10 días consecutivos y se evaluarán dosis crecientes de ambos fármacos, con la intención de poder establecer un posible efecto dosis-respuesta. (Artículo Segundo)

2.2) Evaluar la eficacia antitrombótica/antiplaquetar del **LA810** y **LA816**, dos nuevos nitrosotioles, con alta especificidad para plaquetas, y compararlos con el GSNO, un nitrosotiol fisiológico. Los 3 fármacos se administrarán vía endovenosa durante 2 horas y a dosis equimolares. (Artículo Tercero y parte del Cuarto)

2.3) En el caso específico del LA816: (Artículo Cuarto)

2.3.1) comparar sus propiedades antiplaquetares con aquellas observadas tras la administración de dos antitrombóticos convencionales, aspirina y clopidogrel

2.3.2) evaluar posibles efectos sinérgicos tras la administración combinada de LA816 con aspirina y/o clopidogrel.

Para alcanzar ambos objetivos:

- Se analizaron las propiedades antitrombóticas/antiplaquetares de los cuatro compuestos, en el modelo porcino, mediante el sistema de perfusión con cámaras, que permite obtener distintos niveles de riesgo trombótico, modelando distintos patrones de riesgo en la cardiopatía isquémica (distintas velocidades de flujo). Para ello, se indujo trombosis con pared vascular aterosclerótica humana (exclusivamente en el primer objetivo) o pared vascular porcina con distintos grados de lesión (pared ligera o severamente dañada) (primer y segundo objetivo) bajo condiciones de flujo típicas de arterias coronarias no estenosadas (212/s), ligera (800/s) o moderadamente estenóticas (1700-3400/s).
- Se llevaron a cabo estudios histológicos e inmunohistoquímicos que permiten describir la lesión vascular y/o caracterizar el trombo.
- Concretamente en el estudio de los donadores de NO (segundo objetivo):
 - Se evaluaron los parámetros hemodinámicos (presión arterial y frecuencia cardíaca) tras la administración oral o intravenosa de los distintos donadores de NO.
 - Se comprobó si el mecanismo de acción de los nuevos compuestos es dependiente de NO y de cGMP.
 - Se estudió si el mecanismo molecular de acción de los fármacos involucra Rho A.

MATERIAL Y MÉTODOS

Dado que el método de la cámara de perfusión Badimon es de capital importancia en el desarrollo de esta investigación, a continuación se ofrece una explicación detallada del mismo para ampliar la información incluida en los artículos y facilitar así su comprensión.

Para evaluar el efecto antitrombótico de los diferentes fármacos estudiados, se ha estudiado la deposición plaquetar, desencadenada tras perfundir sustratos vasculares (humanos y/o porcinos) en una cámara de perfusión cilíndrica (Badimon L y col., 1987). Con el fin de cuantificar el número de plaquetas que se depositan, previamente se ha aislado una muestra de plaquetas proveniente de sangre del animal, se ha marcado con un isótopo radiactivo ($^{111}\text{Indio-Oxina}$) y se ha reinyectado al animal.

SUSTRATOS VASCULARES

La pared vascular se utiliza como desencadenante de la deposición plaquetar (trombo). En el caso de la pared vascular sana proveniente de humanos o cerdos, se han utilizado dos modelos de lesión arterial: lesión ligera (erosión vascular), que tiene una reducida trombogenicidad e induce poca deposición plaquetaria y lesión severa (rotura vascular), mucho más trombogénica que la anterior e induce una gran deposición de plaquetas en su superficie. Además, se ha utilizado pared vascular aterosclerótica humana (estría grasa y placa aterosclerótica), como modelo de lesión más próxima a las situaciones clínicas.

Según el estudio, se han utilizado uno u otros sustratos:

1. Artículo Primero (Saratina): se han empleado los dos tipos de sustratos vasculares; aortas de cerdo (lesión ligera y lesión severa) para identificar las concentraciones y condiciones óptimas de fármaco (saratina) y aortas ateroscleróticas humanas (lesión ligera, estría grasa, lesión severa y placa aterosclerótica), para evaluar la eficacia del

fármaco en inhibir la trombosis desencadenada por pared vascular humana con diferentes grados de lesión aterosclerótica.

2. Artículo Segundo, Tercero y Cuarto (Donadores de NO): se han utilizado aortas de cerdo como modelo de pared vascular lesionada ligera y severamente.

