

## SEGUNDO OBJETIVO

### Donadores de óxido nítrico

La pérdida de continuidad del endotelio no sólo induce adhesión plaquetar, sino que también implica la falta de liberación local de los factores antiplaquetares derivados del endotelio (NO). Adicionalmente, ciertas condiciones patológicas (enfermedad arterial coronaria, diabetes, hiperlipemia, etc.) asociadas a la enfermedad aterosclerótica se caracterizan por una marcada disfunción endotelial (reducción en la biodisponibilidad de NO). Diversos estudios han sugerido, debido a la importancia del NO, que es necesario restaurar su producción y consiguientemente, el balance hemostático, para así aliviar la patología isquémica coronaria. Dicha restauración puede realizarse mediante la administración del sustrato para la NOS (L-arginina) (McNamara DB y cols., 1993), terapia génica (eNOS: Cable DG y cols., 1997; iNOS: Tzeng E y cols., 1996) o, más comúnmente, mediante el suplemento farmacológico (agudo o crónico) con fármacos donadores exógenos de NO (Guo DG & Philippu A. 1994).

Los resultados de los tres próximos estudios ponen de manifiesto los potentes efectos antitrombóticos de tres nuevos donadores de NO, con especificidad para plaquetas y con propiedades anti-isquémicas previamente descritas, sin la presencia de efectos hemodinámicos adversos.

A fin de facilitar la comprensión, se expone primeramente la discusión de los resultados obtenidos tras la administración oral, durante 10 días, de un nitratotiol (el LA419), dirigido al tratamiento de pacientes con angina estable (**Artículo II**). A continuación, se discutirán los resultados obtenidos tras la infusión intravenosa de dos nuevos nitrosotioles, el LA810 y el LA816 (**Artículos III y IV**), dirigidos al tratamiento de pacientes con síndrome isquémico agudo o pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea (PCI). Finalmente, se compararán las propiedades antiplaquetares del LA816 con las obtenidas por la aspirina y el clopidogrel, dos antitrombóticos convencionales usados para el tratamiento de pacientes con alto riesgo de sufrir un proceso trombótico agudo y se evaluará un posible efecto sinérgico (**Artículo IV**).

## OBJETIVO 2.1

### **ARTÍCULO II: *A novel anti-ischemic nitric oxide donor inhibits thrombosis without modifying haemodynamic parameters.***

Las arterias coronarias de pacientes que sufren angina estable contienen placas no-obstructivas (interrupción parcial del flujo sanguíneo), que no sólo disminuyen el aporte de oxígeno (isquemia), sino que tienen tendencia a fisurarse o romperse, presentando alto riesgo de sufrir eventos trombóticos (Thadani U. 1999). Por ello, el tratamiento de pacientes con angina estable se basa en una terapia combinada de agentes antiisquémicos y aspirina, cuyos principales objetivos son aliviar los síntomas isquémicos y reducir el riesgo de trombosis (Fihn SD y cols., 2001; Parmley WW. 1998).

El uso de donadores convencionales de NO, como los nitratos orgánicos (nitroglicerina), es especialmente efectivo en la restauración hemodinámica del flujo, puesto que mejoran la perfusión del corazón isquémico; sin embargo, al carecer las plaquetas de la vía metabólica necesaria para la biotransformación de nitratos en NO, sus propiedades antitrombóticas son escasas. Se ha descrito, que para inhibir la agregación plaquetar *in vitro* se necesitan concentraciones de nitroglicerina de 100  $\mu\text{mol/L}$ , mientras que la concentración estimada de nitroglicerina en plasma, con el uso de nitroglicerina transdérmica o sublingual, está entre 2-20 nmol/L (Megson IL & Webb DJ. 2000). Estos resultados sugieren que la donación sistémica de nitratos en humanos inhibe la agregación plaquetar, pero sólo a dosis que resultan con indeseables efectos hipotensores.

Este segundo artículo pone de relieve que la administración oral, durante 10 días, de LA419, un nuevo nitrato específico para plaquetas con las propiedades antiisquémicas previamente descritas, disminuye el riesgo trombótico sin alterar los parámetros hemodinámicos. Para determinar los potenciales efectos antiplaquetares de LA419 se usó un reconocido nitrato convencional, el isosórbido-5-mononitrato (IS-5-MN), como control positivo.

