

III.4. Shock endotóxico

III.4.1. HIPOTENSIÓN INDUCIDA POR ENDOTOXINA EN LA RATA ANESTESIADA.

En la figura 41 se comparan los perfiles de presión arterial media en rata anestesiada tras la administración de los dos serotipos de endotoxina que se han estudiado (LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 y 0127:B8).

Al administrar un bolus de LPS 0111:B4 (20 mg/kg, 1 mL/kg i.v.) se produce una hipotensión inmediata, con valores que llegan a estar por debajo del 50% del valor inicial. También de forma muy rápida, se produce una recuperación de la presión arterial media, hasta alcanzar un máximo de casi un 80% a los 10 min de la administración del LPS. A partir de aquí, la presión arterial inicia una lenta y progresiva caída, que puede llevar a los animales a la muerte en pocas horas. A las 2 horas, la presión arterial media es de aproximadamente el 70% de los niveles iniciales.

El perfil hipotensor del serotipo 0127:B8 (15 mg/kg, 1 mL/kg i.v.) es algo diferente. La primera fase de hipotensión no es tan drástica y aguda como con el otro serotipo. Los niveles mínimos de presión (algo por encima del 50% de los valores iniciales) no se alcanzan hasta los 10 min de la administración de LPS. La posterior recuperación de la presión arterial media no llega a un máximo hasta los 45 min, siendo los valores de un 65% sobre el valor inicial. También en este caso hay una segunda fase de hipotensión, no llegándose a superar el 60% al final del experimento.

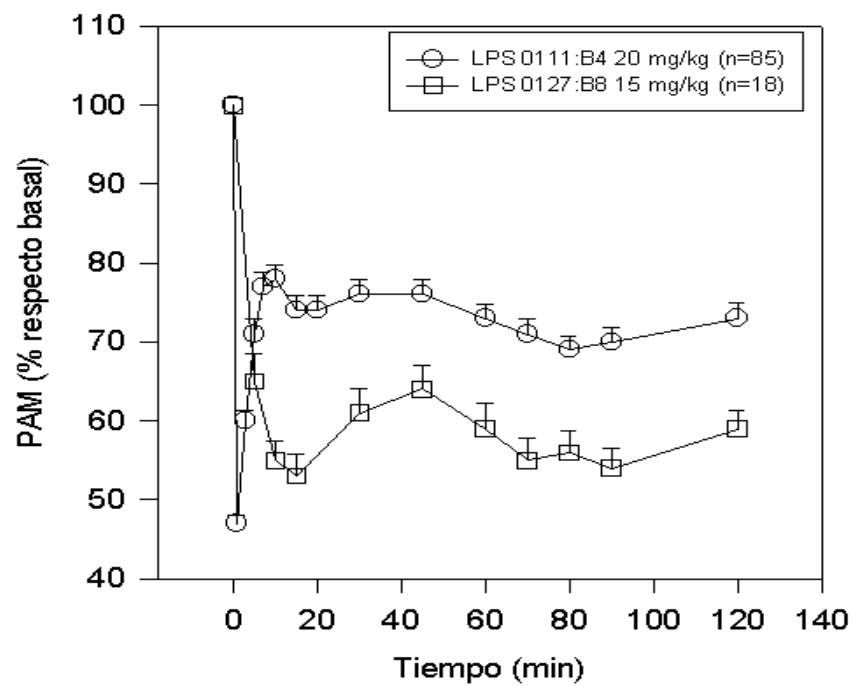


Figura 41.- Variación de la presión arterial media (PAM) tras la administración (tiempo 0) de LPS de *E. coli* (tiempo 0) de los serotipos 0111:B4 (20 mg/kg i.v.) y 0127:B8 (15 mg/kg i.v.).

III.4.1.1. Protocolo reversor.

La administración de UR-12460 1 mg/kg i.v. a los 60 min de haber administrado el LPS 0111:B4 (20 mg/kg i.v.) produce un aumento inmediato de la presión arterial media (un 11% de aumento en 1 min). Este aumento se mantiene hasta el final del experimento (fig. 42). El WEB-2086 a la misma dosis tiene un efecto muy similar, así como los antagonistas UR-11353 y CV-6209 (fig. 43).

No se han probado ni el UR-12460 ni el WEB-2086 como reversores de la hipotensión inducida por LPS 0127:B8 (15 mg/kg i.v.), pero sí los compuestos UR-11353 y CV-6209. A la dosis de 5 mg/kg ambos provocan un ligero aumento, aunque no significativo, de la PAM (fig. 44).

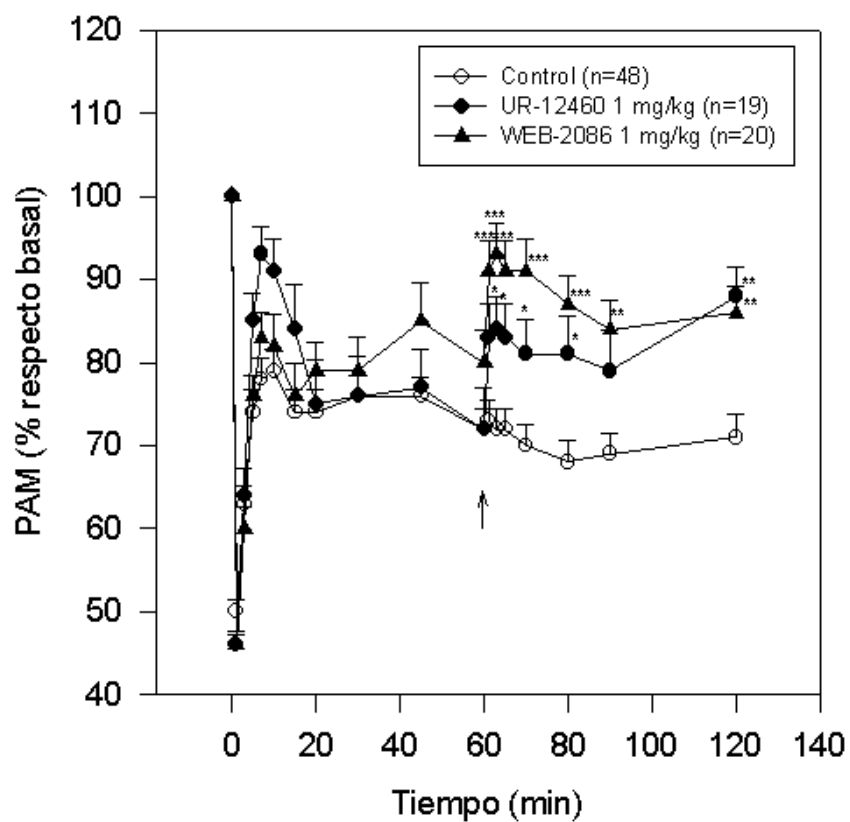


Figura 42.- Variación de la presión arterial media (PAM) tras la administración (tiempo 0) de LPS de *E. coli* 0111:B4 20 mg/kg i.v. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. 60 min después del LPS (↑). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control (test de Bonferroni).

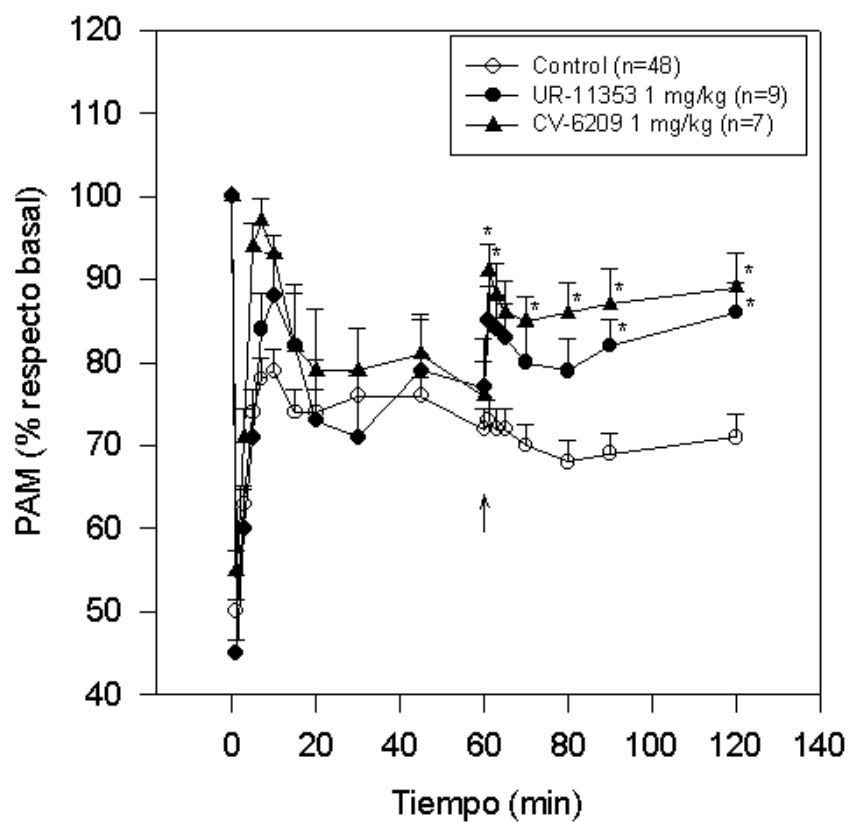


Figura 43.- Variación de la presión arterial media (PAM) tras la administración (tiempo 0) de LPS de *E. coli* 0111:B4 20 mg/kg i.v. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. 60 min después del LPS (↑). * $p < 0.05$ vs. control (test de Bonferroni).

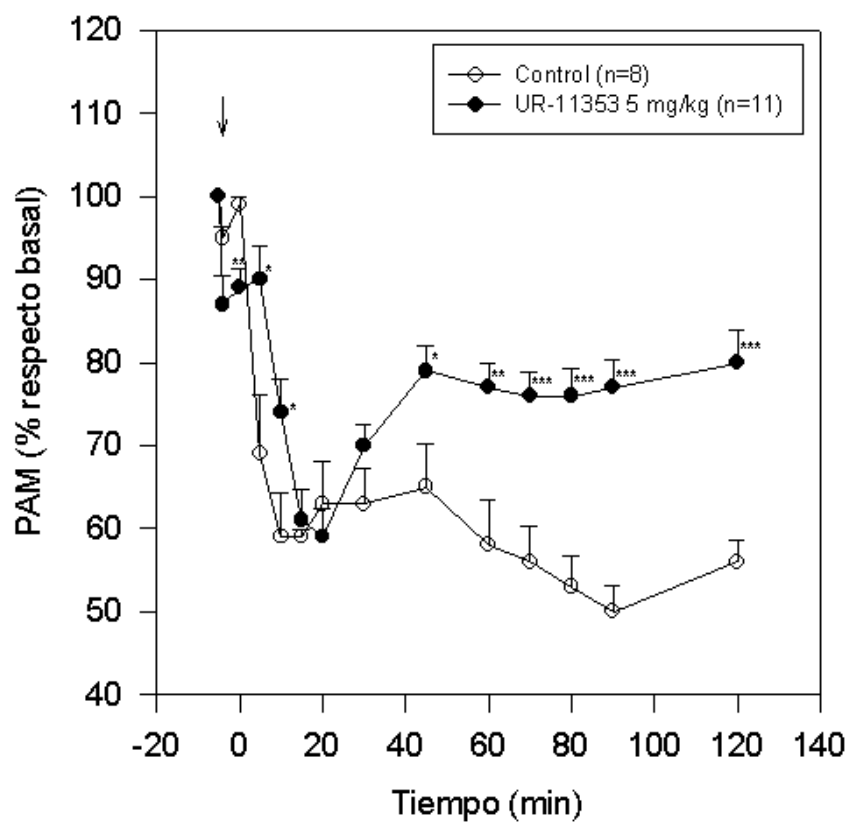


Figura 44.- Variación de la presión arterial media (PAM) tras la administración (tiempo 0) de LPS de *E. coli* 0127:B8 15 mg/kg i.v. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. 60 min después del LPS (↓).