Las aortas de cerdo se han obtenido de mataderos locales, en el momento del sacrificio de los animales. Las humanas se han obtenido a partir de autopsias (dentro de las 15 primeras horas). Tras limpiarlas y eliminarles la adventicia se cortan en segmentos de aproximadamente 3 cm de largo y congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización del experimental. El día del experimento, tras descongelarlas PBS, se abren longitudinalmente y se cortan en segmentos de 1 cm de ancho.

El modelo de lesión ligera se obtiene al exponer la superficie de la arteria a la circulación sanguínea. Esta estructura se denomina subendotelio, ya que las células endoteliales han sido destruidas mediante el proceso de congelación (pared vascular deendotelizada o erosionada). El modelo de lesión severa, se consigue exponiendo la túnica media del vaso. Para ello, se separa la capa subendotelial con la ayuda de unas pinzas (Badimon L y cols., 1987). En el caso de las aortas humanas ateroscleróticas, las lesiones se han seleccionado macroscópicamente y caracterizado microscópicamente.

MARCAJE DE PLAQUETAS:

El $^{111}\text{Indio}$ (^{111}In) se emplea de forma habitual para el marcaje radiactivo de plaquetas (Hawker RJ y cols., 1978) y otras células sanguíneas, como leucocitos (Doherty PW y cols., 1978) y granulocitos (Weiblen BJ et al., 1979). En este trabajo se ha utilizado la oxina como quelante transportador del ^{111}In . El marcaje de células aisladas con ^{111}In se consigue mezclando una solución de ^{111}In -oxina con las células; este complejo, que es lipófilo, atraviesa la membrana celular. Posteriormente, se produce una reacción en la oxina, de modo que ésta se libera y el ^{111}In queda firmemente enlazado a proteínas intracelulares (Thakur ML y cols., 1977). El marcaje de las plaquetas se realiza el día anterior al experimento de trombosis, para permitir una completa biodistribución de las plaquetas marcadas. El procedimiento del marcaje está detalladamente explicado en la metodología de los artículos.

DETERMINACIÓN DE LA DEPOSICIÓN PLAQUETAR

Tras tranquilizar, anestesiar e intubar a los animales, la vena yugular y la arteria carótida se canulan con catéteres de polietileno de calibre adecuado para impedir la activación de la agregación plaquetar. A los animales se les inyecta un bolo intravenoso de 50 U/Kg de heparina seguido de una infusión de 50 U/Kg/hora, que impide la activación de la coagulación en el sistema extracorpóreo, sin modificar significativamente la deposición plaquetar (Badimon L y cols., 1986). Posteriormente, se establece un circuito arteriovenoso con tubos de silicona y una bomba peristáltica.

Se emplean dos tipos de cámaras de perfusión en las cuales se colocan los substratos vasculares. Las características de estas cámaras se resumen en la **Tabla 5**.

La velocidad de cizalladura (v_z) se calcula a partir de la expresión:
 $v_z = 8 \times (\text{velocidad de la sangre}) / (\text{diámetro canal})$

Diámetro del canal (cm)	Área del canal (cm ²)	Velocidad de flujo (mL/min)	Velocidad de la sangre (cm/seg)	Velocidad de cizalladura (1/seg)
0,2	50	10	5,3	212
0,1	25	5	10,6	800
0,1	25	10	21,2	1690
0,1	25	20	42,4	3400

Tabla 5. Dimensiones y propiedades reológicas de la cámara de perfusión empleadas.

El substrato vascular (10 x 30 mm) se coloca en el interior de la cámara y ésta se coloca en un baño a 37 °C. Posteriormente, la cámara se conecta mediante tubos de silicona y polietileno a la arteria carótida y a la bomba peristáltica. La sangre sale succionada por la bomba a velocidad constante y pasa primero por la cámara; a continuación se recircula al animal por la vena yugular. Antes y después de profundir la sangre, se perfunde el substrato con PBS (60 segundos) con el fin de eliminar aquellas células que no estén activamente adheridas a la superficie vascular (**Figura 10**).