Hoy por hoy existen divergencias, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, sobre las propiedades antiplaquetares de los nitratos. Mientras algunos autores les atribuyen propiedades antitrombóticas (Karlberg KE y cols., 1992), otros aseguran que no presentan efectos antitrombóticos ni antiagregantes (Mehta J & Mehta P. 1980). Nuestros resultados, en concordancia con lo previamente descrito por Wallen NH y cols. (1994), indican que la administración de IS-5-MN a dosis de 0.9 mg/Kg inhibe la agregación

plaquetar *in vitro*, pero no afecta a la formación del trombo mural plaquetar *in vivo*. Dosis más elevadas de IS-5-MN (1.8 mg/Kg) consiguen reducir la deposición plaquetar *in vivo*; sin embargo, la aparición concomitante de efectos adversos, tales como daño hepático y la caída de la presión arterial, elimina toda posibilidad de uso terapéutico. En línea con estos resultados, *Wallen NH y cols.*, (1994) en un estudio en pacientes sanos, evidenciaron que los efectos antiplaquetares del isosórbido dinitrato iban asociados a efectos hipotensores.

Al analizar la deposición plaquetar tras la administración de LA419, a razón de 0.9 mg/Kg, se aprecia que, a diferencia del IS-5-MN, LA419 reduce la formación de trombo a bajas velocidades de cizalladura (212/s), típica de arterias coronarias no estenosadas (arterias con presencia de stents), sin la presencia de efectos hemodinámicos adversos. Para inhibir la activación plaquetar, en condiciones de flujo de alto riesgo (1690/s), típica de arterias severamente estenosadas, se requiere aumentar los niveles de NO mediante el incremento en la dosis de LA419 (1.8, 3.6 y 5 mg/Kg). De este modo, cuanto mayor es el estímulo trombogénico -condiciones de alto riesgo- mayor es la dosis necesaria de fármaco para inhibirlo. Sin embargo, ninguna de las dosis de LA419 evaluadas produce una modificación significativa en los parámetros hemodinámicos y en cuanto a la presencia de daño hepático, sólo la dosis más alta de LA419 (5 mg/Kg) lo produce. Por un lado, estos resultados sugieren que LA419 presenta una mayor especificidad plaquetar, probablemente fruto de una mayor liberación de NO en las cercanías de la plaqueta y/o debido a la presencia de un grupo tiol en la estructura del compuesto, hecho que facilita la conversión del nitrato a NO. Estos resultados no exhiben la posible presencia de efectos hipotensores asociados a la administración de LA419, pero estos, probablemente, se observarían a dosis mucho mayores que las requeridas para alcanzar un efecto antitrombótico. Por otro lado, se observa que, a pesar de que dosis suprafarmacológicas de ambos donadores de NO producen un potencial efecto nocivo en la función hepática, las dosis de IS-5-MN requeridas para dañar las enzimas hepáticas fueron muy inferiores que las de LA419 (0.9 y 5 mg/Kg respectivamente).

*Keschyov AL y cols.* (2003) han propuesto, en sus estudios *in vitro*, la posibilidad de que los efectos antitrombóticos de la nitroglicerina fueran independientes de la liberación de NO. Sin embargo, el sostenido aumento en los niveles de cGMP y la inhibición del efecto antiplaquetar de LA419, tras su conjunta administración con P-TIO (un captador de NO) y ODQ (un inhibidor de la guanilato ciclasa) indican que la actividad

antitrombótica de LA419 procede de la liberación de NO de la molécula y el consiguiente aumento de cGMP.