III.4.1.2. Protocolo preventivo.

La administración de UR-12460 1 mg/kg i.v. 10 min antes del LPS 0111:B4 (20 mg/kg i.v.) no inhibe la primera fase de hipotensión. Sin embargo, la presión arterial media se recupera de forma rápida y llega a estar al 90% con respecto al valor inicial (fig. 45). Al administrar una dosis menor (0.5 mg/kg i.v.) el perfil es prácticamente idéntico (datos no mostrados). El WEB-2086 a 1 mg/kg i.v., sin embargo, no es capaz de producir esta recuperación de la presión arterial media y sigue una evolución prácticamente idéntica al grupo control.

Administrado 5 min antes del LPS 0127:B8 (15 mg/kg i.v.), el compuesto UR-11353 produce un pequeño retraso en la primera fase de hipotensión, recuperándose luego de forma notable y alcanzando niveles del 80% al final del experimento (fig. 46). El UR-12460 y el WEB-2086 no se han probado ante este serotipo de endotoxina.

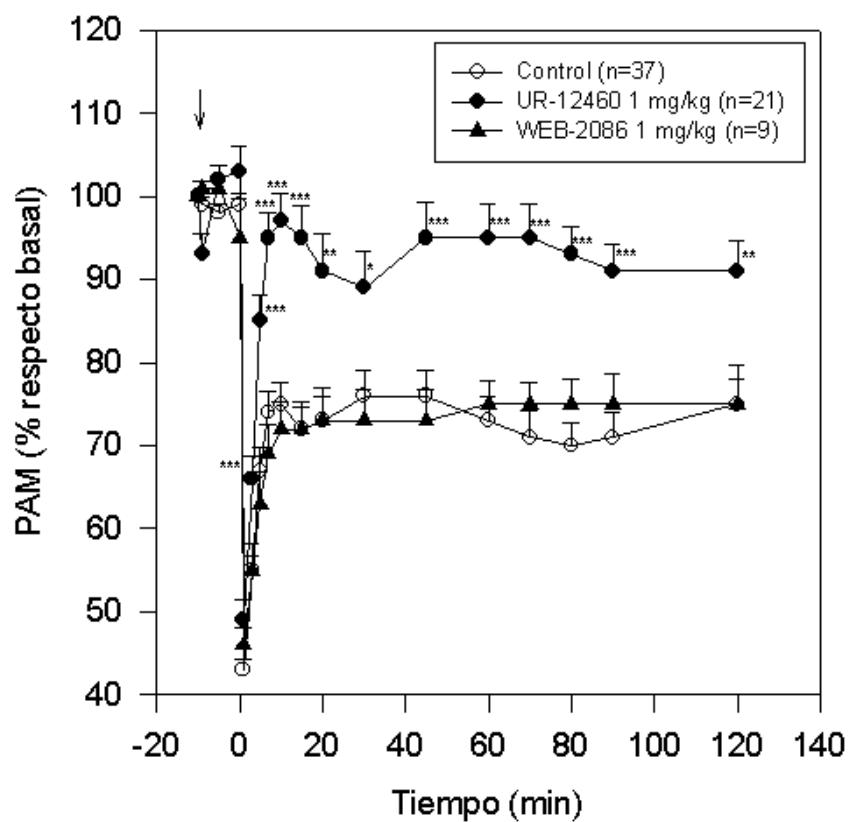


Figura 45.- Variación de la presión arterial media (PAM) tras la administración (tiempo 0) de LPS de *E.coli* 0111:B4 20 mg/kg i.v. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. 10 min antes del LPS (↓). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ vs. control (test de Bonferroni).

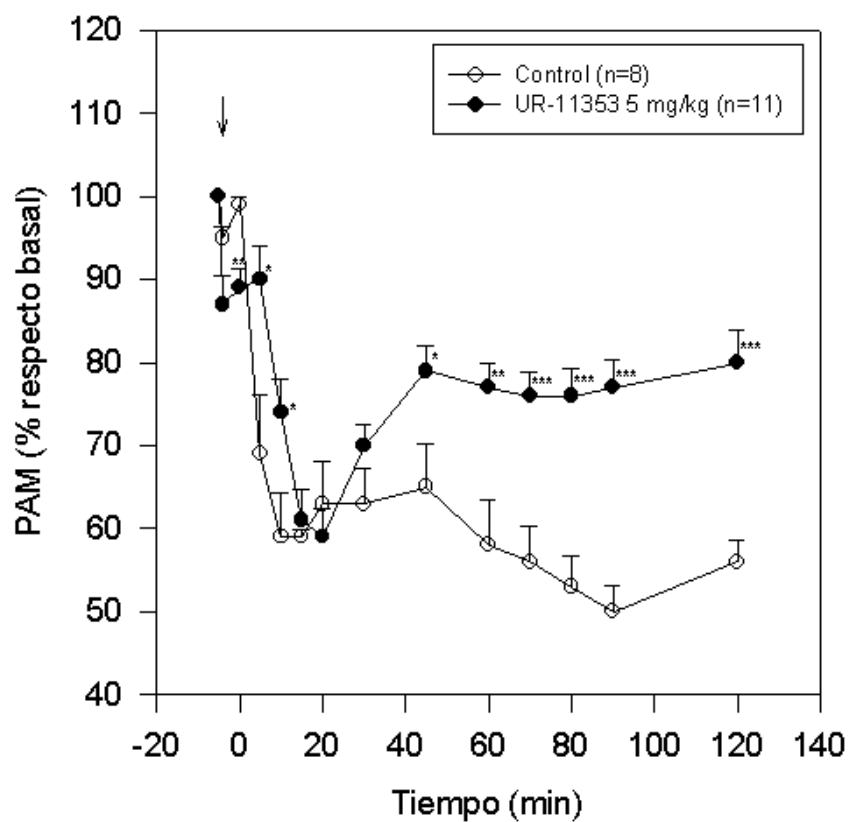


Figura 46.- Variación de la presión arterial media (PAM) tras la administración (tiempo 0) de LPS de *E. coli* 0127:B8 15 mg/kg i.v. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. 5 min antes del LPS (↓). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control (test *t* de Student).

III.4.2. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN LA RATA ANESTESIADA.

Al administrar un bolus de LPS de *E. coli* 0111:B4 (20 mg/kg, 1 mL/kg i.v.) se producen algunas alteraciones a nivel hematológico. A los 5 min tras la inyección de LPS se detecta una leucopenia moderada, que supone una disminución de un 20% aproximadamente con respecto al valor basal. A los 45 min, los niveles de leucocitos se han normalizado. La administración de los compuestos UR-12460 y WEB-2086 a la dosis de 1 mg/kg i.v., 10 min antes del LPS, no es capaz de inhibir la leucopenia inducida por LPS (fig. 47).

El valor hematócrito aumenta hasta llegar a ser, a los 45 min, un 15% superior a los valores iniciales. La administración de los antagonistas a 1 mg/kg i.v. inhibe el aumento del valor hematócrito y, en el caso del UR-12460, lo hace de forma estadísticamente significativa (fig. 48).

Se produce también una trombocitopenia importante a los 5 min, que todavía no se ha recuperado a los 45 min (40 y 20% por debajo del valor basal, respectivamente). Los dos antagonistas administrados no son capaces de inhibir el descenso del recuento de plaquetas ni a los 5 ni a los 45 min (fig. 49).

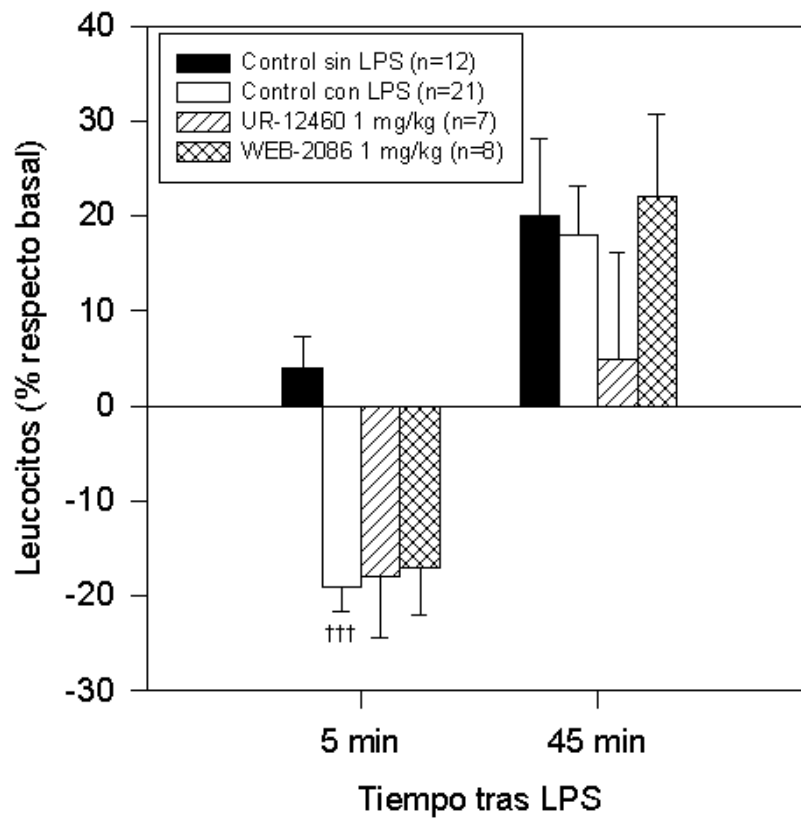


Figura 47.- Variación del número de leucocitos en sangre respecto al valor basal (considerado como 0) tras la administración de LPS de *E. coli* 0111:B4 20 mg/kg i.v. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. 10 min antes del LPS. ††† $p < 0.001$ vs. control sin LPS (test de Bonferroni).

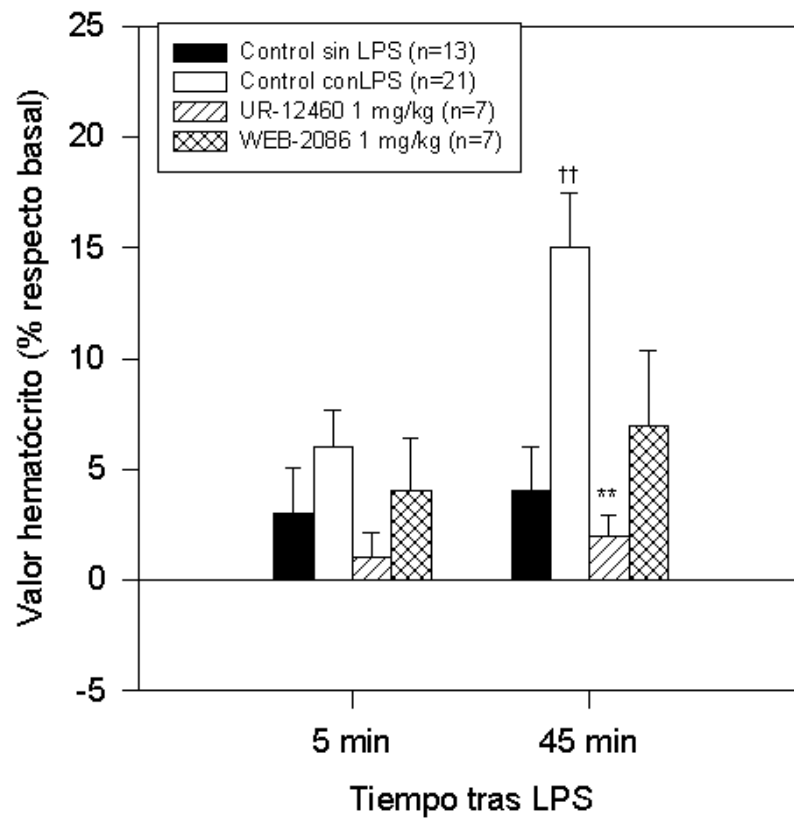


Figura 48.- Variación del valor hematócrito respecto al valor basal (considerado como 0) tras la administración de LPS de *E. coli* 0111:B4 20 mg/kg i.v. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. 10 min antes del LPS. †† $p < 0.01$ vs. control sin LPS; ** $p < 0.01$ vs. control con LPS (test de Bonferroni).

