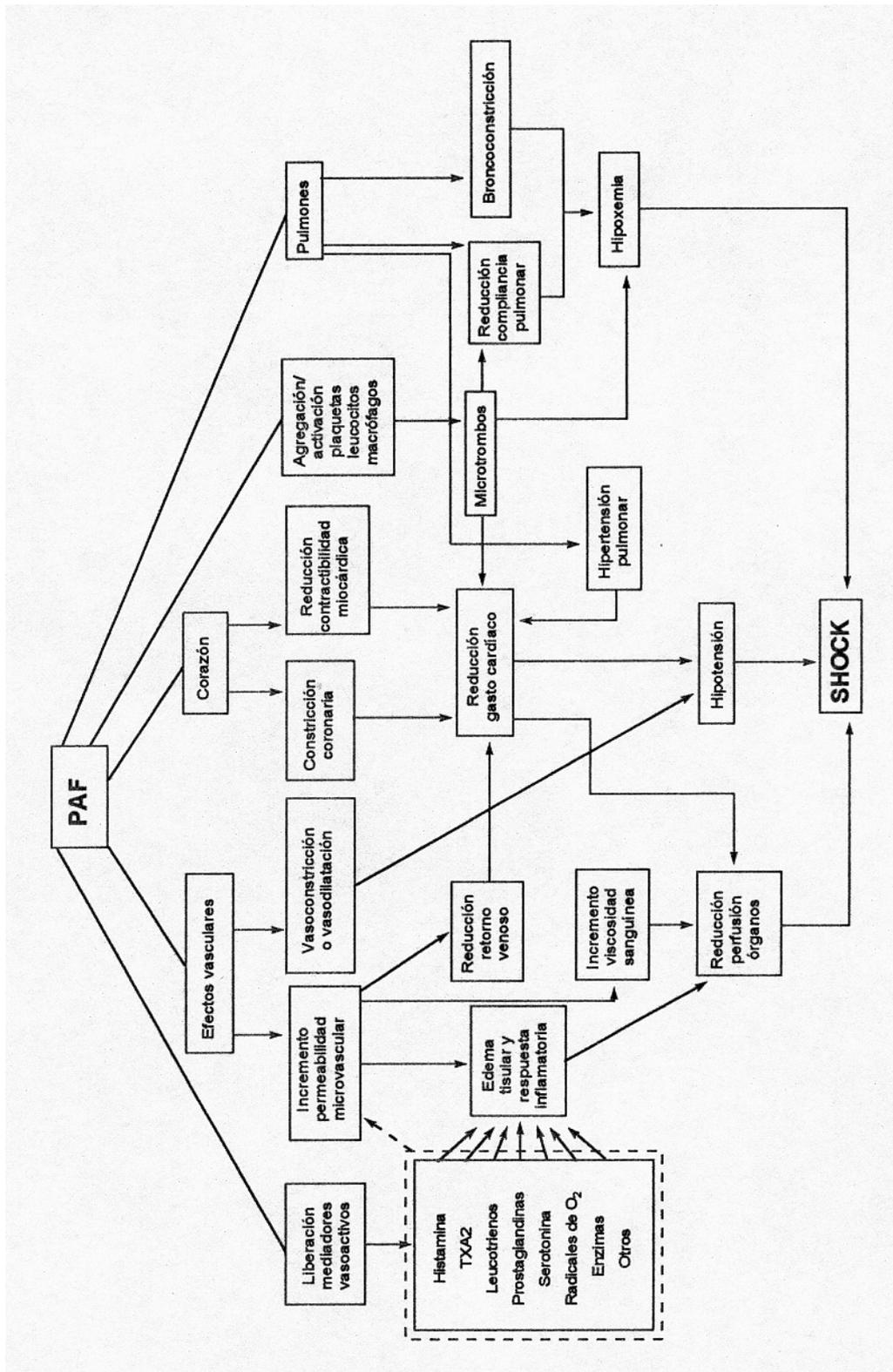


En la figura 7 se esquematizan los principales mecanismos directos e indirectos que intervienen en la aparición de un estado de shock inducido por PAF, así como sus principales interrelaciones (Feuerstein y Goldstein, 1987). Muchos de estos mecanismos se han comentado ya en el capítulo dedicado al shock. Básicamente, hay cuatro mecanismos principales que intervienen en la aparición de un estado de shock inducido por PAF:

- broncoconstricción y disminución de la compliancia pulmonar.
- vasoconstricción coronaria y efecto inotrópico negativo sobre el miocardio.
- activación de diferentes tipos celulares que liberan diversos mediadores vasoactivos promotores del shock.
- acción directa sobre los vasos sanguíneos con aumento de la permeabilidad vascular.



### ***I.3. Antagonistas del PAF***

### I.3.1. CLASIFICACIÓN.

En la estrategia terapéutica anti-PAF se han abordado distintos planteamientos; sin embargo, la mayoría de esfuerzos se han centrado en el desarrollo de antagonistas específicos que bloqueen la unión del PAF con su receptor.

Una clasificación completa de los distintos tipos de antagonistas específicos podría ser la siguiente (Koltai y cols., 1994):

1.- **Compuestos naturales:** los compuestos naturales más estudiados son los ginkgólidos, sobre todo el ginkgólido B (BN 52021). Estos compuestos, pertenecientes a la familia de los terpenos y aislados a partir de las hojas del árbol *Ginkgo biloba*, han sido desarrollados ampliamente por Ipsen-Beaufour. Los ginkgólidos no son antagonistas del PAF selectivos, ya que tienen actividad como inhibidores de las serina proteasas. El ginkgólido B es el más activo de todos ellos, aunque también hay que mencionar los ginkgólidos A (BN 52020), C (BN 52022), M (BN 52023) y J (BN 52024). Su estructura química complicada hace que su síntesis total sea bastante compleja.

Otra familia de compuestos naturales la constituye los lignanos, productos formados por dimerización oxidativa del hidroxialcoxifenilpropano. El más importante es la kadsurenona, lignano aislado de la planta *Piper futokadsurae* por Merck. Este producto demostró tener efectos específicos y potentes sobre la agregación plaquetaria inducida por PAF, además de otros efectos *in vivo*, siendo además el primer antagonista natural cuya estructura fue utilizada para realizar el diseño molecular del receptor del PAF, y también para el desarrollo de potentes antagonistas sintéticos.

2.- **Compuestos sintéticos:** en los últimos años se han sintetizado y desarrollado gran variedad de compuestos sintéticos con antagonismo específico del PAF. Se puede hacer una división en dos grandes grupos:

2.1- Antagonistas con un átomo de nitrógeno cuaternario: estos compuestos se caracterizan por tener similitud estructural con el PAF. La presencia de un átomo de nitrógeno

cuaternario permite la unión de estos compuestos al receptor del PAF, de manera análoga a como lo haría el amonio cuaternario del propio agonista. El primer producto sintetizado dentro de este grupo fue el CV-3988 (Takeda) que, aunque en un principio fue descrito como un inhibidor específico de la agregación plaquetaria inducida por PAF, posteriormente se comprobó que también inhibía la agregación inducida por ácido araquidónico y ADP, cuando se administraba a dosis elevadas. Una modificación destinada a solventar esta inespecificidad fue el CV-6209, que además presentaba una potencia unas 80 veces superior al CV-3988. Ambos compuestos son claramente análogos estructurales del PAF. Otros antagonistas de esta serie, con una menor similitud con el PAF, son: E-5880 (Eisai), CL 184,005 (American Cyanamid), SRI-63-072 (Sandoz), BN-52111 (Ipsen- Beaufour), TCV-309 (Takeda), y los compuestos de Uriach UR-10324 y UR-11353.

2.2.- Antagonistas con un átomo de nitrógeno  $sp^2$  heterocíclico: la presencia de este átomo permite la interacción con el receptor mediante la formación de puentes de hidrógeno. Otras características de algunos miembros de este grupo son la presencia de un átomo de azufre y de un grupo carbonilo. Los compuestos de este grupo presentan una gran variabilidad de estructuras químicas, pudiéndose subdividir en:

2.2.1.- *Derivados hetrazepínicos*: las triazolobenzodiazepinas (alprazolam, triazolam, brotizolam), utilizadas clásicamente como agentes psicotrópicos, son potentes inhibidores de la agregación plaquetaria inducida por PAF en plaquetas humanas, aunque su acción es inespecífica. El primer antagonista específico del PAF sintetizado dentro de este grupo fue el WEB-2086 (apafant, Boehringer Ingelheim), al que siguió el WEB-2170 (bepafant). Ambos compuestos mostraban una buena eficacia *in vitro* y una muy buena biodisponibilidad oral con una larga duración del efecto. El WEB-2086 es uno de los antagonistas del PAF más ampliamente estudiados a nivel preclínico, y ha sido utilizado frecuentemente en esta tesis como principal patrón de referencia. Otros compuestos de esta serie son: Y-24180 (Yoshitomi), E-6123 (Eisai), BN 50739 (Ipsen-Beaufour) y Ro 24-4736 (Hoffmann-LaRoche).

2.2.2.- *Derivados de piridina*: entre los compuestos que llevan un sustituyente 3-piridina destacan los siguientes: Ro 24-0238 (Hoffmann-La Roche), RP-59227 o

tulopafant y RP-66681 (Rhône Poulenc), YM-264 y YM-461 (Yamanouchi), SM-10661 (Sumitomo) y SR- 27417 (Sanofi). El compuesto de Uriach UR-12460, estudiado exhaustivamente en esta tesis, pertenece también a esta categoría (aunque algunos autores, como los ya mencionados al inicio de esta clasificación, incluyen el UR-12460 dentro del grupo de los derivados piperazínicos por contener un anillo de piperazina).

2.2.3.- *Derivados imidazólicos*: entre estos compuestos destaca el UK-74505 (modipafant, Pfizer). A partir de este compuesto, British Biotechnology ha sintetizado los compuestos BB-182, BB-823, BB-654 y BB-882 (lexipafant) mediante técnicas de diseño molecular. Otras importantes compañías como Sandoz, Schering, Wellcome y Takeda también han sintetizado antagonistas del PAF con estructura imidazólica.