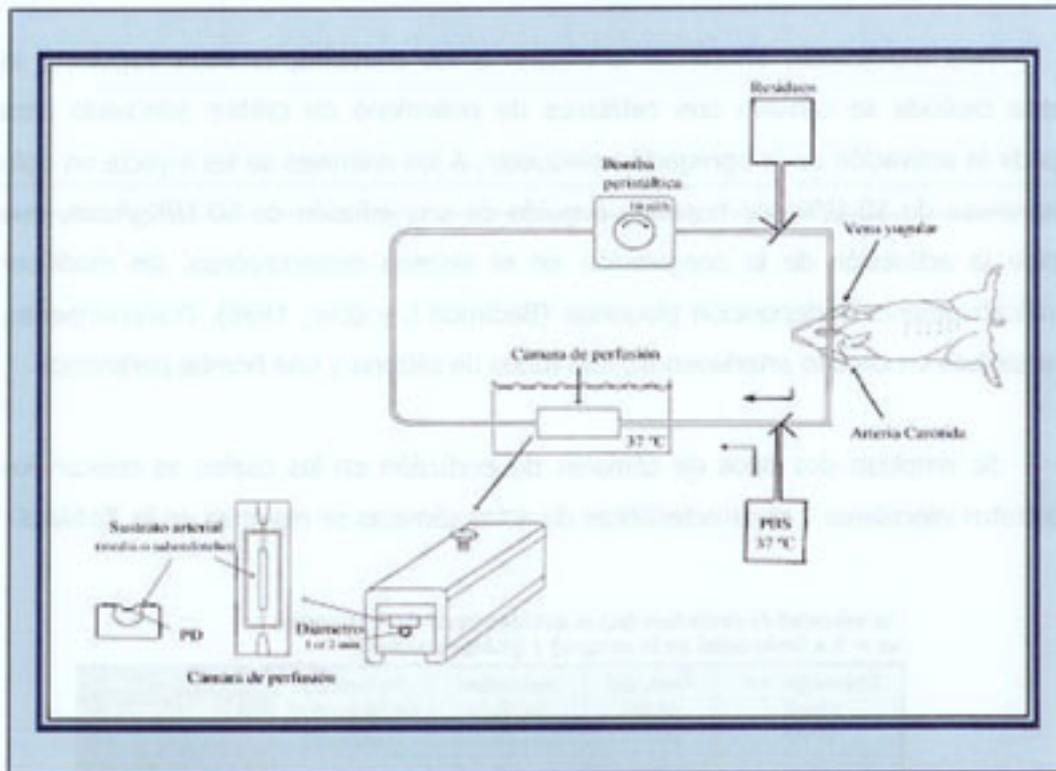


Figura 10. Representación esquemática de la cámara de perfusión y del circuito extracorpóreo en el cerdo.

Una vez finalizada la perfusión, se fijan los substratos en paraformaldehído 4% y se determina la radiactividad presente en el sustrato mediante un contador de radiactividad gamma. Periódicamente, se toman muestras de sangre en las que se determina el recuento de plaquetas (plaquetas/mL), la actividad (cpm/mL) y la lisis de plaquetas. La lisis de plaquetas permite determinar cambios en los niveles de radiactividad unida a plaqueta. Para ello, se centrifuga un pequeño volumen de sangre (500 μ L) durante 15 minutos a 6000 rpm y se separa el sobrenadante del precipitado. Posteriormente se calcula la proporción de plaquetas no lisadas como:

$$\text{Lisis (\%)} = (\text{cpm pellet} / (\text{cpm pellet} + \text{cpm del sobrenadante})) \times 100$$

El recuento radiactivo de los sustratos se normaliza teniendo en cuenta la radiactividad en sangre y el recuento de plaquetas del animal en cuestión; si conocemos el número de plaquetas (plaquetas/mL) y la actividad en sangre (cpm/mL) podemos averiguar las plaquetas por unidad de actividad (plaquetas/cpm). Este valor

se normaliza por la radiactividad libre. Este dato se traslada a la actividad obtenida por el sustrato (cpm), con lo que obtenemos el número total de plaquetas. Finalmente, se divide este valor entre el área del sustrato (cm^2), que se expone a la circulación sanguínea, obteniéndose finalmente el resultado de plaquetas por unidad de superficie (plaquetas/ cm^2).

TÉCNICAS ADICIONALES QUE SE DESCRIBEN EN LOS ARTÍCULOS CON DETALLE:

- Agregación plaquetaria
- Evaluación hemodinámica
- Evaluación cGMP
- Evaluación de las enzimas hepáticas
- Contajes de células sanguíneas
- Test de coagulación
- Histología
- Inmunohistoquímica
- Western Blot