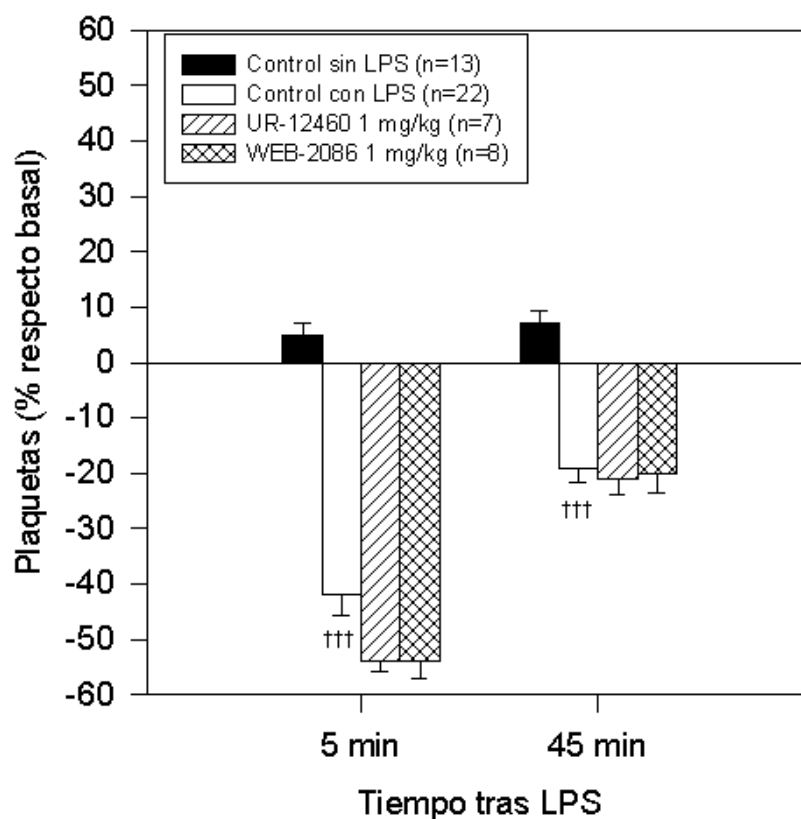


Figura 49.- Variación del número de plaquetas en sangre respecto al valor basal (considerado como 0) tras la administración de LPS de *E. coli* 0111:B4 20 mg/kg i.v. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. 10 min antes del LPS. ††† $p < 0.001$ vs. control sin LPS (test de Bonferroni).

III.4.3. MORTALIDAD INDUCIDA POR ENDOTOXINA EN LA RATA Y EN EL RATÓN CONSCIENTES.

La administración de endotoxina (LPS de *E. coli* 0127:B8, 5 mg/kg i.v.) en la rata consciente produce una mortalidad que oscila entre el 86 y el 89% (para los estudios i.v. y p.o., respectivamente). En el ratón, la mortalidad inducida por la endotoxina (LPS de *E. coli* 0111:B4, 20 mg/kg i.v.) está entre el 88 y el 96% (p.o. e i.v., respectivamente). El compuesto UR-12460 inhibe la mortalidad inducida por endotoxina en la rata y en el ratón conscientes, tanto por vía oral como i.v. (tabla 18).

	RATA		RATÓN	
	DI ₅₀ mg/kg i.v.	DI ₅₀ mg/kg p.o.	DI ₅₀ mg/kg i.v.	DI ₅₀ mg/kg p.o.
UR-12460	0.28 (0.23-0.34)	1.4 (0.9-2.2)	1.4 (1.1-2.0)	9.07 (8.16-10.07)
WEB-2086	0.47 (0.28-0.78)	1.4 (0.9-2.2)	1.7 (1.2-2.5)	13.2 (8.0-21.8)
WEB-2170	NP	NP	0.66 (0.54-0.80)	NP
YM-461	0.16 (0.13-0.19)	2.8 (0.99-8.17)	3.6 (2.8-4.8)	22.3 (17.9-27.6)
TCV-309	NP	NP	0.15 (0.10-0.24)	16.0 (11.0-23.2)
CV-6209	0.08 (0.06-0.10)	NP	0.36 (0.27-0.46)	NP
L-659,989	NP	NP	11.9 (5.3-26.8)	NP
BB-882	0.045 (0.026-0.080)	NP	0.11 (0.07-0.16)	NP
SCH-37370	NP	NP	36.7 (7.6-177.8)	NP

Tabla 18.- Valores de DI₅₀ en la prueba de mortalidad inducida por endotoxina en la rata (LPS de *E. coli* 0127:B8, 5 mg/kg i.v.) y el ratón (LPS de *E. coli* 0111:B4, 20 mg/kg i.v.) conscientes. Los compuestos se administran 5 min (i.v.) o 30 min (p.o.) antes de la administración de LPS. Los valores se calculan por regresión lineal a partir de una curva experimental con no menos de 4 puntos. Entre paréntesis se indican los límites fiduciales para el 95%. (NP: no probado).

Existe una buena correlación entre la prueba de mortalidad por endotoxina y la mortalidad por PAF en el ratón (ver III.1.2.2) cuando los productos se administran por vía i.v. (fig. 50).

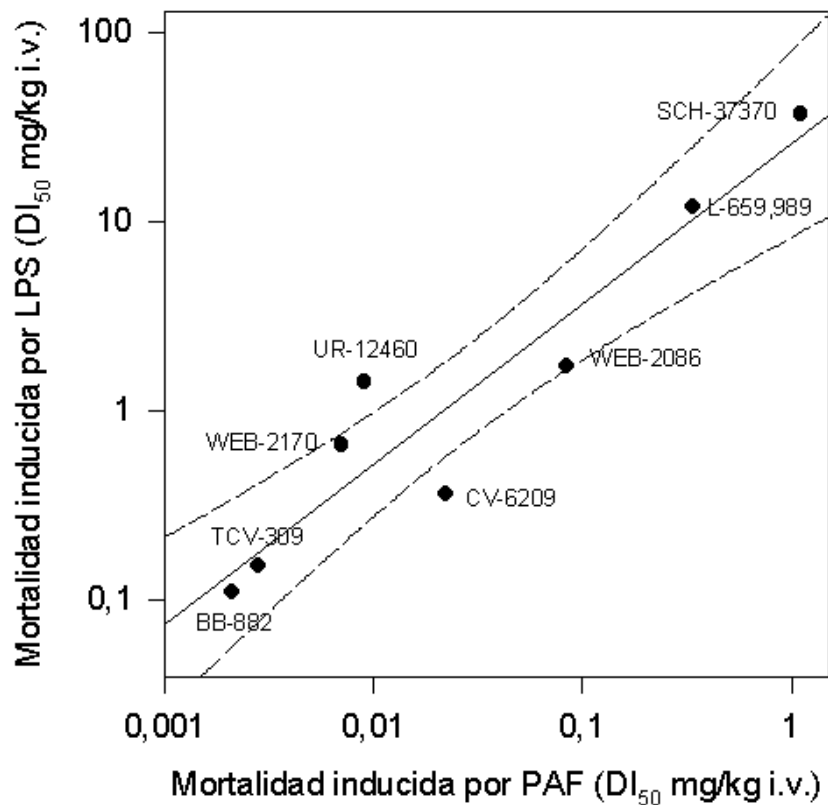


Figura 50.- Correlación entre la actividad de los antagonistas del PAF en la prueba de mortalidad por shock endotóxico y la prueba de mortalidad inducida por PAF en ratón ($p < 0.001$, $r^2 = 0.893$). La mortalidad se provoca por la administración de endotoxina (LPS de *E. coli* 0111:B4, 20 mg/kg i.v.), o por la administración de PAF (100 μ g/kg i.v.), 5 min después de la administración de los antagonistas del PAF por vía i.v. Las líneas discontinuas indican los intervalos de confianza al 95% de la recta de regresión.

III.4.4. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS EN LA PERMEABILIDAD VASCULAR EN LA RATA.

La administración i.v. de endotoxina (LPS de *E. coli* 0127:B8) en ratas produce una acumulación significativa del colorante azul de Evans, incluso a la dosis más baja (10 mg/kg i.v.), en tráquea, timo, estómago y vesícula seminal. Este efecto es dosis-dependiente en todos los tejidos excepto la vesícula seminal, que presenta un efecto maximal a 25 mg/kg i.v. No se aprecian cambios significativos en la extravasación de azul de Evans en parénquima pulmonar, corazón, duodeno y yeyuno (tabla 19).

La administración de UR-12460 a 10 mg/kg i.v. disminuye significativamente la extravasación tisular en la tráquea y en la vesícula seminal, pero no así en el timo. No se ha valorado el efecto de los antagonistas del PAF a nivel de extravasación en el estómago por dificultades metodológicas. Por el contrario, el WEB-2086 a 10 mg/kg i.v. no inhibe la extravasación en ninguno de los órganos estudiados, e incluso la incrementa significativamente en tráquea y timo (tabla 20).

dosis LPS (mg/kg)	azul de Evans ($\mu\text{g/g}$ de tejido seco)								
	tráquea	parénq. pulm.onar	tímo	corazón	estómago	duodeno	yeyuno	vesícula seminal	
vehículo ($n=26$)	29.6 \pm 3.6	2.6 \pm 0.2	5.6 \pm 0.5	1.6 \pm 0.3	4.1 \pm 0.4	1.6 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	3.9 \pm 0.4	
10 ($n=10$)	63.7 \pm 4.8 ^{***}	4.3 \pm 1.1	14.7 \pm 2.2 ^{**}	1.2 \pm 0.3	9.2 \pm 1.3 ^{**}	2.9 \pm 0.5	1.7 \pm 0.4	14.3 \pm 5.2 [*]	
25 ($n=20$)	68.1 \pm 4.5 ^{***}	2.7 \pm 0.5	14.2 \pm 1.6 ^{***}	1.3 \pm 0.2	11.2 \pm 0.7 ^{***}	2.8 \pm 0.5	2.5 \pm 0.4	621.4 \pm 2.2 ^{***}	
40 ($n=10$)	73.1 \pm 10.5 ^{***}	2.8 \pm 0.3	14.5 \pm 4.4 ^{***}	0.5 \pm 0.05	11.3 \pm 2.8 ^{***}	2.2 \pm 0.2	1.9 \pm 0.4	9.8 \pm 3.2 [*]	

Tabla 19.- Acumulación de colorante azul de Evans en los tejidos seleccionados 1 h tras la administración de varias dosis de endotoxina (LPS de *E. coli* 0127:B8 i.v. junto con azul de Evans 10 mg/kg i.v.). Los datos representan la media \pm error estándar de n animales. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$ vs. vehículo (test de Bonferroni).

	tráquea	timo	vesícula seminal
vehículo	10.1±1.1 (n=32)	2.7±0.2 (n=34)	3.2±0.4 (n=33)
LPS	34.5±2.5 ^{†††} (n=42)	8.1±0.6 ^{†††} (n=43)	15.8±1.1 ^{†††} (n=41)
LPS + UR- 12460	14.1±1.8 ^{**} (n=6)	7.9±1.4 (n=14)	6.0±1.3 ^{***} (n=9)
LPS + WEB-2086	52.0±6.2 ^{**} (n=6)	12.4±0.7 [*] (n=6)	18.8±4.0 (n=6)

Tabla 20.- Efecto de los antagonistas del PAF en la acumulación de colorante azul de Evans (expresado en $\mu\text{g/g}$ de tejido seco) en varios órganos de rata 1 h tras la administración de endotoxina (LPS de *E. coli* 0127:B8, 25 mg/kg i.v. junto con azul de Evans 10 mg/kg i.v.). Los compuestos se administran 5 min antes de la administración del LPS. Los datos representan la media \pm error estándar de *n* animales. ^{†††} $p < 0.001$ vs. vehículo; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. LPS (test de Bonferroni).