2.2.4.- *Derivados de diariltetrahidrofurano*: la compañía que más compuestos de este tipo ha sintetizado es Merck, con un compuesto líder (L-652,731) utilizado para desarrollar los modelos de *ear muff* y del cilindro polarizado para los receptores del PAF (Dive y cols., 1989; Batt y cols., 1991). Otros compuestos destacados son: L-659,989, MK-287, L-671,284 y L-680,573.

2.2.5.- *Derivados piperazínicos*: Ipsen-Beaufour, Takeda y Sankyo son las tres compañías que más han trabajado con este tipo de moléculas. Como se comentó antes, algunas revisiones sitúan el compuesto de Uriach UR-12460 dentro de este grupo.

### I.3.2. EVOLUCIÓN DE LA LÍNEA DE ANTAGONISTAS DEL PAF EN LOS LABORATORIOS J. URIACH & CÍA., S.A.

A finales de 1986 se comenzó a desarrollar en el Centro de Investigación de Laboratorios J. Uriach & Cía., S.A. la línea de investigación sobre antagonistas del PAF. El proyecto comenzó con la síntesis de una cantidad importante de PAF y con el estudio exhaustivo de todos los antagonistas descritos hasta entonces. Estos compuestos podían agruparse ya en 2 grandes

familias: los emparentados estructuralmente con el PAF (compuestos cargados o iónicos) y los compuestos no cargados.

Se comenzó la síntesis de compuestos cargados, en los que el esqueleto de glicerol de la molécula de PAF se ciclaba para formar un anillo de 5 miembros. El primero de estos compuestos, el UR-10101, se sintetizó en marzo de 1987, pero pronto se vió que tanto las actividades de éste como de otros derivados estaban muy por debajo de las expectativas previstas (Bartrolí y cols., 1991a).

Modificaciones posteriores, especialmente la adición de un sustituyente empleado por Takeda, derivado de la piridina, mejoraron considerablemente las actividades conseguidas hasta el momento. Se sintetizó también el compuesto CV-6209, el antagonista del PAF líder de dicha compañía japonesa. Se prepararon un total de 175 compuestos con el mencionado sustituyente, de los cuales se eligieron dos con la intención de llevarlos a una fase clínica (Bartrolí y cols., 1991b; Carceller y cols., 1992a). Uno de ellos, el UR-11353, con una potente actividad antagonista, había dado muy buenos resultados en modelos de shock endotóxico. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que este producto poseía serios problemas de estabilidad química, que llevaron finalmente a la cancelación de su desarrollo en octubre de 1991.

Dado que la compañía Takeda seguía patentando productos, y que en una de sus patentes describía compuestos que poseían buena absorción oral y mayor estabilidad química, se decidió incorporar un nuevo sustituyente a alguna de nuestras moléculas seleccionadas. Efectivamente, se consiguieron compuestos activos y estables, como el UR-10356, homólogo al nuevo producto de Takeda, el TCV-309. Sin embargo, este nuevo compuesto se derivó al estudio de enfermedades de componente inflamatorio, y no al tratamiento del shock.

A mediados de 1988 se creyó apropiado iniciar una línea paralela de antagonistas del PAF no cargados, puesto que parecía bastante evidente que las moléculas cargadas eran incompatibles con una buena absorción. La indicación terapéutica que parecía estar más clara en esa época era el asma, y de aquí que las compañías más importantes buscaran compuestos absorbibles por vía oral.

Las primeras moléculas de este tipo fueron diseñadas a partir de una simplificación del compuesto líder de la compañía Boehringer-Ingelheim, el WEB-2086, una triazolobenzodiazepina en avanzado estado de desarrollo. Modificaciones posteriores llevaron al descubrimiento de un nuevo tipo estructural de antagonistas del PAF: las piridilcianometilpiperazinas (Carceller y cols., 1992b). Finalmente, la introducción de un grupo metilo en el anillo de piridina resultó ser importantísima, ya que los nuevos compuestos sintetizados mejoraron de 10 a 20 veces su actividad por vía oral. Durante el período de octubre de 1990 a noviembre de 1991 se sintetizaron 100 compuestos con este metilo adicional. Se seleccionaron doce compuestos para un predesarrollo farmacológico, de los cuales cuatro pasaron a un desarrollo más completo (Carceller y cols., 1993). Uno de los criterios de elección fue que tuvieran una buena actividad por vía oral, debido a que una de las posibles indicaciones era el tratamiento del asma. No obstante, su utilización en el shock estaría indicada probablemente por vía intravenosa.

Una amplia batería de pruebas de desarrollo realizadas tanto *in vitro* como *in vivo*, acompañada de estudios farmacocinéticos, toxicológicos y de estabilidad química, así como el hecho de presentar mayor simplicidad de síntesis (un solo centro quiral) que otros productos, permitió seleccionar el UR-12460 como compuesto líder para la indicación del shock.

Las estructuras químicas de los antagonistas del PAF que se han utilizado en esta tesis se muestran en la figura 8.

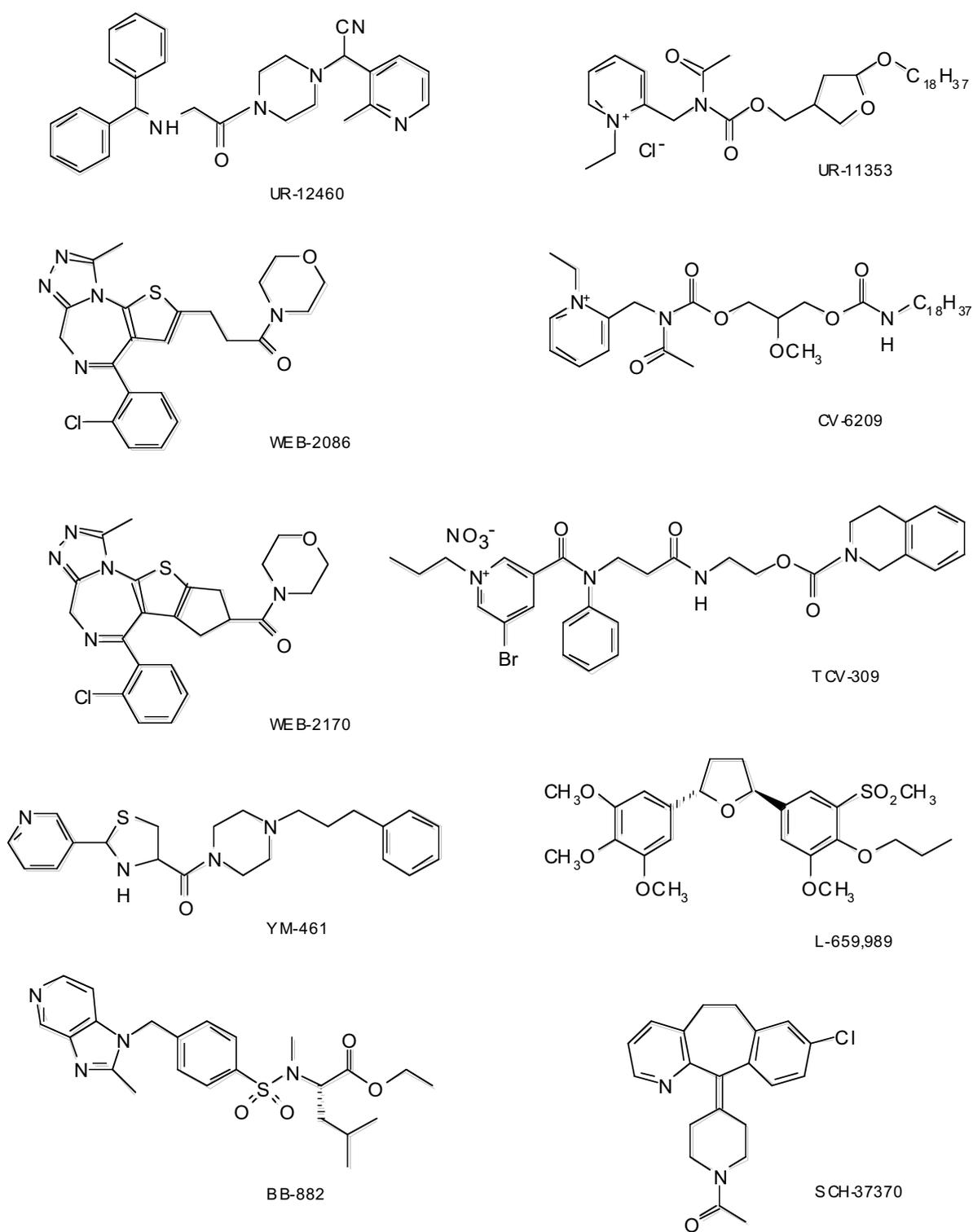


Figura 8.- Estructuras químicas de los antagonistas del PAF sintetizados por Uriach y de los diferentes compuestos utilizados como patrones de referencia.

### I.3.3. ANTAGONISTAS DEL PAF EN EL TRATAMIENTO DEL SHOCK.

La hipótesis de que los antagonistas del PAF podrían ser de utilidad en el tratamiento de los estados de shock se la plantearon Terashita y cols. en 1985, estudiando el efecto del CV-3988 en un modelo de shock séptico. Tras estos investigadores siguieron muchas otras compañías farmacéuticas con sus propios antagonistas: FR-900452 (Fujisawa), Kadsurenona (Merck), BN-52021 (Ipsen-Beaufour), SRI-63-072 (Sandoz), RP-55778 (Rhone Poulenc), WEB-2086 (Boehringer Ingelheim), etc. A pesar de su heterogeneidad estructural, la mayoría de antagonistas probados en modelos experimentales de shock tenía unos resultados comparables entre sí por lo que respecta a la mejoría de los síntomas. Estos estudios hicieron aumentar la evidencia de que el PAF podría tener una contribución destacada en el shock, sobre todo en el shock séptico (DeJoy y cols., 1993).

Tras los éxitos iniciales en las etapas preclínicas, muchas compañías farmacéuticas dirigieron el desarrollo clínico de sus antagonistas del PAF hacia dos campos muy atrayentes: el asma y el shock séptico. Más adelante también se iniciaron, aunque quizás de una forma más secundaria, estudios clínicos para otras indicaciones (colitis ulcerosa, pancreatitis, rechazo de trasplantes, etc.). Puede decirse que prácticamente todas las compañías farmacéuticas importantes han estado o están aún implicadas en el desarrollo de antagonistas del PAF para varias indicaciones (tabla 3).