- *A pesar de no haber sido incluidos en este artículo, se han realizado estudios adicionales que valoran el efecto de los nitratos sobre la pared vascular. (Ver Anexo I; página 176)*

---

## OBJETIVO 2.2

**ARTÍCULO III:** *Inhibition of thrombosis by a novel platelet selective S-nitrosothiol compound without hemodynamic side effects.*

**ARTÍCULO IV (parcialmente):** *Effects of a novel platelet NO-donor (LA816), aspirin, clopidogrel and combined therapy in inhibiting flow and lesion-dependent thrombosis in the porcine ex vivo model.*

El GSNO libera NO mediante la acción de enzimas asociadas a las membranas plaquetares e inhibe, por ello, la adhesión y agregación plaquetar en mayor proporción que su efecto en el tono vascular. Estudios previos han demostrado, que las dosis requeridas de nitroglicerina para alcanzar el mismo efecto inhibitor que el GSNO producen hipotensión (Langford EJ y cols., 1996). Evidencias considerables en estudios en animales, voluntarios sanos y pacientes, han demostrado las propiedades antitrombóticas del GSNO y su selectividad para las plaquetas (de Belder AJ y cols., 1994), sin la presencia de efectos hipotensores concomitantes. Sin embargo, en determinadas condiciones clínicas, el estímulo de activación plaquetar es tal que supera el efecto inhibitor del GSNO y las dosis requeridas para atenuarlo, van asociadas a episodios hipotensores. Precisamente, la aprensión a la aparición de estos efectos adversos explica el que no se hayan realizado estudios de dosis encaminados a evaluar, detalladamente, el grado de especificidad de las propiedades antitrombóticas del GSNO en pacientes. Por ello, el uso de modelos animales que permitan evaluar las propiedades antitrombóticas y hemodinámicas de nuevos donadores de NO es de suma importancia.

Al evaluar los efectos obtenidos tras la administración intravenosa de LA810 y LA816 y compararlos con los obtenidos tras la administración intravenosa de GSNO (administrados a dosis equimolares), se observa que los tres nitrosotioles ejercen el

mismo efecto inhibitor (aproximadamente del 50% en relación al pre-tratamiento) en la deposición plaquetar desencadenada a altas velocidades de flujo (1690/s), típicas de arterias moderadamente estenóticas, tanto en vasos ligera como severamente dañados. Sin embargo, bajo condiciones de flujo típicas de arterias coronarias no estenosadas, LA810 reduce la formación de trombo desencadenada por pared vascular porcina ligera y severamente dañada, mientras que LA816 y GSNO sólo inhiben la trombosis inducida por pared vascular severamente dañada. En su conjunto, estos resultados sugieren que las propiedades antitrombóticas de los tres nitrosotioles, administrados a igual dosis, es muy similar, tanto en condiciones de bajo como de alto riesgo trombótico.

Al analizar la evolución de la presión arterial tras la administración intravenosa de los tres donadores de NO se observa que, mientras los animales tratados con LA810 y LA816 sólo presentan un ligero, pero nunca significativo y puntual descenso de la presión arterial, la administración de GSNO produce importantes efectos hipotensores (30% de reducción en relación a la presión arterial en condiciones basales, pre-tratamiento) que se mantienen a lo largo de todo el periodo de infusión del fármaco. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por *Vodovotz Y y col.*, quienes analizaron los efectos antitrombóticos y hemodinámicas del GSNO en el modelo porcino tras lesión vascular producida por el balón de angioplastia, observando que las propiedades antitrombóticas del GSNO iban acompañadas de efectos hipotensores concomitantes. De este modo, nuestros resultados ponen de manifiesto que la especificidad plaquetar de LA810 y LA816 es mucho mayor que la del GSNO y, por ello, presentan importantes propiedades antiplaquetares/antitrombóticas sin la presencia de efectos hemodinámicos adversos.

En el análisis inmunohistoquímico realizado, los acúmulos de plaquetas concuerdan con los resultados obtenidos en la deposición plaquetar y en cuanto a la deposición de fibrina, se aprecia una marcada reducción. A pesar de que no existe aún una clara explicación que justifique dicha reducción, sí se ha descrito que el NO actúa sobre el factor XIII (regulando la actividad de transglutaminasas) (Bernassola F y cols., 1999) el cual, a su vez, cataliza la unión de los monómeros de fibrina durante la coagulación plaquetar, estabilizando así el coágulo.