III.4.5. ESTUDIO DEL TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA ACTIVADA EN LA RATA.

El tiempo parcial de tromboplastina activada en ratas manipuladas pero que no han recibido LPS es de unos 15 s. La administración de endotoxina (LPS de *E. coli* 0127:B8, 25 mg/kg i.v.) dobla prácticamente el tiempo de formación del coágulo. Los antagonistas del PAF UR-12460 y WEB-2086 a la dosis de 20 mg/kg i.v., administrados 5 min antes del LPS, inhiben el aumento del tiempo parcial de tromboplastina activada inducido por la endotoxina de forma significativa (fig. 51).

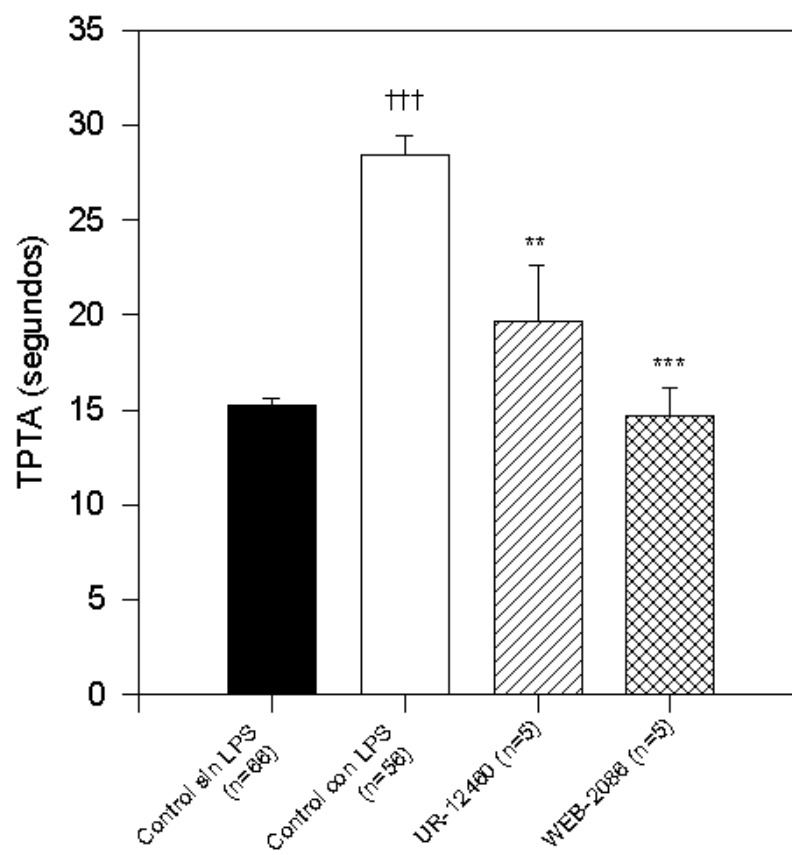


Figura 51.- Variación del tiempo parcial de tromboplastina activada (TPTA) (test APTT-XL, Pacific Hemostasis) tras la administración de endotoxina (LPS de *E. coli* 0127:B8, 25 mg/kg i.v.). Los compuestos se administran, a la dosis de 20 mg/kg i.v., 5 min antes de la administración del LPS. ††† $p < 0.001$ vs. control sin LPS; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control con LPS (test de Bonferroni).

III.4.6. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

La administración de LPS de *E. coli* 0127:B8 a la dosis de 25 mg/kg i.v. produce una serie de alteraciones a nivel de la bioquímica plasmática en la rata. Bilirrubina, creatinina, glucosa, lactato y urea aumentan de forma extremadamente significativa sus niveles en plasma, 2 h tras la administración de LPS, mientras que los niveles de colesterol y proteínas disminuyen también de forma extremadamente significativa. La administración i.v. de UR-12460 10 mg/kg, 5 min antes del LPS, inhibe las variaciones en el nivel de bilirrubina, creatinina, glucosa, lactato y urea, mientras que no es efectiva cuando se trata de inhibir las variaciones en colesterol y proteínas. El WEB-2086 a la dosis de 10 mg/kg i.v. sólo se ha incluido en las valoraciones de glucosa y lactato, disminuyendo sus niveles en ambos casos, aunque de forma significativa sólo en el primero (figs. 52-54).

La administración de LPS, por otra parte, produce aumentos en varias actividades enzimáticas: fosfatasa ácida (ACP), aspartato-aminotransferasa (AST), alanina-aminotransferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH). El UR-12460, administrado a 10 mg/kg i.v., inhibe significativamente el aumento de ALT y LDH, mientras que la disminución de la AST no llega a ser significativa. A una dosis mayor (20 mg/kg) inhibe también de forma significativa el aumento de ACP (datos no mostrados). El WEB-2086 a 10 mg/kg i.v. se ha probado en la valoración de ACP y LDH, inhibiendo de forma significativa el aumento de ambas actividades (figs. 55 y 56).

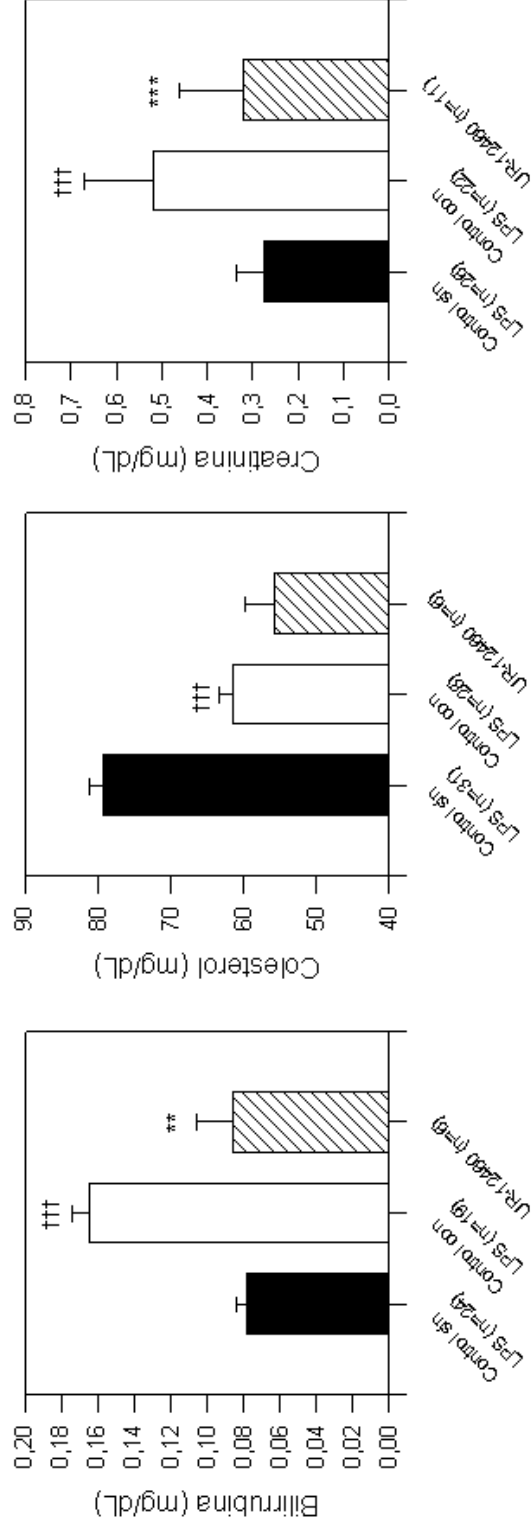


Figura 52.- Variación de los niveles de bilirrubina, colesterol y creatinina en plasma de rata 2 h después de la administración de endotoxina (LPS de *E. coli* 0127:B8, 25 mg/kg i.v.). El compuesto se administra a la dosis de 10 mg/kg i.v., 5 min antes del LPS. ††† $p < 0.001$ vs. control sin LPS; †† $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control con LPS (test de

Danfmann)

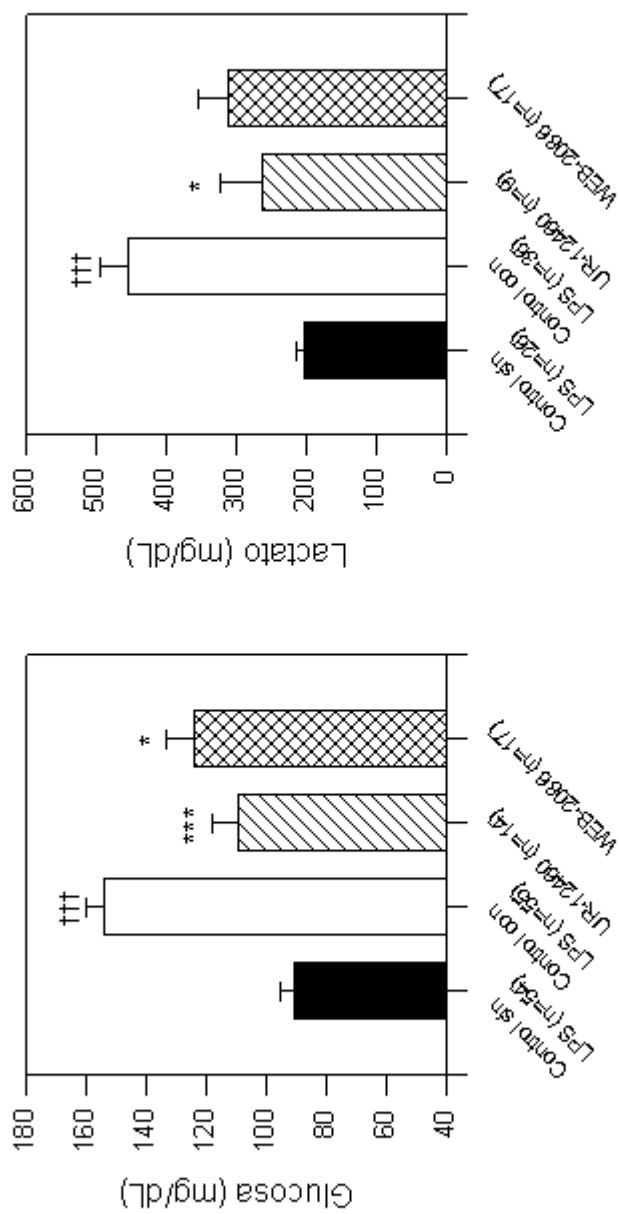


Figura 53.- Variación de los niveles de glucosa y lactato en plasma de rata 2 h después de la administración de endotoxina (LPS de *E. coli* 0127:B8, 25 mg/kg i.v.). Los compuestos se administran a la dosis de 10 mg/kg i.v., 5 min antes del LPS. ††† $p < 0.001$ vs. control sin LPS; †† $p < 0.01$ vs. control sin LPS; † $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control con LPS (test de

Danfarnini)