Los primeros compuestos probados en la clínica del asma fueron los ginkgólidos aislados por Ipsen-Beaufour. Tras unos resultados no del todo satisfactorios, la clínica del BN-52063 (una mezcla de los ginkgólidos A, B y C) fue suspendida por razones industriales, al requerirse dosis altas para el desarrollo de la formulación oral, lo cual era incompatible con su obtención a partir del producto natural, la hoja del *Ginkgo biloba*. Otros antagonistas de potencia reconocida (WEB-2086, MK-287 y UK-74505) siguieron la estela de los ginkgólidos. Sin embargo, los resultados de los ensayos clínicos fueron bastante decepcionantes, puesto que no se observaron resultados globales positivos. Diez años después de que se iniciaran los primeros estudios clínicos en este campo, sólo hay dos compuestos que hayan alcanzado una fase III (tabla 4). Una explicación posible sería que la patogénesis

---

Abbott  
Alter  
American Cyanamid  
Boehringer Ingelheim  
British Biotechnology  
CytoMed  
Eisai  
Hoffmann LaRoche  
Ipsen-Beaufour  
Lacer  
Merck Co.  
Novartis  
Pfizer  
Rhone- Poulenc  
Roche  
Sandoz  
Sanofi  
Sankyo  
Schering  
Solvay  
Sumitomo  
Takeda  
Uriach  
Yamanouchi  
Yoshitomi

---

Tabla 3.- Principales compañías que están o han estado desarrollando antagonistas del PAF. De: R&D Focus, Febrero 1997 y Pharma Projects, Enero 1997.

Producto	Compañía	Fase clínica	Indicaciones
BN-50727 (Setipafant)	Beaufour-Ipsen	II (suspendido)	Colitis ulcerosa
BN-50730 (Rocefafant)		III (suspendido) II	Artritis reumatoide Asma alérgico
BN-52021 (Ginkgólido B)		II (suspendido) II (suspendido)	Trasplante renal Esclerosis múltiple
WEB-2086 (Apafant)	Boehringer Ingelheim	III (Japón)	Asma Rinitis alérgica Pancreatitis
BB-882 (Lexipafant)	British Biotech	Solicitado registro (Europa) III (EEUU) II (suspendido) I II	Pancreatitis Pancreatitis Asma Inflamación ocular Esclerosis múltiple
Y-24180	Yoshitomi	III	Asma Rinitis alérgica
E-6123	Eisai	II	Asma
UK-74505 (Modipafant)	Pfizer	II (suspendido)	Asma
CV-3988	Takeda	Suspendido	Dermatitis alérgica
TCV-309		I (suspendido)	Psoriasis, dermatitis atópica
YM-264	Yamanouchi	II (suspendido)	Asma
SR-27417 (Foropafant)	Sanofi	IIb/III	Asma
MK-287	Merck	II (suspendido)	Asma alérgico
SCH-37370	Schering Plough	II (suspendido)	Asma  Rinitis alérgica estacional
RP-59227 (Tulopafant)	Rhone-Poulenc	I (suspendido)	Asma
CMI-392	Cytomed	II	Psoriasis  Dermatitis de contacto  Enfermedad inflamatoria intestinal

Tabla 4.- Estado actual (Junio 1997) de los antagonistas del PAF en clínica para otras indicaciones además del shock.

del asma es complicada, con muchos mediadores implicados, incluyendo leucotrienos y citoquinas. Otra posibilidad es que las concentraciones locales del antagonista sean insuficientes para bloquear los efectos inflamatorios del PAF, incluso aunque se hayan conseguido niveles séricos adecuados. Esto podría explicarse por el proceso de regulación yuxtacrina atribuido al PAF: el PAF es mediador de la señal intercelular mientras se encuentra asociado a la superficie de la célula que lo sintetiza, más que si se encuentra libre en el fluido (Zimmerman y cols., 1993). Además, se ha sugerido recientemente que el PAF podría tener acciones en las células epiteliales del tracto respiratorio que no estuvieran mediadas por el receptor (Stoll y cols., 1994).

La otra indicación en la cual se pusieron inicialmente muchas esperanzas fue la del shock séptico. La mortalidad en pacientes con un shock establecido grave es del 50-75%. En Estados Unidos mueren cada año 100.000 pacientes a causa de un shock séptico (Parrillo, 1990). En España, la incidencia de sepsis estimada es de 20 casos por cada 1.000 ingresos hospitalarios (Gatell y cols., 1988). Los avances en la tecnología médica, como la utilización de fármacos inmunosupresores en la cirugía de trasplantes, y el aumento del número de pacientes ancianos e inmunodeprimidos (enfermos de sida, por ejemplo), así como el aumento de las resistencias bacterianas a los antibióticos, han originado un aumento progresivo en la incidencia de la sepsis y el shock séptico.

El primer antagonista del PAF que llegó a fases clínicas avanzadas para la indicación de shock séptico fue de nuevo un ginkgólido, el BN-52021, que, a pesar de obtener resultados bastante prometedores en los estudios iniciales (Dhainaut y cols., 1994), vio suspendido su desarrollo a principios de 1996. Otro de los compuestos punteros, el BB-882 (lexipafant), detuvo también su desarrollo en 1994 tras unos resultados de fase II decepcionantes. Después de unos resultados positivos en un primer estudio de fase II, el aumento del número de pacientes no permitió encontrar diferencias significativas entre el grupo placebo y el grupo tratado con el antagonista.

El estado actual de la clínica de los antagonistas del PAF en el shock séptico y en las lesiones por isquemia-reperfusión se resume en la tabla 5. Según las informaciones suministradas por las propias compañías, sólo hay tres compuestos que siguen actualmente

Producto	Compañía	Fase clínica	Indicaciones
BN-52021 (Ginkgólido B)	Beaufour-Ipsen	III (suspendido)	Shock séptico
BB-882 (Lexipafant)	British Biotech	II (suspendido) II	Shock séptico Lesiones por isquemia-reperusión en <i>coronary artery bypass graft</i>
BB-2113 (Nupafant)		Suspendido	Lesiones por isquemia-reperusión
E-5880	Eisai	II	Shock séptico (CID, FMO)
CV-3988	Takeda	Suspendido	Shock séptico
TCV-309		II	Shock séptico
SM-12502	Sumitomo	II	CID
CL-184005	American Cyanamid	I	Shock séptico
ABT-299	Abbott	I (suspendido)	Shock séptico
LM-3370	Lipha	I (suspendido)	Shock séptico
PCA-4248 (Tiapafant)	Alter/Insem	I	Shock séptico

Tabla 5.- Estado actual (Junio 1997) de los antagonistas del PAF en clínica para indicaciones de shock. (CID: coagulación intravascular diseminada; FMO: fracaso multiorgánico).

una fase II y uno de ellos, el TCV-309, debía finalizarla teóricamente en 1994. Los otros dos, el E-5880 y el SM-12502 han sido dirigidos para el tratamiento de alteraciones concretas del shock séptico, como la coagulación intravascular diseminada, y no para un tratamiento global. Por otra parte, da la impresión de que la estrategia de antagonizar el PAF está perdiendo fuerza, puesto que hay muy pocos compuestos en desarrollo preclínico.

En los últimos años, las empresas biotecnológicas han desarrollado una serie de compuestos con un potencial teórico muy atractivo, como por ejemplo anticuerpos monoclonales anti-endotoxina o anti-TNF, inhibidores de mediadores inflamatorios como las interleuquinas, etc. Sin embargo, la mayoría de estas aproximaciones han fracasado espectacularmente, como se resume en la tabla 6. Todos los ensayos clínicos con nuevas terapias anti-sepsis realizados hasta la fecha han sido incapaces de mostrar eficacia.

La patogénesis del shock séptico es extremadamente complicada, e implica la interacción de una amplia variedad de mediadores. Es en cierta manera lógico que los nuevos tratamientos para el shock séptico, que actúan contra un sólo tipo de mediador, no se estén mostrando efectivos clínicamente. El hecho de que sí hayan mostrado efectividad en modelos experimentales en animales puede explicarse si se tiene en cuenta que en los experimentos con animales se utilizan sujetos más homogéneos, jóvenes y sanos que los pacientes con sepsis, lo cual hace difícil la extrapolación de los resultados.

Una teoría interesante, que intenta explicar el porqué de estos fracasos, ha sido formulada recientemente (Bone, 1996). Según esta teoría, la patogénesis de la sepsis pasa por tres fases, cada una de las cuales tiene un componente proinflamatorio y otro antiinflamatorio. En la primera fase, correspondiente al foco inicial de infección o lesión, los mediadores proinflamatorios (TNF, IL-1 y IL-6, principalmente) combaten la infección eliminando el tejido dañado, favoreciendo la curación de heridas, etc. Los mediadores antiinflamatorios (IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, TGF- $\beta$ , etc.) se encargarían de regular a los anteriores. Si la homeostasis no se restablece, los mediadores pasan a la circulación sistémica (segunda fase). Esto puede ocurrir porque la agresión inicial es muy importante, o porque tiene lugar una agresión secundaria, o porque se producen niveles inadecuados de alguno de los mediadores.

Si el equilibrio no se restaura a nivel sistémico, se pasa a la tercera fase, en la cual los

Producto	Compañía	Categoría farmacológica	Fase clínica	Causa del abandono
Centoxin (Nebacumab)	Centocor	Anticuerpo anti-endotoxina	Comercializado y posteriormente retirado	Mortalidad excesiva en pacientes sin bacteremia por Gram negativos
E5 (Edobacomab)	Xoma	Anticuerpo anti-endotoxina	III	Eficacia insuficiente
Antril	Synergen	Antagonista interleuquina-1	III	No reduce significativamente la mortalidad
Receptor soluble TNF	Immunex	Receptor soluble del TNF	II	Empeora con respecto al placebo
T-88	Chiron	Anticuerpo anti-TNF	III	No reduce la mortalidad
Bradycor	Cortech	Antagonista bradiquinina	II	No reduce la mortalidad
Bay-x-1351 (Nerelimomab)	Chiron/Bayer	Anticuerpo anti-TNF	III	No reduce la mortalidad
	Miles	Anticuerpo anti-TNF	III	Sin beneficio en pacientes que no están en estado de shock
CDP-571 (Bay-10-3356)	Celltech/Bayer	Anticuerpo anti-TNF	II	Se decide no continuar los estudios a la vista de los resultados del Nerelimomab

Tabla 6.- Últimas aproximaciones terapéuticas al shock séptico que han sido abandonadas en distintas fases de su desarrollo clínico.

niveles persistentes de mediadores proinflamatorios dan lugar a los signos clínicos de sepsis y, eventualmente, shock y fracaso multiorgánico. Niveles persistentes de los mediadores antiinflamatorios pueden dar lugar a anergia y/o disfunción inmune. Algunos pacientes pueden tener una reacción mixta. Si estas fuerzas opuestas logran restablecer la homeostasis, el paciente sobrevive. Sin embargo, hay pacientes que desarrollan una respuesta exagerada en alguno de los dos sentidos y otros que carecen de la capacidad de desarrollar una respuesta compensatoria adecuada. Estos dos tipos de pacientes mueren a menos que se encuentre una forma de restaurar el equilibrio.