El análisis de los parámetros de coagulación en los distintos tratamientos refleja que, tanto el LA810 como el LA816, prolongan el tiempo de protrombina, reduciendo así

la coagulación. Por un lado, se ha descrito la capacidad de la L-arginina (precursor del NO) de inhibir la activación de la hemostasia, estabilizando así la coagulación y función plaquetar. Por otro, también se ha descrito la capacidad del NO de suprimir el factor tisular (Yang Y & Loscalzo J. 2000), un importante activador de la cascada de coagulación especialmente en lesiones vasculares severas. Con estos datos se puede concluir que ambos donadores exógenos de NO no sólo interceptan la adhesión y agregación plaquetar, sino que además actúan en el proceso de hemostasia.

Al igual que el LA419, la evaluación de los niveles plasmáticos y plaquetares del cGMP tras la infusión intravenosa de LA810 y LA816, así como también la reversibilidad de los efectos antiplaquetares por un inhibidor selectivo de la guanilato ciclasa (ODQ) o un captador de NO (P-TIO) ponen de manifiesto que ambos donadores de NO producen sus efectos antitrombóticos mediante la liberación de NO y posterior síntesis de cGMP.

Finalmente, se abordaron estudios moleculares a nivel de señalización intraplaquetar, para identificar si LA810, LA816 y/o GSNO actúan por un mecanismo adicional a la elevación de los niveles intracelulares de cGMP. Se escogió el estudio del RhoA debido a la importancia de las proteínas-G en los procesos de activación celular y por la sugerencia de que RhoA está implicado en la expresión del receptor GPIIb/IIIa en la superficie plaquetar (la adición de exoenzima C3, antagonista de RhoA, inhibe la agregación plaquetaria) (Morii N et al., 1992). Tras realizar el subfraccionamiento subcelular de la plaqueta y analizar la expresión proteínica de RhoA, se observa que los tres nitrosotioles disminuyen la expresión en membrana (activa) de RhoA. Estos resultados, sugieren que el NO regula la activación de RhoA, la subsiguiente reorganización esquelética y la pasivación plaquetar. Por todo ello, RhoA podría ser una importante diana para la inhibición de la vía del NO/cGMP desencadenada por donadores de NO, tal y como ya se ha descrito con anterioridad en cultivo de células endoteliales (Begur N y cols., 2002).

## OBJETIVO 2.3

**ARTICULO IV (parcialmente): *Effects of a novel platelet NO-donor (LA816), aspirin, clopidogrel and combined therapy in inhibiting flow and lesion-dependent thrombosis in the porcine ex vivo model.***

La presencia de eventos isquémicos, después de intervención coronaria percutánea (PCI), es un proceso dependiente del trombo plaquetario, que nace como resultado de la disrupción mecánica de la placa y la embolización distal del trombo plaquetar dentro de la microcirculación coronaria. Por ello, el tratamiento antiplaquetario es fundamental para una intervención coronaria satisfactoria. Debido a que son múltiples las vías que contribuyen a la activación plaquetar, se ha optado por la combinación de agentes antiplaquetares con distintos modos de actuación. El tratamiento antitrombótico habitual (heparina, aspirina y clopidogrel) es una buena alternativa terapéutica, puesto que reduce la incidencia temprana de trombosis, desencadenada por el stent (dentro de los 3 primeros días tras la intervención), entre aproximadamente un 0,5 a 2,0% (Cutlip DE y cols., 2001; Orford JL y cols., 2002; Philipp R & Grech ED. 2003). Sin embargo, debido a que los eventos cardiovasculares siguen siendo elevados, es necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, más seguras y más efectivas, que puedan ser administradas antes de PCI con la finalidad de reducir la presencia de eventos tras el proceso de intervención.