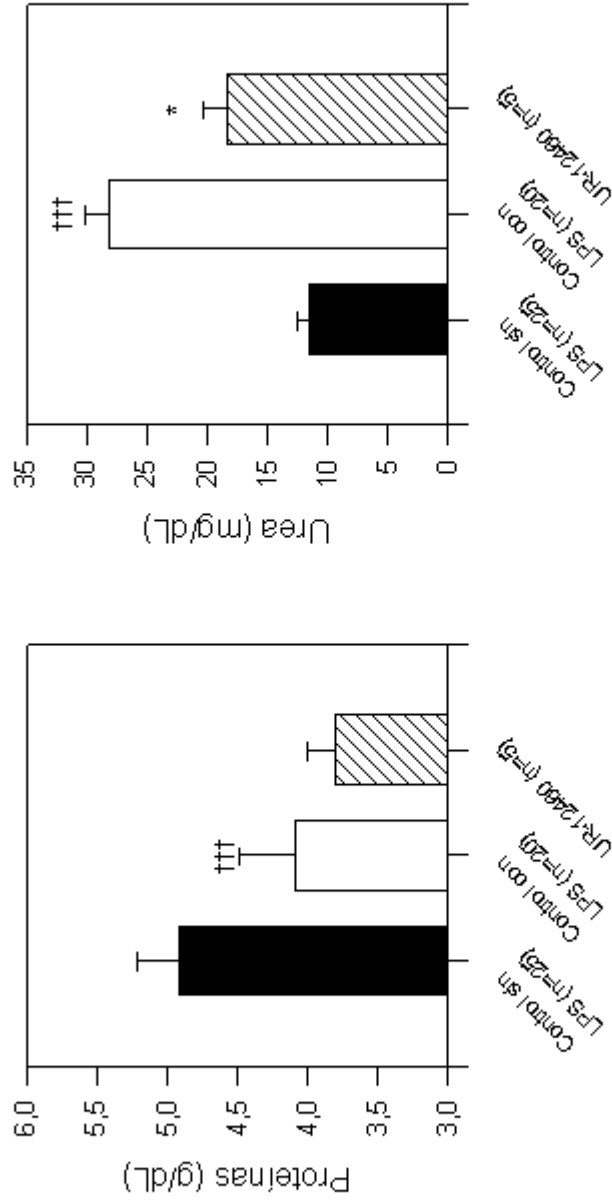


Figura 54.- Variación de los niveles de proteínas y urea en plasma de rata 2 h después de la administración de endotoxina (LPS de *E. coli* 0127:B8, 25 mg/kg i.v.). El compuesto se administra a la dosis de 10 mg/kg i.v., 5 min antes del LPS. ††† $p < 0.001$ vs. control sin LPS; * $p < 0.05$ vs. control con LPS (test de Bonferroni).

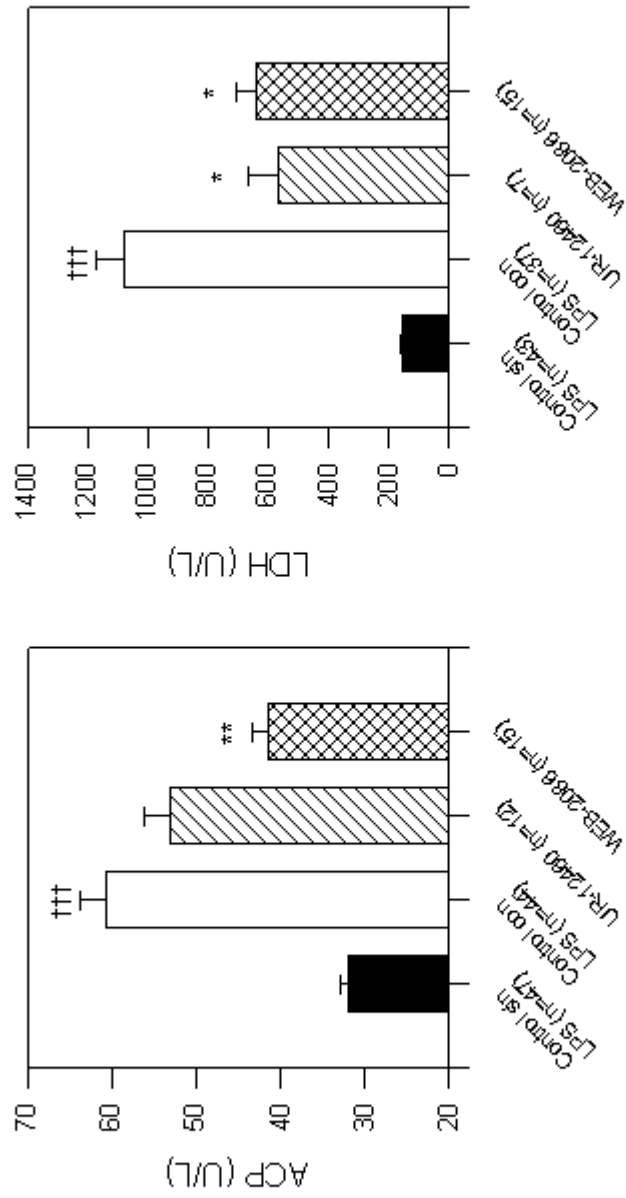


Figura 55.- Variación de los niveles de fosfatasa ácida (ACP) y lactato deshidrogenasa (LDH) en plasma de rata 2 h después de la administración de endotoxina (LPS de *E. coli* 0127:B8, 25 mg/kg i.v.). Los compuestos se administran a la dosis de 10 mg/kg i.v., 5 min antes del LPS. ††† $p < 0.001$ vs. control sin LPS; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control con LPS (test de Bonferroni).

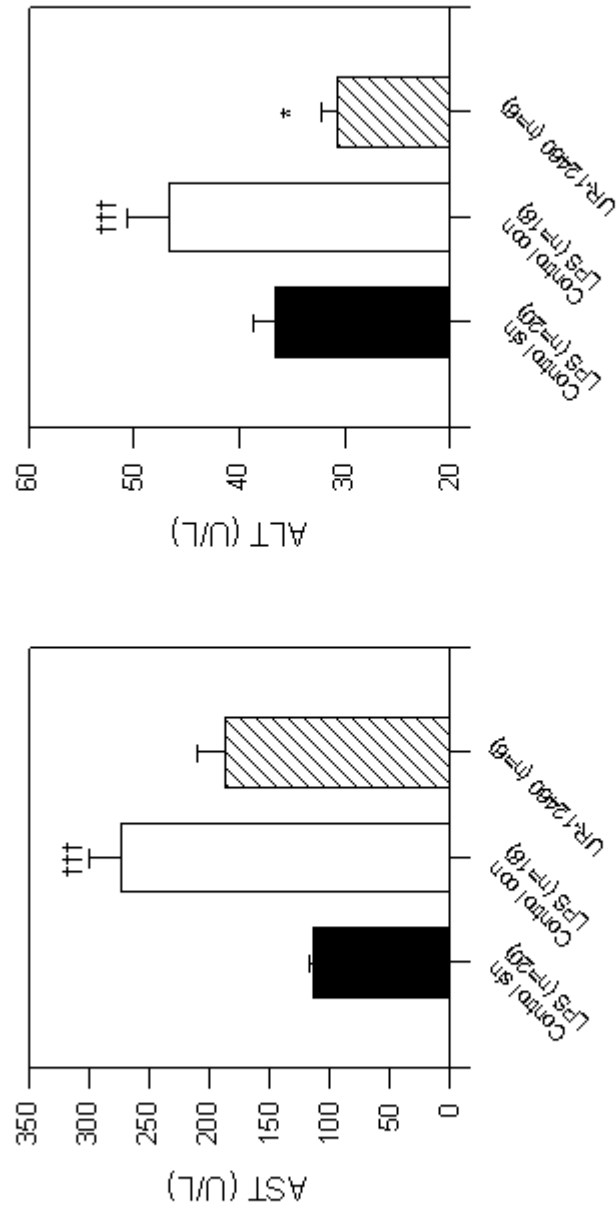


Figura 56.- Variación de los niveles de aspartato-aminotransferasa (AST) y alanina-aminotransferasa (ALT) en plasma de rata 2 h después de la administración de endotoxina (LPS de *E. coli* 0127:B8, 25 mg/kg i.v.). El compuesto se administra a la dosis de 10 mg/kg i.v., 5 min antes del LPS. ††† $p < 0.001$ vs. control sin LPS; * $p < 0.05$ vs. control con LPS (test de Bonferroni).

III.5. Shock hipovolémico

Antes de probar la acción de los antagonistas del PAF en este modelo, hemos estudiado el efecto de volúmenes diferentes de extracción de sangre sobre la presión arterial y la mortalidad.

Se han probado dos volúmenes diferentes de extracción (6 y 3 mL). Para valorar la homogeneidad de los valores de presión arterial obtenidos tras la hemorragia, y para comparar ambos volúmenes de extracción, se ha calculado *a posteriori* la media de los valores de presión de todos los animales a los que se les ha inducido el shock hemorrágico. Los valores de la presión arterial media expresados en mmHg y como porcentaje respecto del valor basal son los siguientes:

		presión arterial media				
		basal		tras la hemorragia		
volumen	n	mm Hg	E.E.	mm Hg	E.E.	% vs. basal
6 mL	16	81	3.2	31	2.5	39
3 mL	114	73	1.4	42	0.9	58

E.E.: error estándar.

Estos resultados demuestran que la extracción de volúmenes fijos de sangre produce caídas de presión arterial muy homogéneas en los dos casos, y que la gravedad de la hipotensión es proporcional a la hemorragia producida.

La extracción de un total de 6 mL de sangre por rata parece excesiva puesto que la mortalidad en el grupo control es muy elevada. Una rata de este peso tiene una volemia aproximada de 15 mL, por lo que se le está extrayendo un 40% de su volumen total. Esto supone un shock hemorrágico grave. El volumen de 3 mL es el que elegimos finalmente para nuestros experimentos posteriores ya que la tasa de supervivencia en el grupo control es mucho más elevada que en el caso anterior, y sólo supone un 20% de la volemia (figs. 57 y 58).

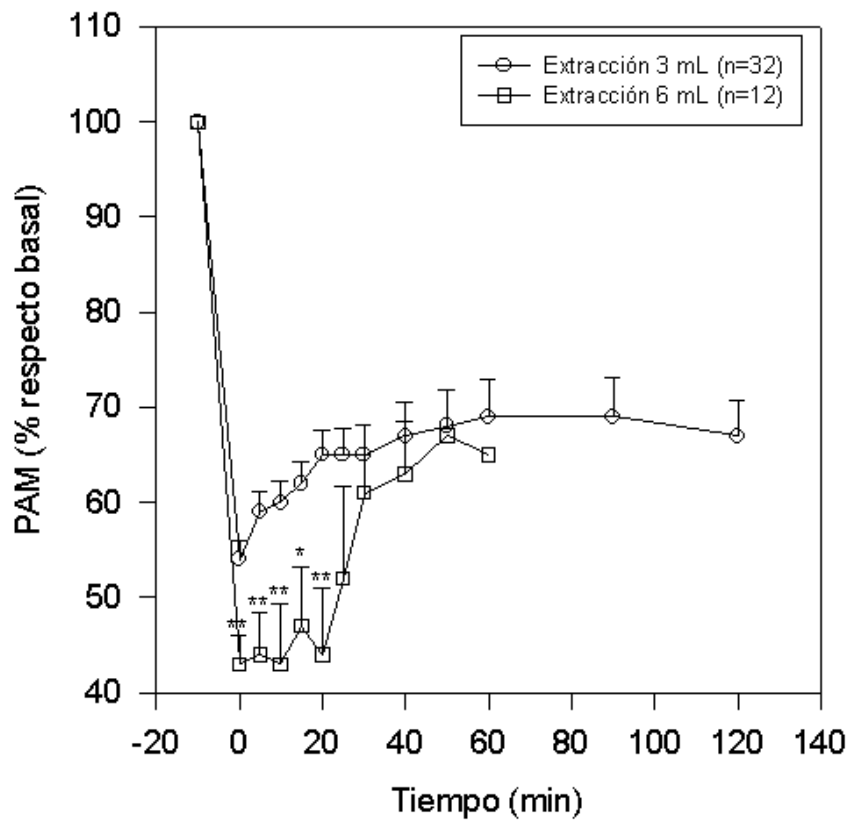


Figura 57.- Variación de la presión arterial media (PAM) tras la extracción de 3 y 6 mL de sangre (tiempo 0) en ratas anestesiadas que no han recibido ningún tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. extracción 3 mL (test t de Student).