Si esta hipótesis es cierta, puede especularse con que los ensayos clínicos fracasan porque los fármacos se están administrando a pacientes que ya tienen un estado predominantemente antiinflamatorio o mixto. También así podría explicarse la inesperada observación, en algún ensayo clínico, de un incremento de la mortalidad en los pacientes tratados con respecto al grupo placebo.

Es posible que el éxito en la terapia del shock séptico venga, en un futuro próximo, no sólo de la utilización de terapias combinadas dirigidas a un grupo de mediadores, sino también del desarrollo de métodos rápidos de detección del *status* inflamatorio e inmunológico de cada paciente en concreto.

## ***I.4. Objetivo***

El objetivo de este trabajo ha sido valorar la efectividad de los antagonistas del factor activador de las plaquetas (PAF) en un conjunto de modelos experimentales que abarcan varios modelos de shock en diferentes especies de animales de laboratorio. Para ello se ha utilizado el UR-12460, un potente antagonista del PAF sintetizado en los Laboratorios J. Uriach & Cía., S.A. Para completar el estudio se han utilizado otros antagonistas del PAF, provenientes tanto de Uriach como de otras compañías farmacéuticas.

En esta tesis no se ha pretendido discutir el potencial terapéutico de unos compuestos concretos en el tratamiento del shock sino que se ha buscado desarrollar una batería de modelos experimentales que permitan obtener unos parámetros definidos. El estudio de estos parámetros, considerados por nosotros como "marcadores" del shock, puede ser una herramienta útil una vez se hayan clarificado las posibilidades reales de los antagonistas del PAF en esta indicación clínica.

Los modelos experimentales estudiados comprenden el shock anafiláctico, el shock por oclusión de las arterias esplánicas, la isquemia-reperusión miocárdica, el shock endotóxico y el shock hipovolémico. Estos modelos de shock, aunque de etiología muy diversa, comparten unos mecanismos y sintomatología similares. En todos ellos se ha hablado del PAF como posible mediador implicado.

La puesta a punto de estos modelos experimentales - algunos muy conocidos, otros más novedosos - nos ha permitido conocer mejor las alteraciones bioquímicas, hemodinámicas y metabólicas características de los estados de shock en diferentes especies, y nos hace esperar que puedan ser de utilidad en futuros estudios sobre antagonistas del PAF en el tratamiento de este complejo síndrome.

## ***II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL***

## ***II.1. Introducción***

## II.1.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE USO FRECUENTE.

### **Soluciones de PAF:**

Solución stock de PAF C<sub>18</sub> 0.5 mg/mL: se pesan 5 mg de PAF y se disuelven en 10 mL de etanol. Esta solución se conserva en el congelador.

Solución madre de PAF C<sub>18</sub> 5 g/mL: 0.5 mL de la solución stock se llevan a 50 mL con una solución de seroalbúmina bovina al 0.25%. Esta solución se conserva en nevera a 4°C. Se prepara cada dos semanas o bien antes, si se observan anomalías en las respuestas provocadas por el PAF.

Solución de seroalbúmina bovina (BSA) 0.25%: se pesan 250 mg de seroalbúmina bovina y se disuelven en 100 mL de suero fisiológico. Esta solución se conserva en nevera a 4°C.

### **Solventes:**

Suero fisiológico (SF): se pesan 90 g de cloruro sódico y se disuelven en 10 L de agua bidestilada. Se conserva a temperatura ambiente.

Tween 80® 1%: se pesan 20 g de Tween 80® y se disuelven en 2 L de agua bidestilada. Se conserva en nevera a 4°C.

### **Anticoagulantes:**

Solución "madre" de suero fisiológico heparinizado: se toma 1 mL de un vial de heparina comercial (5.000 UI/mL) y se lleva a 100 mL con suero fisiológico. Se conserva en nevera a 4°C. Se prepara cada dos semanas.

Citrato sódico 3.8%: se pesan 3.8 g de citrato sódico trihidrato y se disuelven en 100 mL de suero fisiológico. Se conserva a temperatura ambiente. Preparación semanal.

EDTA (ácido etilendiamintetraacético) 5%: se pesan 5 g de EDTA sal dipotásica dihidratada y se disuelven en 100 mL de agua bidestilada. Se conserva a temperatura ambiente.

### **Anestésicos:**

Pentobarbital sódico 20 mg/kg (para conejo): se pesan 2 g y se disuelven en 100 mL de agua bidestilada. Se conserva en nevera a 4°C. Preparación semanal.

Pentobarbital sódico 5 mg/mL (para rata): se pesan 500 mg y se disuelven en 100 mL de agua bidestilada. Se conserva en nevera a 4°C. Preparación semanal.

Pentobarbital sódico 6 mg/mL (para rata): se pesan 600 mg y se disuelven en 100 mL de agua bidestilada. Se conserva en nevera a 4°C. Preparación semanal.

Uretano 15% (para cobayo): se pesan 15 g y se disuelven en 100 mL de agua bidestilada. Se conserva en nevera a 4°C. Preparación semanal.

Uretano 13% (para rata): se pesan 13 g y se disuelven en 100 mL de agua bidestilada. Se conserva en nevera a 4°C. Preparación semanal.

### **Compuestos a estudiar:**

Para ser administrados por vía intravenosa, los compuestos se han disuelto en suero fisiológico a la concentración requerida. En algún caso, cuando el compuesto ha presentado una menor solubilidad o la concentración necesaria ha sido elevada, se ha añadido una cantidad adecuada de ácido clorhídrico 0.1 N hasta conseguir una buena disolución.

Para la administración por vía oral, los compuestos se han suspendido en Tween 80® al 1%

## II.1.2. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.

<b>Especie:</b>	RATA ( <i>Rattus norvegicus</i> )
<b>Cepa:</b>	Sprague-Dawley
<b>Proveedor:</b>	HARLAN Ibérica, S.A.
<b>Peso a la llegada:</b>	150-175 g; 220-250 g
<b>Período de aclimatación:</b>	7 días
<b>Condiciones de estabulación:</b>	Se controla la iluminación para proporcionar 12 horas de luz al día. La temperatura se mantiene en $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; la humedad relativa entre un 50 y un 70%. Se realizan controles microbiológicos de ambiente y agua.
<b>Tipo de pienso:</b>	Dieta "Toxicology" (rata-ratón mantenimiento), suministrada por BK Universal G.J., S.L.
<b>Tipo de alojamiento:</b>	Jaulas de macrolón (21.5 x 46.5 x 14.5 cm) con una superficie basal de $1000\text{ cm}^2$ , en grupos de 5 animales.

<b>Especie:</b>	RATÓN ( <i>Mus musculus</i> )
<b>Cepa:</b>	Swiss
<b>Proveedor:</b>	HARLAN Ibérica, S.A.
<b>Peso a la llegada:</b>	18-20 g
<b>Período de aclimatación:</b>	7 días
<b>Condiciones de estabulación:</b>	Se controla la iluminación para proporcionar 12 horas de luz al día. La temperatura se mantiene en $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; la humedad relativa entre un 50 y un 70%. Se realizan controles microbiológicos de ambiente y agua.
<b>Tipo de pienso:</b>	Dieta "Toxicology" (rata-ratón mantenimiento), suministrada por BK Universal G.J., S.L.
<b>Tipo de alojamiento:</b>	Jaulas de macrolón (21.5 x 46.5 x 14.5 cm) con una superficie basal de $1000\text{ cm}^2$ , en grupos de 25 animales.

**Especie:** COBAYO (*Cavia porcellus*)  
**Cepa:** Dunkin-Hartley  
**Proveedor:** HARLAN Ibérica, S.A.  
**Peso a la llegada:** 300-400 g  
**Período de aclimatación:** 7 días  
**Condiciones de estabulación:** Se controla la iluminación para proporcionar 12 horas de luz al día. La temperatura se mantiene en  $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; la humedad relativa entre un 50 y un 70%. Se realizan controles microbiológicos de ambiente y agua.  
**Tipo de pienso:** Dieta cobayo cría-mantenimiento con alto contenido en vitamina C, suministrada por BK Universal G.J., S.L.  
**Tipo de alojamiento:** Jaulas de macrolón (59 x 38.5 x 20) con una superficie basal de  $1800\text{ cm}^2$ , en grupos de 5 animales.

**Especie:** CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*)  
**Cepa:** New Zealand  
**Proveedor:** BK Universal G.J., S.L.  
**Peso a la llegada:** 1.8-2.2 kg  
**Período de aclimatación:** 14 días  
**Condiciones de estabulación:** Se controla la iluminación para proporcionar 12 horas de luz al día. La temperatura se mantiene en  $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; la humedad relativa entre un 50 y un 70%. Se realizan controles microbiológicos de ambiente y agua.  
**Tipo de pienso:** Dieta conejo mantenimiento, suministrada por BK Universal G.J., S.L.  
**Tipo de alojamiento:** Jaulas individuales de acero inoxidable con una superficie basal de  $3390\text{ cm}^2$ .