Debido a que el estímulo trombogénico desencadenado por pared desendotelizada a bajas condiciones de flujo es leve e induce mayoritariamente adhesión plaquetar (una monocapa sin la formación mural del trombo), ni la aspirina, el clopidogrel o el LA816 (todos ellos agentes antiagregantes) afectan los niveles de deposición, tal y como previamente se ha descrito en la literatura (Lam JY y cols., 1988). Contrariamente, las propiedades antitrombóticas, tanto del LA816 como del clopidogrel, en la formación del trombo mural inducido por sustratos vasculares severamente dañados, es muy superior a la alcanzada por la aspirina en este modelo porcino. Por un lado, múltiples estudios han demostrado que la aspirina no afecta a la incidencia en la formación del trombo mural (Meyer BJ y cols., 1998) a pesar de que sí reduce la agregación plaquetar *in vitro*; es decir en condiciones en donde está disminuido el calcio libre.

Al comparar las propiedades antitrombóticas de LA816 con las del clopidogrel bajo estas condiciones de riesgo, se observa que las propiedades antitrombóticas de LA816, administrado de manera aguda, son similares a las obtenidas tras la administración de clopidogrel, administrado durante 3 días. Además, también se aprecia que el tratamiento combinado de clopidogrel y LA816 es muy superior a la sola administración de clopidogrel. Este resultado posiblemente deriva de un efecto sinérgico entre LA816 y clopidogrel debido a la complementación de las diferentes vías de activación plaquetar inhibidas por los distintos fármacos.

Además de las propiedades anti-isquémicas y antitrombóticas, la donación de LA816 puede también reducir la presencia de eventos clínicos dado que, por un lado, existe un efecto sinérgico entre los donadores exógenos de NO y los agentes trombolíticos y por otro lado, la coadministración de NO con aspirina puede compensar la inhibición en la síntesis endotelial de NO y  $\text{PGI}_2$  producida por la aspirina.

Finalmente, es sabido el importante riesgo de sangrado asociado a la administración conjunta de la aspirina y el clopidogrel. A pesar de no ser objeto de este estudio, nuestros resultados (en el modelo porcino) muestran que la combinación de la aspirina, el clopidogrel y el LA816 no está asociada a variaciones en el hematocrito o en la presión arterial, además de no haberse apreciado un aumento en el sangrado durante la cirugía; es decir, sugieren que el triple tratamiento no va asociado a un aumento en el riesgo de sangrado. Sin embargo, son necesarios posteriores estudios clínicos que centren su atención en este importante aspecto.



***CONCLUSIONES***

---

**ARTÍCULO I**

---

***Antithrombotic effects of saratin on human atherosclerotic plaques***

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este primer estudio se podría concluir que:

1. La inhibición, local y específica, (no sistémica) de la interacción entre el colágeno tipo I/III y el vWF (dominio A3) por la saratina reduce la respuesta plaquetar desencadenada por distintos grados de lesión aterosclerótica humana, bajo condiciones hemodinámicas típicas de arterias coronarias moderadamente estenóticas (800/s), sin la presencia de efectos sistémicos.
2. La saratina parece reducir más eficazmente la trombosis desencadenada por superficies altamente trombogénicas (vasos severamente dañados y placas ateroscleróticas) que la inducida por superficies denudadas o con presencia de estrías grasas.

→ **Relevancia clínica:** Además de las conclusiones anteriormente expuestas es preciso tener en consideración los siguientes datos:

1. L. Badimon y col. (1986) han descrito que, bajo condiciones de flujo de 800/s, las plaquetas se degranulan y extienden lo suficiente como para cubrir la superficie dañada, induciendo así la formación del trombo mural.
2. La mayor prevalencia de síndromes coronarios agudos dependientes de trombosis ocurren en arterias coronarias moderadamente estenóticas (Fuster V, y cols., 1990)
3. Superficies altamente trombogénicas están mayoritariamente asociadas a la presentación de síndromes coronarios agudos (Fernandez-Ortiz A y cols., 1994, de Korte CL y cols., 2000)
4. La saratina ha demostrado en estudios previos sus propiedades anti-restenóticas (Barnes CS y cols., 2001)

## ARTÍCULO I

Por todo ello, es posible afirmar que la Saratina puede ser una prometedora estrategia para el tratamiento local con stents recubiertos de fármaco en vasos revascularizados, debido a que los procedimientos de intervención mecánica suelen exponer superficies altamente trombogénicas a la circulación arterial.