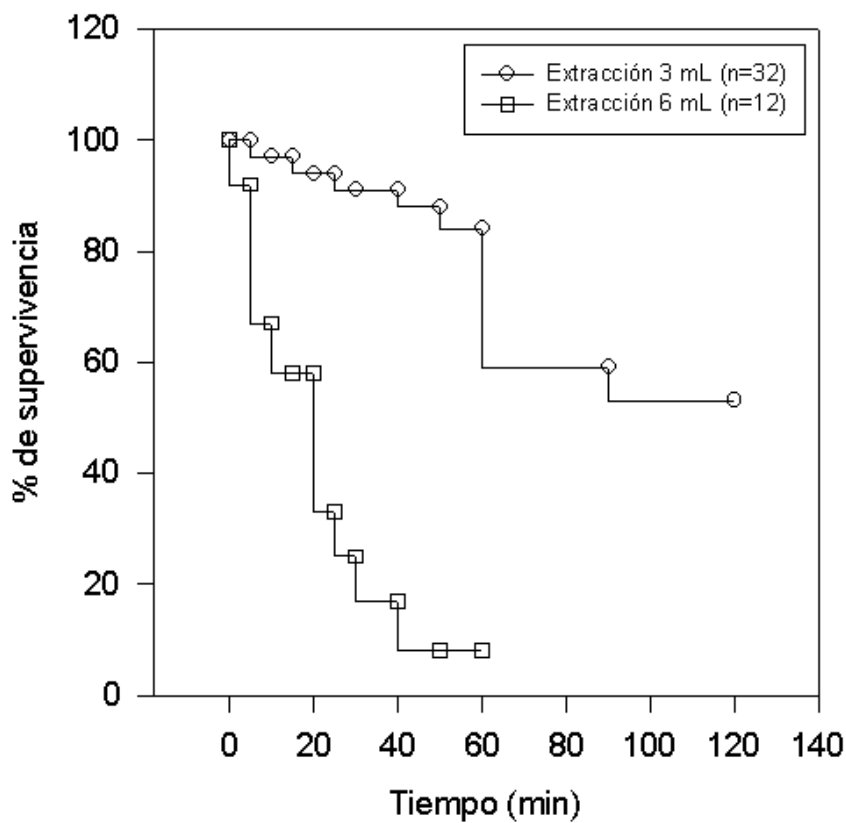


Figura 58.- Evolución de la tasa de supervivencia tras la extracción de 3 y 6 mL de sangre (tiempo 0) en ratas anestesiadas que no han recibido ningún tratamiento. La diferencia entre ambas curvas es extremadamente significativa ($p < 0.001$, test de Mantel-Haenszel).

III.5.1. HIPOTENSIÓN EN LA RATA ANESTESIADA.

La extracción de 3 mL de sangre produce una caída de la presión arterial cercana al 50% con respecto a la presión inicial. A lo largo de las 2 horas que dura el experimento la presión se eleva ligeramente, pero sin superar nunca el 70% con respecto a los valores iniciales. Hay que tener en cuenta que en ningún momento del experimento hay reposición de líquidos (excepto la administración del bolus).

Tanto el UR-12460 como el WEB-2086, a la dosis de 1 mg/kg i.v. revierten significativamente la hipotensión producida tras la hemorragia en los primeros minutos (fig. 59). A partir de los 60 min sólo los animales tratados con WEB-2086 mantienen unos niveles estables de presión (del 80% con respecto al basal), mientras que los tratados con UR-12460 caen a niveles similares al control. Sin embargo, una dosis mayor de este compuesto (10 mg/kg) sí que produce un aumento duradero de la presión arterial, con valores de más del 80% a los 120 min post-hemorragia (fig. 60).

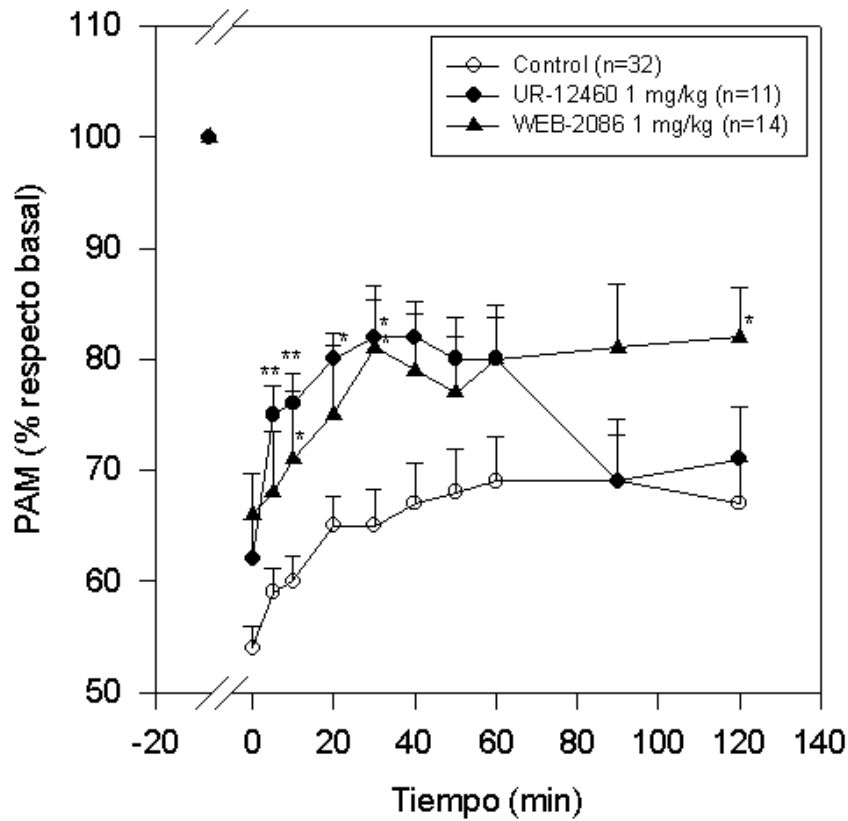


Figura 59.- Variación de la presión arterial media (PAM) tras la extracción de 3 mL de sangre (2 extracciones sucesivas de 1.5 mL en un intervalo de 5 min) en la rata anestesiada. Los compuestos se administran por vía i.v. 5 min después de la última extracción (tiempo 0). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control (test de Bonferroni).

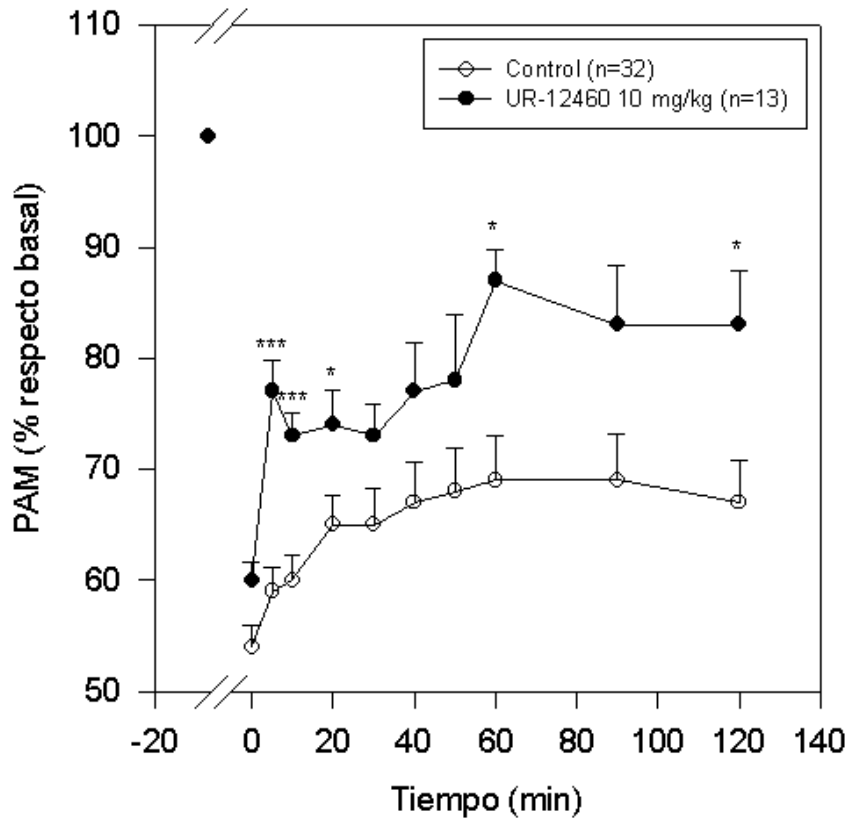


Figura 60.- Variación de la presión arterial media (PAM) tras la extracción de 3 mL de sangre (2 extracciones sucesivas de 1.5 mL en un intervalo de 5 min) en la rata anestesiada. El compuesto se administra por vía i.v. 5 min después de la última extracción (tiempo 0). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control (test t de Student).

III.5.2. MORTALIDAD INDUCIDA POR SHOCK HEMORRÁGICO EN LA RATA ANESTESIADA.

El análisis de las curvas de supervivencia mediante el test de *log-rank* demuestra que los tratamientos no cambian significativamente el porcentaje de supervivencia con respecto al grupo control, aunque el WEB-2086 parece mostrar una cierta tendencia (fig. 61). Al aumentar la dosis de UR-12460 a 10 mg/kg i.v. tampoco se observan diferencias significativas con respecto al grupo control (datos no mostrados).

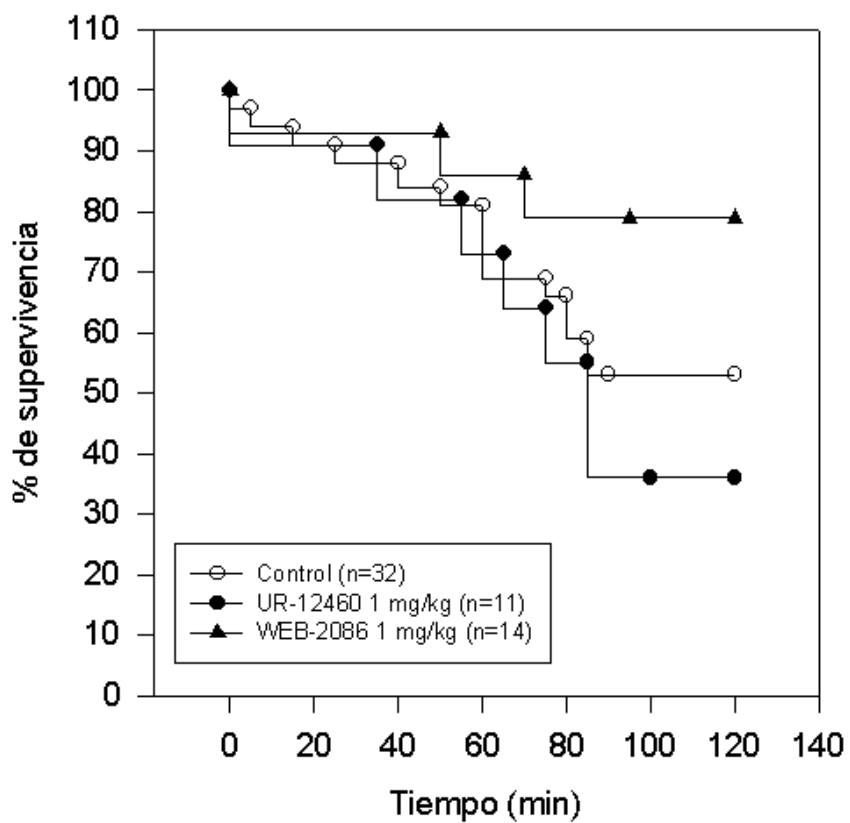


Figura 61.- Evolución de la tasa de supervivencia tras la extracción de 3 mL de sangre (2 extracciones sucesivas de 1.5 mL en un intervalo de 5 min) en la rata anestesiada. Los compuestos se administran por vía i.v. 5 min después de la última extracción (tiempo 0). No hay diferencias significativas entre la curva del grupo control y la de los tratamientos (test log-rank).