**Especie:** PERRO (*Canis familiaris*)  
**Raza:** Beagle  
**Proveedor:** Biocentre, S.A.

<b>Peso a la llegada:</b>	7-10 Kg
<b>Período de aclimatación:</b>	4 semanas
<b>Condiciones de estabulación:</b>	Se controla la iluminación para proporcionar 12 horas de luz al día. La temperatura se mantiene entre 18 y 24°C. Se realizan controles microbiológicos de agua.
<b>Tipo de pienso:</b>	Dieta expandida para perro, suministrada por BK Universal G.J., S.L.
<b>Tipo de alojamiento:</b>	Perreras individuales.

### II.1.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los datos experimentales se ha realizado con los programas informáticos GraphPad InStat™ y GraphPad Prism™. Los datos expuestos en esta tesis se han expresado como la media y el error estándar de  $n$  datos. Para comparar las medias de 3 o más grupos, el programa InStat realiza un análisis de la varianza (ANOVA), y si el resultado del mismo es significativo, ofrece la posibilidad de realizar un test *a posteriori*. Habitualmente hemos elegido el test de Bonferroni para este propósito. Sin embargo, el programa InStat recomienda utilizar un test no paramétrico en el caso de que la diferencia entre las desviaciones estándar de los diferentes grupos sea significativa (comprobado mediante el test de homogeneidad de las varianzas de Bartlett). En ese caso hemos utilizado el test de Dunn, que asume que no hay una distribución gaussiana de los datos. Cuando sólo se introducen 2 grupos de datos (asumiendo poblaciones gaussianas con igual desviación estándar) InStat realiza un test  $t$  de Student.

Cuando se comparan dos columnas de datos que representan categorías que se excluyen mutuamente (animales vivos/muertos, presencia/ausencia de determinado síntoma, etc.) se ha utilizado el test exacto de Fisher.

La evolución de las curvas de supervivencia se ha realizado mediante el programa Prism. Este programa compara las curvas utilizando el test *log-rank*. En el caso de que solamente se comparen dos grupos de datos, el test *log-rank* es equivalente al test de Mantel-Haenszel.

## ***II.2. Antagonismo del PAF***

Para el estudio de la actividad antagonista del PAF de los compuestos desarrollados en nuestro laboratorio se han utilizado tanto técnicas *in vitro* como *in vivo*. La prueba *in vitro* más directa y rápida para el *screening* de nuevas sustancias antagonistas es la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por PAF.

Tras esta prueba, los compuestos desarrollados fueron sometidos a pruebas *in vivo*, no relacionadas con procesos de agregación, como la inhibición de la hipotensión inducida por PAF en la rata. Aparte de los estudios de *binding* al receptor del PAF (que no se han llevado a cabo en nuestro caso), la agregación plaquetaria inducida por PAF *in vitro* y la hipotensión en rata son dos de las técnicas más comunes para evaluar la capacidad antagonista del PAF de un compuesto.

Una tercera prueba, la inhibición de la mortalidad inducida por PAF en el ratón, fue realizada con un triple propósito: valorar la actividad tanto por vía oral como por vía intravenosa, calcular la duración del efecto y hallar la posible correlación existente con otras pruebas de mortalidad (por endotoxina o por shock anafiláctico).

El resto de pruebas descritas en este apartado se han utilizado como complemento de las anteriores. La técnica de broncoespasmo inducido por PAF en el cobayo se utilizó principalmente cuando el *screening* de los compuestos iba dirigido básicamente hacia el campo de los procesos asmáticos. Por último, la valoración de los parámetros hematológicos permite compararlos con los resultados de otras pruebas descritas más adelante, como el shock endotóxico o el shock por oclusión de las arterias esplácnicas.

### II.2.1. *INVITRO*.

La agregación plaquetaria puede producirse por varios mecanismos. Las vías de la adenosina difosfato (ADP) y del ácido araquidónico son conocidas desde hace muchos años y utilizadas para probar la actividad de fármacos con posible acción antiagregante. Sin embargo, la agregación inducida por alquilfosfolípidos (principalmente PAF) constituye una tercera vía

diferente (Adams, 1985). El PAF agrega las plaquetas a concentraciones de orden nanomolar o incluso subnanomolar mediante la interacción con receptores específicos. Por ello, la valoración de la agregación plaquetaria es una técnica adecuada para identificar moléculas que antagonizan el PAF.

Puesto que los mecanismos bioquímicos de estas tres vías son diferentes, las moléculas que antagonizan la agregación plaquetaria pueden mostrar una clara selectividad dependiendo del inductor, es decir, ADP, ácido araquidónico (o sustancias que promueven su liberación), o PAF. Dicho de otra forma, moléculas que antagonizan los efectos del PAF no inhiben necesariamente el efecto de los otros inductores, y viceversa. En general, los antagonistas descritos en la literatura son altamente selectivos para esta prueba, siendo inefectivos ante otros agentes proagregantes.

#### II.2.1.1.- Técnicas de agregación plaquetaria.

La agregación plaquetaria es la interacción plaqueta-plaqueta que tiene lugar como paso inicial de la formación de un coágulo. Para que se dé esta interacción, es necesario que las plaquetas conserven su integridad metabólica, dado que este proceso incluye cambios morfológicos y químicos.

Los fenómenos de agregación plaquetaria como respuesta a un agente agregante se vienen estudiando desde hace mucho tiempo. En 1962, Born publicó un método considerado ya clásico, y que se utiliza todavía en la actualidad. Este procedimiento, llamado turbidimétrico o espectrofotométrico, se basa en la observación de las variaciones de la densidad óptica de un plasma rico en plaquetas (PRP), agitado constantemente, en presencia de un agente inductor de la agregación (Born, 1962). Cuando se produce la agregación, la turbidez originada por la presencia de plaquetas en suspensión en el PRP, disminuye por la fuerte interacción entre las mismas. La luz que pasa a través del PRP se incrementa y se desarrolla un voltaje proporcional a la transmitancia de luz que pasa a través del plasma. Este cambio de voltaje se puede registrar, originándose una curva. La curva puede mostrar un descenso inicial de transmisión, seguido de

un rápido aumento. Esta oscilación en la transmisión de la luz es un reflejo del cambio de forma de las plaquetas, de discoide a esférica, que se produce una vez han sido estimuladas (fig. 9).

Hay otros métodos que permiten valorar la agregación en sistemas opacos, como la sangre total. El método de impedancia detecta la agregación haciendo pasar una pequeña corriente eléctrica entre dos electrodos sumergidos en una muestra de sangre y midiendo la resistencia a la conducción eléctrica entre ambos. Al añadir el agente agregante, se provoca una interacción complementaria de plaquetas que se adhieren a los electrodos, aumentando la resistencia eléctrica o impedancia entre los mismos. La modificación de la resistencia se convierte en cambios de voltaje que se registran en el registrador. Este método presenta ciertas ventajas sobre el método óptico: se necesitan volúmenes menores de sangre, no hay riesgo de alteración plaquetaria por centrifugación, no se eliminan otros componentes sanguíneos, etc.

El PAF es un potente activador e inductor de la agregación plaquetaria. De hecho, los primeros antagonistas mostraron su actividad por el bloqueo de dichos procesos. Desde entonces, esta prueba se ha convertido en el test básico de *screening* farmacológico de los antagonistas del PAF (Braquet y Godfroid, 1986).

En nuestros estudios hemos utilizado tres materiales biológicos: plasma rico en plaquetas, sangre total, y plaquetas lavadas. Se ha utilizado sangre humana además de la de dos especies animales: conejo y perro. No se ha utilizado la rata puesto que sus plaquetas no poseen lugares de unión de alta afinidad por el PAF (Sánchez-Crespo y cols., 1981; Iñarrea y cols., 1984).

#### II.2.1.1.1. Preparación de plasma rico en plaquetas (PRP) de conejo y humano.

#### **Soluciones a preparar:**

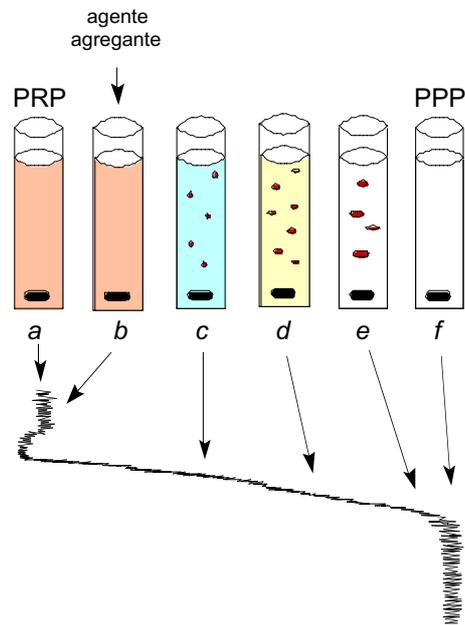


Figura 9.- Formación de los registros de agregación plaquetaria en un agregómetro por el método turbidimétrico. a) muestra de PRP con barrita agitadora; b) adición del agente agregante; c), d) y e) formación de agregados plaquetarios permitiendo el mayor paso de luz, generándose una curva que tiende al margen del plasma pobre en plaquetas (PPP); f) agregación total, llegando al margen del PPP (100% de agregación).

- Pentobarbital sódico 20 mg/mL: ver II.1.1.

- Citrato sódico 3.8%: ver II.1.1.

\* *Plasma rico en plaquetas de conejo*:

### **Animales:**

Se utilizan conejos New Zealand machos, de 2-3 kg de peso, mantenidos en ayunas durante las 18 horas previas al experimento, y con agua *ad libitum*.

### **Método:**

Se anestesia el conejo con pentobarbital sódico (40 mg/kg, 2 mL/kg i.p.). A los 15 min, aproximadamente, se procede a realizar una punción cardíaca con jeringa de 20 mL, la cual contiene 2 mL de citrato sódico. La sangre extraída se mezcla por inversión con suavidad.

Se extrae la aguja y se reparte la sangre en dos tubos de centrifuga de 10 mL. Se tapan los tubos con un trozo de Parafilm®. Se centrifugan los tubos a 4°C y 200 g durante 10 min, a fin de obtener el PRP.

Se separa el PRP con una pipeta Pasteur de plástico y se pone en un tubo de centrifuga, también de plástico. El resto de la sangre se pone a centrifugar de nuevo a 3000 g durante 10 min a 4°C, a fin de obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP).