## ARTÍCULO II

***A novel anti-ischemic nitric oxide donor inhibits thrombosis without modifying haemodynamic parameters***

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este segundo estudio se podría concluir que:

1. A diferencia del IS-5-MN, el LA419 inhibe la formación de trombo inducida por distintos grados de lesión vascular y condiciones de flujo, de manera dosis dependiente, sin modificaciones en los parámetros hemodinámicos o alteración de enzimas hepáticas.
2. A pesar de que el mecanismo de tolerancia no se conoce con total precisión, la biodisponibilidad de grupos tiol juega un importante papel. Por ello, el LA419, al contener un grupo tiol en su estructura molecular, podría reducir la incidencia de la tolerancia. Sin embargo, es imprescindible la realización de ulteriores estudios al respecto, que sin duda nos permitirán determinar con mayor precisión la incidencia de la tolerancia.

→ **Relevancia clínica:** La presencia de propiedades antitrombóticas en este nuevo nitrato selectivo para plaquetas ofrece un mecanismo adicional, por el cual dicho compuesto mejoraría la perfusión del corazón isquémico. En este sentido, el uso oral de LA419 se nos presenta como una prometedora estrategia al presentar una doble diana terapéutica para el tratamiento de pacientes que padecen enfermedad cardíaca isquémica con presencia de riesgo trombótico.

---

**ARTÍCULOS III-IV**

---

***Inhibition of thrombosis by a novel platelet selective S-nitrosothiol compound without hemodynamic side effects.***

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este tercer estudio se podría concluir que:

1. La donación aguda de NO con dos nuevos S-nitrosotioles específicos para plaquetas (LA810 y LA816) reduce la trombosis mural desencadenada por pared vascular dañada (superficial y profundamente dañada) con efectos antitrombóticos independientes de la velocidad de cizalladura, y todo ello sin la presencia de efectos hipotensores asociados.

→ **Relevancia clínica:** La administración aguda de LA810 y LA816 puede ser una estrategia altamente eficaz para reducir el riesgo de eventos trombo-isquémicos así como para restaurar la biodisponibilidad de NO en pacientes con síndrome coronario agudo y/o a quienes se les vaya a realizar procedimientos de revascularización (angioplastia/stent).

---

**ARTÍCULO IV**

---

***Effects of a novel platelet NO-donor (LA816), aspirin, clopidogrel and combined therapy in inhibiting flow and lesion-dependent thrombosis in the porcine ex vivo model***

Los resultados obtenidos en el último estudio proporcionan evidencias que permiten concluir que:

1. La administración aguda de este nuevo donador de NO específico para plaquetas, el LA816, proporciona la misma protección antitrombótica que la conseguida tras 3 días de tratamiento con clopidogrel

**→ Relevancia clínica:**

a) De acuerdo con esta conclusión y dado que los estudios PCI-CURE (2001) y CREDO (2002) demostraron que la administración, anterior a la intervención, del clopidogrel a pacientes con angina inestable sin elevación del segmento-ST que reciben aspirina, reducía la presencia de eventos cardiovasculares. La administración aguda de LA816 podría ser tan beneficiosa como el pre-tratamiento del clopidogrel en la reducción de eventos cardiovasculares.

b) La administración conjunta de la aspirina y el clopidogrel a pacientes a los que se les va a realizar cirugía coronaria (bypass coronario) va asociado a un aumento de sangrado, y por ello se recomienda dejar de administrar clopidogrel una semana antes de la intervención. La administración aguda de LA816 podría eludir esta limitación. Sin embargo, son necesarios estudios clínicos que permitan afirmar la seguridad de LA816.

2. La terapia combinada del LA816, el clopidogrel y la aspirina ofrece una mayor protección, frente a posibles eventos tromboticos agudos, que la administración individual de cada uno de estos fármacos.

**→ Relevancia clínica:** Está demostrado que la activación plaquetar persiste, a pesar de la administración de antitrombóticos y anticoagulantes. Por lo tanto –y este concepto terapéutico debe ser resaltado–, cuanto más severa sea la enfermedad, más agresivo debe ser el tratamiento. Añadir fármacos antiplaquetares a los ya descritos podría aportar un beneficio adicional en estas situaciones clínicas.