IV. DISCUSIÓN

Desde que los primeros estudios con antagonistas del PAF relacionaron a éstos con los estados de shock hasta hoy, siguen abiertos muchos interrogantes sobre la importancia real de este tipo de compuestos ante un síndrome tan complejo.

Los diferentes trabajos desarrollados en esta tesis pretenden ser una aportación al estudio del papel del PAF y de sus antagonistas en el shock. Para ello, se han recogido todos los modelos experimentales puestos a punto en los Laboratorios J. Uriach & Cía. durante varios años de estudio en este campo. El desarrollo del compuesto estudiado aquí, el UR-12460, ha sido abandonado por problemas de estabilidad química. Sin embargo, su estudio a fondo (como ocurre con muchos compuestos que no llegan a ser comercializados por las compañías que los estudian) ha sido igualmente de mucha utilidad para profundizar en la relación entre PAF y shock.

Con el UR-12460 se han realizado una serie de pruebas, tanto *in vitro* como *in vivo*, que han permitido catalogarlo como un antagonista del PAF potente y selectivo. Una vez elegido este compuesto como líder entre otros varios candidatos, fue sometido a pruebas de actividad en los diferentes modelos de shock que se han descrito en apartados anteriores de esta tesis.

Para mayor claridad, la discusión de cada uno de estos modelos se realizará por separado.

SHOCK ANAFILÁCTICO.

Hemos estudiado el efecto de los antagonistas del PAF en varios modelos de shock anafiláctico en tres especies diferentes, valorando mortalidad, parámetros hemodinámicos y respiratorios, y fenómenos de extravasación vascular. Los modelos utilizados se resumen en la siguiente tabla:

.Tipo de shock	Especie	Sensibilización	Tiempo hasta reexposición	Reexposición al antígeno	Valoraciones
activo	ratón	<i>B. pertussis</i> + BSA, i.p.	14 días	Propranolol + BSA, i.v.	mortalidad
activo	cobayo	OVA, i.p. + s.c.	28 días	Mepiramina + OVA, i.v.	PAM, FEM, mortalidad
pasivo	rata	antisuero anti OVA, i.d.	48 horas	OVA + azul de Evans, i.v.	extravasación cutánea

BSA: albúmina de suero bovino; OVA: ovoalbúmina; PAM: presión arterial media; FEM: flujo espiratorio máximo.

El shock anafiláctico es una de las manifestaciones más críticas de las reacciones alérgicas. Los signos clínicos de la anafilaxia incluyen urticaria, angioedema, dificultad respiratoria e hipotensión profunda. Se han estudiado muchos mediadores químicos como sospechosos de participar en este proceso, y entre ellos se encuentra el PAF. El PAF se libera *in vivo* durante la anafilaxia (Pinckard y cols., 1979). Se ha especulado con la idea de que el PAF fuera el responsable directo de la mortalidad en el shock anafiláctico, por encima de otros mediadores (Terashita y cols., 1987), por lo que hemos utilizado el clásico modelo de anafilaxia activa en el ratón, en el que exclusivamente se valora la supervivencia de los animales. Los resultados de DI_{50} obtenidos en este modelo hacen pensar que realmente el PAF tiene un papel central en la letalidad originada en este modelo experimental. Por otra parte, hemos demostrado una buena correlación entre esta prueba y la de mortalidad inducida por PAF. El hecho de que las dosis de antagonistas del PAF necesarias para prevenir la mortalidad por PAF sean mucho menores que las necesarias para inhibir la muerte por shock anafiláctico podría explicarse por varias razones como, por ejemplo, que en el shock anafiláctico se liberan grandes cantidades de PAF, mayores que las inyectadas experimentalmente, o que los lugares de acción o distribución del PAF endógeno son diferentes de los del PAF exógeno (Terashita y cols., 1987).

En el cobayo, los antagonistas del PAF probados se han mostrado también efectivos en la inhibición de la mortalidad inducida por el shock anafiláctico. El WEB-2086, sin embargo, se ha mostrado unas 10 veces más potente que el UR-12460 cuando se administran por vía oral. En los experimentos en ratón también ocurre algo similar, aunque si se administran i.v. es mejor el UR-12460.

El modelo de shock anafiláctico activo en cobayo anestesiado permite valorar no sólo mortalidad sino también variaciones de la presión arterial media y del flujo respiratorio. Tras la reexposición al antígeno se producen un aumento de la presión arterial y una disminución del flujo espiratorio máximo en los primeros minutos. El WEB-2086 inhibe de forma significativa la disminución del flujo espiratorio en los primeros minutos tras la reexposición, mientras que no inhibe el aumento de la presión arterial media. Esto reafirmaría las hipótesis de algunos autores que sugieren que el PAF participaría en el shock anafiláctico activo a nivel pulmonar pero no a nivel del sistema vascular (Casals-Stenzel, 1987). A la misma dosis, el UR-12460 no produce ningún efecto.

La reacción de anafilaxia pasiva cutánea es un método muy conocido para el estudio de la hipersensibilidad de tipo I. En nuestro estudio, la administración de UR-12460 por vía oral no ha mostrado efectividad en la reducción de la extravasación cutánea, como sí han hecho el ketotifeno y también otros antihistamínicos probados en nuestro laboratorio (datos no mostrados). El papel del PAF en este tipo de reacciones pudiera no ser tan importante como el de otros mediadores que también intervienen (histamina, LTD₄, etc.). En un estudio con el antagonista del PAF CV-3988, Taira y cols. (1988) mostraron la inefectividad de dicho compuesto administrado por vía i.v. en un modelo de anafilaxia pasiva cutánea en rata. Estudios con el WEB-2086 también sugieren la importancia limitada del PAF en las alteraciones respiratorias, circulatorias y hematológicas que tienen lugar en la anafilaxia (Lohman y Halonen, 1990) y en la formación del edema por anafilaxia pasiva cutánea en el conejo (Hellewell y cols., 1992). Algunos autores sugieren que lo más efectivo para inhibir la extravasación inducida por la administración del antígeno sería una combinación de antagonistas (del PAF, de la histamina, del LTD₄, etc.) ya que todos estos mediadores son liberados por los mastocitos y participan en la respuesta anafiláctica (Weg y cols., 1991).

ISQUEMIA-REPERFUSIÓN ESPLÁCNICA.

La isquemia intestinal aguda por oclusión de la arteria mesentérica superior es una entidad clínica de extrema gravedad, descrita ya a finales del siglo pasado, y que da lugar a necrosis intestinal y a un elevado índice de mortalidad. A finales de los años 50 aparecen en la literatura algunos trabajos a nivel clínico que muestran cifras de mortalidad cercanas al 90% en pacientes con oclusión de la arteria mesentérica. Los avances en cirugía vascular pronto permitieron comprobar que el restablecimiento de la circulación no siempre se correspondía con un aumento de la supervivencia. A partir de estos estudios, y de posteriores evidencias experimentales (utilizando animales a los que se les ocluían las arterias esplácnicas), empezó a verse claro que la muerte era causada por otros factores además de la pérdida de viabilidad intestinal. Un hecho importante fue la observación de que los animales a los que se les retiraba la oclusión entraban en estado de shock y morían más rápidamente que los que permanecían con la oclusión (Shapiro y cols., 1958). Además, los hallazgos post-mortem encontrados en animales en los cuales se había producido desoclusión, no eran suficientes como para explicar la muerte en términos de gangrena o de peritonitis. Hoy en día, aunque la fisiopatología del shock por oclusión de las arterias esplácnicas no se ha esclarecido totalmente, se sabe que están implicados múltiples mecanismos como el aumento en la permeabilidad vascular e hipovolemia, la pérdida de mecanismos de control vascular y la depresión de la contractilidad miocárdica. También los neutrófilos se han implicado en la patogénesis de este proceso, mediante su acumulación en los tejidos y liberación de radicales libres, citoquinas y enzimas proteolíticas.

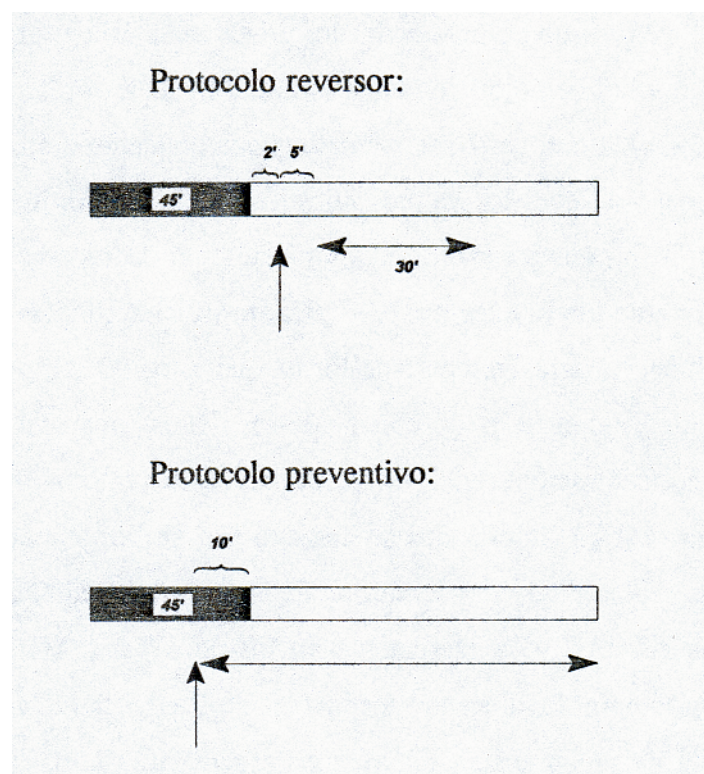
La oclusión y reperfusión de las arterias esplácnicas es un modelo experimental bien conocido, que clínicamente puede aproximarse a la hipoperfusión del tracto gastrointestinal asociada a enfermedades de origen vascular o cardíaco (embolia, aterosclerosis, etc). Típicamente, tras la oclusión hay un aumento transitorio de la presión arterial media y el gasto cardíaco, debido probablemente a la redistribución del flujo y a ajustes reflejos vasculares. Tras este aumento, los valores de presión vuelven a la normalidad y permanecen así mientras dura la isquemia. La desoclusión produce una disminución brusca y transitoria de la presión arterial que, aunque se recupera ligeramente, disminuye luego progresivamente hasta la muerte del animal (Lefer y Ma, 1991). Además de la hipotensión, otra característica importante de este modelo es la aparición de lesiones en la mucosa intestinal. Los estudios realizados en animales sobre

isquemia-reperfusión intestinal han demostrado que la perfusión o reoxigenación *per se* puede producir las mismas consecuencias que la hipoxia prolongada (disfunción de la mucosa, daño celular y necrosis) (Kubes y Granger, 1992). La perfusión inicia una compleja cascada de acontecimientos que dan lugar a disfunción microvascular y de las células endoteliales, y que origina la lesión. Otra característica típica de este modelo es la aparición de una marcada leucopenia, probablemente como reflejo de los procesos de adhesión de neutrófilos que tienen lugar a nivel del endotelio de la microvasculatura mesentérica. Los neutrófilos, como se comentará también al hablar de la isquemia-reperfusión miocárdica, intervienen de manera importante en la patogénesis de la isquemia-reperfusión esplácnica. Hay muchas evidencias experimentales de esta teoría, como por ejemplo el hecho de que el aumento de la permeabilidad vascular que tiene lugar tras la perfusión no se produce en animales neutropénicos, y que la administración de anticuerpos contra la molécula de adhesión CD11/18 reduce significativamente la permeabilidad microvascular durante la perfusión (Kubes y cols., 1990).