Durante este tiempo se cuenta el número de plaquetas/mm<sup>3</sup> en un contador automático de plaquetas (Analys Instruments AB 147C). Primero se comprueba que la solución isotónica salina utilizada para el recuento celular (Hemotón®) dé un valor inferior a 3. A continuación se diluye el PRP con la solución isotónica en dos diluciones sucesivas de 30 µL a 10 mL. En estas condiciones, el resultado que aparece digitalizado debe multiplicarse por un factor 2.78. Se realiza la media de, por lo menos, tres recuentos sucesivos.

Una vez obtenido el PPP, se separa del *pellet* de eritrocitos con una pipeta Pasteur de plástico y se vierte en un tubo de centrifuga de plástico.

El PRP debe ajustarse a 350.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. Para ello se diluye con PPP hasta obtener la concentración final indicada. El cálculo para la dilución es el siguiente:

$$\frac{\text{media 3 recuentos} \times 1000 \times 2.78}{350.000} = x$$

$$1 \text{ mL PRP} + (x-1) \text{ mL PPP}$$

Se diluye el PRP con PPP en un tubo de centrifuga de plástico, tomando las cantidades necesarias con pipeta automática con puntas de plástico.

\* *Plasma rico en plaquetas humano:*

### **Pacientes:**

Voluntarios sanos en ayunas desde la noche anterior, y sin haber tomado medicación en la última semana.

### **Método:**

Se extrae la sangre por punción de la vena cubital, recogiéndola con jeringa de 20 mL, la cual contiene 2 mL de citrato sódico. La sangre extraída se mezcla por inversión con suavidad.

Se extrae la aguja y se reparte la sangre en dos tubos de centrifuga de 12 mL. Se realizan los mismos pasos descritos para la sangre de conejo, excepto que no es necesario obtener PPP,

puesto que hemos observado que la dilución del PRP con PPP empeora ostensiblemente la agregación por PAF.

#### II.2.1.1.2. Preparación de plaquetas lavadas de conejo.

##### **Soluciones a preparar:**

- Pentobarbital sódico 20 mg/mL: ver II.1.1.

- Citrato sódico 3.8%: ver II.1.1.

- Ácido cítrico 0.15 mM: se pesan 31.5 mg de ácido cítrico y se disuelven en 1 L de agua bidestilada.

- Cloruro cálcico 53.3 mM: se pesan 296 mg de cloruro cálcico anhidro y se disuelven en 50 mL de agua bidestilada.

- Tyrode con gelatina sin Ca<sup>2+</sup>: la composición es la siguiente:

-

producto	mM	PM	g/L	mL/L
NaCl	137.0	58.44	8.0	40.0 (20%)
KCl	2.7	74.56	0.2	2.0 (10%)
NaHCO <sub>3</sub>	11.9	84.01	1.0	20.0 (5%)
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.0	203.30	0.2	4.0 (5%)
Glucosa	5.51	180.16	1.0	
EGTA	0.23	80.40	0.076	
Gelatina			2.5	

EGTA: ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético.

Se ajusta a pH 6.5 con ácido cítrico 0.15 mM.

- Tyrode con gelatina con Ca<sup>2+</sup>: composición igual que el anterior pero sin EGTA y con 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 53.3 mM. Se ajusta a pH 7.4 con ácido clorhídrico 0.1 N.

### **Animales:**

Se utilizan conejos New Zealand machos, de 2-3 kg de peso, mantenidos en ayunas durante las 18 horas previas al experimento, y con agua *ad libitum*.

### **Método:**

Se siguen los mismos pasos que se han descrito en II.2.1.1.1 para la obtención del PRP. Se distribuye el PRP a razón de 2-2.5 mL por tubo de centrifuga. Se llenan los tubos en sus dos terceras partes con Tyrode con gelatina pH 6.5 y se centrifugan a 20°C a 900 g durante 10 min. Se separa el sobrenadante y se repite el paso anterior dos veces más. Durante este tiempo se cuenta el número de plaquetas/mm<sup>3</sup> con el contador automático, de la manera descrita anteriormente (II.2.1.1.1).

Una vez efectuadas las tres centrifugaciones y extraído el último sobrenadante, se resuspenden los precipitados con 2-2.5 mL de Tyrode con gelatina pH 7.4.

Se juntan todas las suspensiones en un tubo de centrifuga y se realiza un nuevo recuento de plaquetas siguiendo el mismo método que en el recuento anterior.

La suspensión de plaquetas lavadas se ajusta a 300.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. Para ello se diluyen con Tyrode con gelatina pH 7.4 hasta obtener la concentración final indicada. Cálculo para la dilución:

$$\frac{\text{media 3 recuentos} \times 1000 \times 2.78}{300.000} = x$$

1 mL de la suspensión de plaquetas + (x-1) mL de Tyrode pH 7.4

La dilución se hace en un tubo de centrífuga de plástico, tomando las cantidades necesarias con pipeta automática con puntas de plástico.

#### II.2.1.1.3. Obtención de sangre de perro.

#### **Soluciones a preparar:**

- Suero fisiológico heparinizado: 10 mL de la solución madre (*ver II.1.1*) se llevan a 50 mL con suero fisiológico. Esta solución se prepara diariamente.

- Solución anticoagulante: a 2 mL de la heparina preparada anteriormente se le añaden 4.8 mL de suero fisiológico y 3.2 mL de citrato trisódico anhidro al 3.15%. Se guarda a temperatura ambiente en frasco tapado. Preparación semanal. Con esta solución se obtiene la máxima respuesta de las plaquetas en las pruebas con sangre total (Dr. Villaverde, comunicación personal).

#### **Animales:**

Se utilizan perros Beagle machos, mantenidos en ayunas y con agua *ad libitum*.

#### **Método:**

Se extraen 20 mL de sangre por la vena cefálica, con la ayuda de una jeringa que contiene 1 mL de solución anticoagulante por cada 9 mL de sangre. La sangre extraída se mezcla por inversión con suavidad.

#### II.2.1.2. Estudio de la agregación inducida por PAF.

La agregación en plasma rico en plaquetas de conejo ha sido la técnica más estudiada, utilizándose las plaquetas lavadas y la sangre total como técnicas complementarias para el

estudio de aquellos compuestos que presentaron una actividad inicial interesante en la primera prueba. En todos los ensayos se ha utilizado una sustancia patrón, concretamente el CV-6209 (Takeda), cuyo intervalo de actividad, ya conocido, sirve como control interno del propio experimento.

#### II.2.1.2.1. Agregación en plasma rico en plaquetas.

##### **Soluciones a preparar:**

- Solución de PAF C<sub>18</sub> 15 nM para agregación en plasma de conejo: 1 mL de la solución madre de PAF se diluye con 22 mL de la solución de BSA 0.25% (*ver II.1.1*). Esta solución se prepara diariamente. Veinte  $\mu$ L de esta solución se añaden a 480  $\mu$ L de PRP.

- Solución de PAF C<sub>18</sub> 28  $\mu$ M para agregación en plasma humano: 10  $\mu$ L de la solución stock de PAF 0.5 mg/mL (*ver II.1.1*) se llevan a 300  $\mu$ L con PRP.

- Solución patrón: CV-6209 (I): 9.4 mg se disuelven en 100 mL de suero fisiológico. Esta solución se diluye 1:250, 1:500 y 1:1000 con suero fisiológico. Veinte  $\mu$ L de estas soluciones se añaden a 480  $\mu$ L de PRP para dar una concentración final de  $2 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-8}$  y  $5 \times 10^{-9}$  M, respectivamente. Si es necesario, se preparan otras diluciones, a fin de obtener como mínimo tres resultados en el intervalo de inhibición del 15 al 85%.

##### **Método:**

Se incuba a 37°C el PRP diluido con la ayuda de un baño termostatzado. Se pone un tubo siliconado con 0.48 mL de PPP en el lugar que indica "*PPP-poor*" del agregómetro. En el lugar que indica "*PRP-rich*" se coloca un tubo con 0.48 mL de PRP. Mientras tanto, pueden dejarse atemperando hasta 6 tubos en los correspondientes huecos exteriores del agregómetro. Se coloca un cable forrado de polipropileno en cada uno de los tubos de trabajo, agitando a continuación a 800 rpm. Dicha agitación se mantiene a lo largo de todo el experimento.

A los 0.48 mL de PRP se le añaden:

- \* curva control: 20  $\mu$ L de suero fisiológico (o del vehículo en el que se ha disuelto el problema).
- \* curva patrón: 20  $\mu$ L de la disolución de la sustancia patrón inhibidora.
- \* curva problema: 20  $\mu$ L de la disolución de la sustancia problema.

Tras 4 min de incubación de las muestras anteriores, se añaden 20  $\mu$ L de PAF 15 nM (plasma de conejo) o 28  $\mu$ M (plasma humano).

Se para el registro una vez éste haya alcanzado el máximo de deflexión. Se mide el recorrido máximo (deflexión máxima) de la plumilla desde los puntos de máxima y mínima densidad óptica.

Debe realizarse una curva control cada 3-4 curvas problema, a fin de verificar si la respuesta agregante del PRP diluido es correcta.

Se calcula el porcentaje de inhibición para el patrón y el(los) problema(s) a distintas concentraciones:

$$\% \text{ inhibición} = \left( 1 - \frac{\text{DMP}}{\text{DMC}} \right) \times 100$$

siendo:

DMP : deflexión máxima para el problema o patrón.

DMC : media de la deflexión máxima de todas las curvas control efectuadas, o bien, si se observa un sesgo a lo largo del experimento, la media de los dos controles más cercanos.

Deben realizarse curvas patrón y problema a distintas concentraciones a fin de obtener como mínimo 3 puntos con un porcentaje de inhibición respecto al control en el intervalo 15-85%.

### **Cálculo de los resultados:**

Se calcula la  $CI_{50}$ , es decir, la concentración de inhibidor que produce un 50% de deflexión con respecto al control. Para ello debe realizarse una recta de regresión, siendo  $y$  el porcentaje de inhibición y  $x$  el logaritmo de la concentración del inhibidor. A partir de esta recta se interpola el valor de la  $CI_{50}$  en cada caso.

Si la  $CI_{50}$  del patrón difiere más del 20% de la media de valores acumulados para éste, es preferible repetir el experimento.

#### II.2.1.2.2. Agregación en plaquetas lavadas.

### **Soluciones a preparar:**

- Solución de PAF  $C_{18}$  0.5 nM: Un mL de la solución madre de PAF se diluye con 22 mL de la solución de BSA 0.25% (*ver II.1.1*). Un mL de la solución anterior se lleva a 10 mL con la solución de BSA 0.25%. Cinco  $\mu$ L de esta solución se añaden a 400  $\mu$ L de la suspensión de plaquetas lavadas. Esta solución se prepara diariamente.

- Solución patrón: CV-6209 (I): 9.4 mg se disuelven en 100 mL de suero fisiológico. Esta solución se diluye 1:2500, 1:5000, 1:7500 y 1:10000 con suero fisiológico. A 16  $\mu$ L de estas soluciones se añaden 400  $\mu$ L de la suspensión de plaquetas para dar una concentración final de  $2 \times 10^{-9}$ ,  $10^{-9}$ ,  $7.5 \times 10^{-10}$  y  $5 \times 10^{-10}$  M, respectivamente. Si es necesario, se preparan otras diluciones, a fin de obtener como mínimo cuatro resultados en el intervalo de inhibición del 15 al 85%.

### **Método:**

Se pone un tubo siliconado con 0.40 mL de PPP en el lugar que indica "*PRP-rich*" del agregómetro. En el lugar que indica "*PPP-poor*" se coloca un tubo con 0.40 mL de Tyrode con

gelatina pH 7.4. Mientras tanto, pueden dejarse atemperando hasta 6 tubos en los correspondientes huecos exteriores del agregómetro. Se coloca un cable forrado de polipropileno en cada uno de los tubos de trabajo, agitando a continuación a 800 rpm. Dicha agitación se mantiene a lo largo de todo el experimento.

A los 0.40 mL de suspensión de plaquetas lavadas se le añaden:

- \* curva control: 20  $\mu$ L de suero fisiológico (o del vehículo en el que se ha disuelto el problema).
- \* curva patrón: 20  $\mu$ L de la disolución de la sustancia patrón inhibidora.
- \* curva problema: 20  $\mu$ L de la disolución de la sustancia problema.

Tras 2 min de incubación de las muestras anteriores, se añaden 10  $\mu$ L de la solución de  $\text{Ca}^{2+}$  (concentración final 1.3 mM). Se deja incubar durante 2 min más y se añaden 5  $\mu$ L de PAF (concentración final 0.5 nM).

Se para el registro una vez éste haya alcanzado el máximo de deflexión. Se mide el recorrido máximo (deflexión máxima) de la plumilla desde los puntos de máxima y mínima densidad óptica y se procede como se ha descrito en *II.2.1.2.1*.

### **Cálculo de los resultados:**

Se procede como en *II.2.1.2.1*.

#### **II.2.1.2.3. Agregación en sangre total.**

### **Soluciones a preparar:**

- Solución de PAF  $\text{C}_{18}$  0.75 nM: Un mL de la solución madre de PAF se diluye con 22 mL de la solución de BSA 0.25% (*ver II.1.1*). Un mL de la solución anterior se lleva a 10 mL con la

solución de BSA 0.25%. Ocho  $\mu\text{L}$  de esta solución se añaden a 400  $\mu\text{L}$  de la suspensión de plaquetas lavadas. Esta solución se prepara diariamente.

- Solución patrón: CV-6209 (I): ver II.2.1.2.2.

### **Método:**

La sangre extraída se vierte lentamente a tubos de polipropileno, procurando que el extremo de la jeringa (sin aguja) contacte con la pared del tubo y la sangre resbale suavemente por la pared.

A las cubetas de vidrio siliconado se les añade 0.5 mL de suero fisiológico y se dejan calentar un rato a 37°C en los pocillos del agregómetro.

Se añaden 0.5 mL de sangre con pipeta automática en dos o tres cubetas de incubación. El agregómetro permite tener en incubación a 37°C un total de seis muestras antes de su utilización; sin embargo, no es conveniente tener más de dos o tres a la vez ya que al cabo de cierto tiempo la sangre diluida al 50% con suero fisiológico se coagula, probablemente porque la dilución ha reducido la cantidad de anticoagulante a la mitad.

Antes de añadir la cubeta que contiene la sangre diluida con suero fisiológico se coloca el cero eléctrico (botón *BASELINE*) en la posición deseada del registrador mediante los mandos de éste. Se ajusta la ganancia con el mando *GAIN*, de tal modo que 5 Ohms de impedancia (botón *CALIBRATE*) produzcan una deflexión de 4 cm en el papel registrador (20%). En casos de poca respuesta de agregación se puede ampliar la sensibilidad al doble o más.

Se coloca la cubeta con la sangre a 37°C en la cámara del agregómetro y se añade a la cubeta el agitador y los electrodos de impedancia. Se inicia la agitación a 500 rpm, aproximadamente.

Con el mando del *ZERO* del agregómetro se coloca la plumilla del registrador en la misma posición del cero eléctrico anterior y se va corrigiendo esta posición hasta conseguir que se estabilice la línea de base.

A continuación se añade a la cubeta el vehículo en el que se disuelven los fármacos (controles) o bien el fármaco o el patrón, manteniéndolo en incubación con agitación durante 2 min antes de la adición del PAF.

Se para el registro una vez éste haya alcanzado el máximo de deflexión. Se mide el recorrido máximo ( deflexión máxima) de la plumilla desde los puntos de máxima y mínima impedancia.

Debe realizarse una curva control cada 3-4 curvas problema, a fin de verificar si la respuesta agregante de la sangre total diluida es correcta.

Se calcula el porcentaje de inhibición para el patrón y el(los) problema(s) a distintas concentraciones:

$$\% \text{ inhibición} = \left( 1 - \frac{\text{DMP}}{\text{DMC}} \right) \times 100$$

siendo:

DMP : deflexión máxima para el problema o patrón.

DMC : media de la deflexión máxima de todas las curvas control efectuadas, o bien, si se observa un sesgo a lo largo del experimento, la media de los dos controles más cercanos.

Deben realizarse curvas patrón y problema a distintas concentraciones a fin de obtener como mínimo 3 puntos con un porcentaje de inhibición respecto al control en el intervalo 15-85%.

## **Cálculo de los resultados:**

Los resultados se expresan de la forma descrita en *II.2.1.2.1.*

### *II.2.2. INVIVO*

La manera más sencilla de valorar la eficacia de un antagonista del PAF *in vivo* es averiguar su efecto sobre la hipotensión y mortalidad inducidas por PAF.

La administración intravenosa de PAF produce efectos importantes a nivel vascular, como son hipotensión, aumento de la permeabilidad vascular, neutropenia y trombocitopenia (Baranes y cols., 1986). Se ha demostrado que los antagonistas específicos del PAF previenen la aparición de estos fenómenos o son capaces de revertirlos, según se administren antes o después del PAF, indicando una inhibición de tipo competitivo.

Hemos utilizado la rata para valorar los cambios en la presión arterial y para realizar extracciones sanguíneas, mientras que el ratón es la especie elegida para valorar la mortalidad inducida por la administración de PAF.

Por otra parte, la administración intravenosa de PAF en el cobayo produce un aumento de la resistencia bronquial al paso del aire, debido al efecto broncoconstrictor de aquel (Desquand y cols., 1986). Dicho efecto es potenciado por el bloqueo de receptores  $\beta$  (p.ej. propranolol). En un animal con respiración artificial, con un volumen y frecuencia fijos, es posible determinar el efecto bronquial del PAF por medio de la implantación en la tráquea de una cánula en forma de T, que derive el aire que no puede penetrar en los pulmones a un transductor. El aire desviado actúa sobre una columna de agua que, al desplazarse, ejerce presión sobre una membrana que transforma esa presión en una señal eléctrica. El modelo experimental de Konzett y Rössler es la técnica más utilizada y más eficaz para detectar el antagonismo de la acción broncoconstrictora del PAF de un compuesto (Konzett y Rössler, 1940).

II.2.2.1. Determinación de la presión arterial en la rata anestesiada. Valoración de la hipotensión inducida por PAF.

**Soluciones a preparar:**

- Pentobarbital sódico 5 mg/mL: ver II.1.1.

- Suero fisiológico heparinizado: 10 mL de la solución madre (ver II.1.1) se llevan a 50 mL con suero fisiológico. Esta solución se prepara diariamente.

- Solución de PAF-C<sub>18</sub> 0.5 µg/mL: 1 mL de la solución madre de PAF se lleva a 10 mL con la solución de BSA 0.25% (ver II.1.1). Esta solución se prepara diariamente.

**Animales:**

Se utilizan ratas Sprague-Dawley, machos, con un peso de 180-200 g, mantenidas en ayunas durante las 18 horas previas al experimento y con agua *ad libitum*.

**Método:**

Se anestesia el animal con pentobarbital sódico (50 mg/kg, 10 mL/kg) por vía intraperitoneal. Se coloca el animal en decúbito supino sobre una placa calefactora y se procede a disecar y perforar la tráquea, colocando en su interior una cánula de polietileno adecuada para facilitar la ventilación del animal.

Separando los músculos del cuello, se disecciona la arteria carótida izquierda y se realiza una ligadura en su extremo más craneal, mientras que el extremo más caudal se mantiene momentáneamente cerrado con ayuda de una pinza hemostática de Dieffenbach. Con una aguja fina se punciona la pared del vaso por la parte más cercana a la ligadura, de manera que la aguja penetre ligeramente en la luz vascular. A través de este orificio se introduce con suavidad un catéter de polietileno de 0.8 mm de diámetro interno, que va conectado a un transductor de presión que a su vez va acoplado a un registrador. Una vez introducido el catéter, se realizan dos

ligaduras para sujetar éste a la arteria y, por último, se retira la pinza hemostática. El catéter va unido a un transductor de presión mediante una llave en "T". La llave se abre con cuidado para introducir un pequeño volumen de suero fisiológico heparinizado en el interior de la carótida (en el caso de obstrucciones de la luz vascular por coagulación), volviéndose a cerrar inmediatamente una vez realizada dicha operación para evitar el reflujo de sangre hacia el interior de la cámara del transductor.

Se disecan también los paquetes vasculares femorales, en la cara medial de ambas extremidades posteriores. La vena femoral izquierda se canula con una palomilla de infusión para administrar el PAF y la femoral derecha se canula con una aguja y una jeringa de 1 mL conteniendo el producto a estudiar.

Se administra el producto a estudiar (1 mL/kg). Al cabo de 3 min se administra el PAF (0.5 µg/kg, 1 mL/kg). Es importante que la velocidad de administración sea lo más constante posible a lo largo de los distintos experimentos. En el caso de que un producto, además de su posible acción antagonista, presente un acusado efecto agonista y en 3 min no se haya recuperado la presión basal, la administración del PAF se realiza a los 5 min.

Se registra la presión durante 10 min ( velocidad del registro = 0.25 mm/s).

### **Expresión de los resultados:**

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la hipotensión inducida por el PAF. Para calcular este porcentaje se siguen los siguientes pasos:

Se mide la presión basal arterial máxima (sistólica) y mínima (diastólica). Se calcula la presión arterial media (PAM) según la fórmula:

$$PAM = \frac{P \text{ sistólica} + 2 \times P \text{ diastólica}}{3}$$

Se mide la PAM en el punto de máxima deflexión tras la administración del PAF. Dicha operación se realiza tanto para los controles como para los animales pretratados con el antagonista.

Se halla el % de descenso de la PAM para animales control (C) y tratados (T) respecto a sus propios valores de PAM basal.

Se calcula del porcentaje de inhibición mediante la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left( 1 - \frac{T}{C} \right) \times 100$$

Se calcula la  $DI_{50}$ , es decir, la dosis del antagonista que inhibe en un 50% la respuesta hipotensora provocada por la administración de PAF. Para ello debe realizarse una recta de regresión, siendo  $y$  el porcentaje de inhibición y  $x$  el logaritmo de la concentración del inhibidor. A partir de esta recta se interpola el valor de la  $DI_{50}$  en cada caso.

II.2.2.2. Valoración de la mortalidad inducida por PAF en el ratón.

#### **Soluciones a preparar:**

- Solución de PAF  $C_{18}$  100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + propanolol 1  $\text{mg}/\text{kg}$ : se pesan 2.5 mg de propanolol en un vaso de precipitados. Se añaden 0.25 mL de etanol absoluto hasta disolverlos. Seguidamente se añaden 10 mL de solución de BSA 0.25% (*ver II.1.1*) y se deja agitando con un imán unos 10 min. Paralelamente, se toman con una jeringuilla de insulina 0.5 mL de la solución stock de PAF 0.5  $\text{mg}/\text{mL}$  (*ver II.1.1*) y se depositan en un matraz aforado de 25 mL. Se transfiere la solución de propanolol al matraz aforado, lavando varias veces con BSA 0.25%. Se enrasa a 25 mL con BSA 0.25%. El matraz se somete unos minutos a la acción de los ultrasonidos para asegurar una correcta disolución de todos los componentes.

**Animales:**

Se utilizan ratones Swiss macho de un peso entre 20 y 25 g en ayunas de 24 horas y con agua *ad libitum*. Se ha comprobado que animales con un peso inferior son más resistentes a la acción del PAF y no pueden utilizarse en este tipo de experimento.

**Método:**

Se administra el producto a estudiar, según el protocolo siguiente:

\* *por vía intravenosa*: se administra (10 mL/kg) disuelto en suero fisiológico por una de las venas caudales, 5 min antes de la administración intravenosa del PAF.

\* *por vía oral*: se administra (20 mL/kg) en suspensión/solución de Tween 80 1%, 60 min antes de la administración intravenosa del PAF.

Todos los experimentos se realizan con la presencia de un grupo control, al que se administrará únicamente el vehículo.

Se administra la solución del PAF (100 µg/kg) más propanolol (1 mg/kg) por una de las venas caudales (10 mL/kg) a velocidad constante (tiempo de administración aproximado: 5 s).

Para facilitar la administración intravenosa del producto (si se utiliza esta vía) y la del PAF, la cola de los animales se sumerge en un vaso de precipitados con agua caliente, lo cual produce una vasodilatación que facilita la visualización de las venas y la posterior inyección.

Una vez finalizada la inyección del PAF se dejan los animales en observación durante 60 min. Pasado este tiempo, se cuenta el número de animales muertos y se sacrifican los supervivientes.

**Cálculo de los resultados:**

Se contabiliza el porcentaje de mortalidad del grupo control y de los distintos grupos de tratamiento.

Se calcula el porcentaje de inhibición causado por el tratamiento según la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left( 1 - \frac{\% \text{ mortalidad problema}}{\% \text{ mortalidad control}} \right) \times 100$$

II.2.2.3. Técnica de broncoespasmo en el cobayo (técnica de Konzett y Rössler).

**Soluciones a preparar:**

- Uretano 15%: *ver II.1.1.*

- Gallamina 5 mg/mL: se pesan 50 mg y se disuelven en 10 mL de suero fisiológico.

- Propranolol 0.3 mg/mL: se pesan 6 mg y se disuelven en 20 mL de suero fisiológico.

- Acetilcolina (Cl) 0.02 mg/mL: se pesan 5 mg y se disuelven en 250 mL de suero fisiológico.

- Suero fisiológico heparinizado: 5 mL de heparina comercial (5000 UI/mL) se llevan a 50 mL con suero fisiológico.

- Solución de PAF-C<sub>18</sub> 50 ng/mL: 1 mL de la solución madre de PAF (*ver II.1.1*) se lleva a 100 mL con suero fisiológico. Esta solución se prepara diariamente.

**Animales:**

Se utilizan cobayos Dunkin-Hartley machos, de 350-500 g de peso, mantenidos en ayunas y con agua *ad libitum*.

### **Método:**

Se anestesia el animal con uretano (10 mL/kg, 1.5 g/kg) por vía intraperitoneal.

Se coloca el animal sobre la mesa de operaciones y se realiza una traqueotomía. Se canula la vena yugular derecha con un catéter en dirección al corazón y conectado a una jeringa con suero fisiológico heparinizado. Seguidamente se canula la tráquea con una cánula de vidrio en forma de T, que está conectada a una bomba de respiración.

Mediante una salida lateral de la cánula en T se conecta el animal con un transductor para broncoespasmo (Ugo Basile), que a su vez está conectado a un amplificador y a un registrador.

Una vez el animal respira ayudado por la bomba de respiración (frecuencia: 70 emboladas/min, volumen: 1 cc/100 g peso), se inyecta gallamina 5 mg/kg, i.v., 1 mL/kg, para producir un paro respiratorio y evitar interferencias entre la frecuencia respiratoria propia del animal y la de la bomba que puedan alterar el registro.

A los 5 min se administra el propanolol (3 mg/kg, 10 mL/kg i.p.). A los 10 min de la administración del propanolol se inyecta acetilcolina por la yugular (20 µg/mL, 1 mL/kg) a fin de verificar la respuesta del animal. Se admite como correcta una respuesta broncoconstrictora superior al 50% de la respuesta máxima.

A los 30 min de la administración de la acetilcolina se administra el PAF a la dosis inicial de 50 ng/kg, i.v., 1 mL/kg. Si la respuesta es insuficiente (menor del 50% de la respuesta máxima) se administra al cabo de 5 min una dosis de 75 ng/kg, o bien, en su caso, de 100 ng/kg.

Al cabo de 30 min de la administración de la última dosis de PAF se administra el producto a estudiar por vía intravenosa (1 mL/kg).

A los 5 min se repite la administración de PAF a la misma dosis utilizada anteriormente, y se vuelve a administrar a los 30 min de la inyección del compuesto problema.

### **Cálculo de los resultados:**

El efecto broncoconstrictor del PAF se calcula midiendo el incremento de la señal (en mm) producido en el registro. De esta forma se calcula la respuesta al PAF antes y después de la administración del compuesto a probar. Posteriormente se calculan los porcentajes de inhibición del broncoespasmo a los diferentes tiempos, tras la administración del compuesto, con respecto a la respuesta basal.

$$\% \text{ inhibición} = \left( 1 - \frac{\text{altura problema}}{\text{altura control}} \right) \times 100$$

#### II.2.2.4. Valoración de parámetros hematológicos en la rata.

### **Soluciones a preparar:**

- Pentobarbital sódico 5 mg/mL: *ver II.1.1.*
- Suero fisiológico heparinizado: 10 mL de la solución madre (*ver II.1.1*) se llevan a 50 mL con suero fisiológico. Esta solución se prepara diariamente.
- Solución de PAF-C<sub>18</sub> 5 µg/mL: se utiliza directamente la solución madre de PAF (*ver II.1.1*).
- EDTA 5%: *ver II.1.1.*

**Animales:**

Se utilizan ratas Sprague-Dawley machos, con un peso de 180-200 g, mantenidas en ayunas durante las 18 horas previas al experimento y con agua *ad libitum*.

**Método:**

Se anestesia el animal con pentobarbital sódico (10 mL/kg, 50 mg/kg i.p.). Se coloca el animal en decúbito supino sobre una placa calefactora y se procede a disecar la tráquea, colocando en su interior una cánula de polietileno adecuada para facilitar la ventilación del animal.

Se disecan los paquetes vasculares femorales, en la cara medial de ambas extremidades posteriores. La vena femoral izquierda se canula con una palomilla de infusión para administrar el PAF y la femoral derecha se canula con una aguja y una jeringa de insulina conteniendo el producto a estudiar. Se disecan también las dos venas yugulares externas con el fin de realizar las extracciones de sangre alternativamente en ambos vasos (0.5 mL cada vez). La sangre se recoge con jeringas de 1 mL (con las cuales previamente se habrá aspirado y expulsado un volumen de EDTA 5% suficiente como para que las paredes del émbolo y la aguja queden impregnadas). Se extrae la aguja y la sangre se vierte y se agita cuidadosamente en tubos Eppendorff (que contienen a su vez 10 µL de EDTA 5%) para su posterior análisis con un contador automático. Este proceso debe hacerse con cuidado, apoyando el extremo de la jeringa en las paredes interiores del tubo y dejando que la sangre resbale por ellas lentamente.

Se administra el producto a estudiar (1 mL/kg). Al cabo de 10 min se administra el PAF (1 mL/kg, 5 µg/kg). Los tiempos de recogida de sangre a través de las venas yugulares son: inmediatamente antes de la administración del producto o vehículo (basal), y 5 y 45 min tras la administración del PAF.