El PAF está involucrado en la patogénesis del shock por oclusión de las arterias esplácnicas, y parece ser que el papel más importante lo juega a nivel de la interacción leucocito-endotelio. El PAF es un potente activador de los neutrófilos, promoviendo además su adhesión al endotelio y la liberación de radicales libres (Kubes y cols., 1990) y citoquinas (Rabinovici y cols., 1991a). En el perro, se ha visto que la concentración plasmática de PAF alcanza un máximo (unas 14 veces los valores iniciales) hacia los 5 min tras la perfusión, y va disminuyendo de forma que a los 60 min los niveles son de 4 veces los iniciales (Filep y cols., 1989). En la rata, los niveles de PAF alcanzan el máximo a los 30 min tras la perfusión, bajando luego progresivamente de forma que a los 90 min los niveles son muy similares a los iniciales (Zingarelli y cols., 1992). Estos mismos autores valoraron simultáneamente las concentraciones del factor de necrosis tumoral (TNF) y del factor depresor del miocardio (MDF), implicados ambos también en la patogénesis del shock por oclusión de las arterias esplácnicas, y observaron que la mortalidad aumentaba a medida que disminuían los niveles de PAF y se incrementaban los de TNF y MDF. Es decir, no se observaba una relación temporal clara entre los niveles de PAF y la mortalidad inducida por el shock esplácnico, y sí se apreciaba en lo que respecta a los otros dos factores. Sin despreciar la importancia del PAF en este proceso, es posible que tanto el TNF como el MDF tengan una implicación más directa en la mortalidad inducida por la isquemia-reperfusión intestinal. Se ha especulado con la posibilidad de que el

PAF intervenga de manera clave induciendo la liberación de los otros dos factores (Zingarelli y cols., 1992).

Hemos estudiado el efecto de los antagonistas del PAF en la isquemia-reperfusión intestinal causada por la oclusión temporal de las arterias esplánicas (mesentérica superior y celíaca) en la rata. Se han valorado la mortalidad, la evolución de la presión arterial media y parámetros hematológicos como leucocitos y plaquetas. Utilizando siempre el mismo tiempo de isquemia, hemos probado dos protocolos de administración diferentes, que hemos denominado reversor o preventivo según se inicie el tratamiento después o antes de la desoclusión esplácnica. A continuación se representan ambos protocolos en forma de esquema. La barra oscura indica el período de isquemia mientras que la barra clara indica la reperfusión. Las flechas verticales representan el momento de administración del tratamiento en forma de bolus y las flechas horizontales representan la administración continua de dichos tratamientos por medio de una bomba de infusión. Los períodos de reperfusión varían según se valore la mortalidad, la presión, o los parámetros hematológicos.



Los resultados obtenidos en nuestro estudio hacen pensar que el protocolo preventivo utilizado no sería muy efectivo, y es probable que esto ocurra porque en el momento en que se administra el bolus de producto se mantiene todavía la oclusión y la zona esplácnica presenta una irrigación inferior a la normal. La infusión realizada posteriormente, representa una proporción de producto mucho menor que el bolus, por lo que no hay que descartar que, utilizando dosis mayores, los antagonistas utilizados mostrarán unos resultados mejores que los obtenidos. En dicho protocolo preventivo, no se han observado diferencias significativas de los tratamientos con respecto a los controles ni en las variaciones de la presión arterial media ni en la disminución de la mortalidad (pero este último parámetro sí es significativo cuando se aumenta la dosis de WEB-2086, sugiriendo de nuevo un problema de dosis). En cambio, en el protocolo reversor, cuando los compuestos se administran en un momento en que los niveles de PAF comienzan a ser importantes y son todavía superiores a los de TNF y MDF, se produce inhibición significativa de la mortalidad por parte de ambos tratamientos, y también ciertas diferencias en la variación de la presión arterial media. Estos resultados sugieren que la administración de antagonistas del PAF debe realizarse justo después de la reperfusión, que es el momento en el que el PAF interviene de forma más importante, y antes de que se produzca la activación y/o liberación de otros factores, como los ya mencionados TNF y MDF.

En lo que respecta a la leucopenia característica de este modelo, en nuestro estudio comprobamos que, efectivamente, se produce dicha disminución del número de leucocitos. Como ya se ha comentado, es probable que esta disminución sea el reflejo de un proceso de adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales. Los tratamientos probados no han mostrado efectividad. Esto podría explicarse por los mismos motivos ya expuestos al hablar del protocolo preventivo, puesto que es el que se ha utilizado para valorar los parámetros hematológicos. Canale y cols. (1994) realizan la administración del antagonista del PAF TCV-309 a los 5 min de la desoclusión y valoran el contaje leucocitario a los 45 y a los 80 min. Sólo en esta última valoración aparecen diferencias significativas ya que la leucopenia es mucho más acentuada que a los 45 min. Nosotros realizamos la valoración a los 60 min.

En nuestro estudio hemos observado que se produce también una disminución del recuento de plaquetas 1 h después de la desoclusión. Este proceso debería ser independiente del

PAF puesto que las plaquetas de rata carecen de receptores específicos. Se ha citado al tromboxano A₂ (TXA₂) como un mediador clave en el shock por oclusión de las arterias esplánicas (Oei y cols., 1986). El TXA₂ induce la agregación plaquetaria, aumenta la permeabilidad de las membranas y ejerce un potente efecto vasoconstrictor en todos los lechos vasculares. La utilización de antagonistas de los receptores del tromboxano como el BM-13505 (Daltroban, Boehringer Mannheim) o el S145Na (Shionogi & Co.) ha demostrado efectividad en la reducción de la mortalidad inducida por la oclusión esplánica en la rata (Aoki y Lefer, 1988; Furlan y cols., 1990).

ISQUEMIA-REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA.

El estudio de los efectos de los antagonistas del PAF sobre las alteraciones inducidas por la isquemia y la reperfusión miocárdica lo hemos abordado bajo dos puntos de vista: valoración de fenómenos arrítmicos y valoración del área de infarto. Junto con estas dos alteraciones hemos analizado, en algunos casos, parámetros hemodinámicos y funcionalidad cardíaca.

Dada la variedad de experimentos realizados, se incluye a continuación un pequeño cuadro resumen para situar los protocolos que se irán comentando en la discusión posterior.

	Objetivo	Tiempo de isquemia (*)	Tiempo de reperfusión	Compuestos estudiados
<i>In vivo</i>	Valoración arritmias y hemodinamia	6 min	10 min	UR-12460 WEB-2086 MPG Quinidina
	Valoración infarto	20 min	20 min	UR-12460 MPG
<i>In vitro</i> (con y sin sangre diluida)	Valoración infarto y función cardíaca. Comparación con <i>in vivo</i>	10 min	10 min	Sólo controles
		15 min	15 min	
		20 min	20 min	UR-12460 MPG

(*): En los experimentos *in vivo* se trata de una isquemia regional (por ligadura de la arteria coronaria descendente izquierda), mientras que *in vitro* se trata de una isquemia global (por interrupción de la perfusión del Langendorff).
MPG: *N*-(2-mercaptopropionil)glicina.

Arritmogénesis por isquemia-reperfusión.

Desde la década de los 50 se sabe que la restauración del flujo sanguíneo en el miocardio de animales de experimentación después de un período de isquemia se asocia a la aparición de graves arritmias ventriculares (Sewell y cols., 1955). Veinte años después de este trabajo, Schaffer y Cobb (1975) publicaron un estudio en el cual sugerían la importancia clínica de estas arritmias de la reperfusión, ya que observaron que la muerte súbita cardíaca en pacientes que sufrían fibrilación ventricular no iba siempre acompañada de la obstrucción permanente de una

arteria coronaria. Durante la segunda mitad de la década de los 70 se publicaron varios trabajos sobre estas arritmias, con modelos experimentales *in vivo* que utilizaban animales grandes como el perro o el gato, o bien modelos *in vitro* usando corazones de rata perfundidos según el método de Langendorff. Kane y cols. (1984) fueron los primeros en poner a punto un modelo *in vivo* en la rata anestesiada. Entre sus observaciones destacan la aparición de un patrón definido en cuanto al momento de aparición y a la duración de las arritmias, y la evidencia de que las arritmias que ocurren en la reperfusión son claramente más graves que las que ocurren, durante el mismo período de tiempo, en la isquemia sola, con lo cual estos autores descartan que las arritmias de la reperfusión sean una simple continuación de las que se inician en la oclusión. En el perro, las arritmias de la reperfusión se provocan tras oclusiones por encima de los 60 min. Pudiera ser que, debido a la frecuencia cardíaca tan elevada que posee la rata, las células del área isquémica mueran antes y el tejido sea eléctricamente inexcitable ya a los 20-30 min post-oclusión. El patrón de aparición de arritmias en el perro es también bastante característico (Wainwright y cols., 1989).

A la vista de todos los datos recopilados de la literatura, decidimos utilizar un modelo experimental en rata con el fin de valorar los posibles efectos antiarritmogénicos de nuestros antagonistas del PAF, en base también a los esperanzadores resultados obtenidos por otros investigadores que habían utilizado previamente este tipo de compuestos (Wainwright y cols., 1989; Chakrabarty y cols., 1992). El protocolo elegido, con 6 min de isquemia y 10 de reperfusión, permite detectar suficientemente la aparición de fenómenos arrítmicos tanto en la isquemia como en la reperfusión y, al mismo tiempo, permite valorar la mortalidad, puesto que los animales del grupo control mueren en el 83% de los casos. En general, los modelos experimentales descritos en la literatura parecen corresponder bastante bien con la situación clínica en humanos, en los cuales la mitad de las muertes se producen aproximadamente en la primera hora tras la aparición de los síntomas (Pantridge y cols., 1974; Packer, 1985).

La inclusión de controles de manipulación en nuestros experimentos, es decir, un grupo de animales que son intervenidos quirúrgicamente y a los cuales se les pasa una ligadura por debajo de la coronaria, sin llegar a ocluirla, nos ha permitido comprobar la correcta realización del procedimiento experimental. Los animales de este grupo no sólo han sobrevivido todos tras la manipulación, sino que no han mostrado ninguna alteración en su ritmo cardíaco, ni durante la

isquemia ni durante la reperfusión. Esto nos lleva a suponer que las arritmias observadas en los otros grupos no pueden atribuirse a las manipulaciones quirúrgicas ni a la anestesia utilizada.

El patrón de aparición de acontecimientos arrítmicos en nuestro estudio concuerda bastante con los descritos en la literatura, alguno de los cuales ha sido comentado previamente (Kane y cols., 1984; Colatsky, 1989). En nuestros estudios, las taquicardias aparecen aproximadamente a los 5 minutos, con una precisión marcada, como lo demuestra la pequeña desviación de los datos. Estas arritmias son de corta duración (unos 8 s), de manera que a los 6 min, cuando se realiza la desoclusión, los animales han recuperado ya el ritmo sinusal en la mayoría de los casos. Las arritmias de esta primera fase se caracterizan por un incremento en el retraso de la actividad eléctrica, y es probable que sean causadas por mecanismos de reentrada (Colatsky, 1989). Algunos autores sugieren otros factores, como por ejemplo, que la actividad eléctrica puede dispararse como consecuencia de una sobrecarga de calcio en el citosol de la célula (Pogwizd y Corr, 1987).

Además de ser el único compuesto que consigue reducir de forma significativa las TV de la oclusión en nuestro estudio, el UR-12460 es también el único que, junto con la quinidina, disminuye la aparición de FV en la reperfusión. Además, los pocos animales que han tenido TV con este tratamiento las tienen en el mismo momento que el grupo control, pero con una duración significativamente menor. También en este aspecto, el de duración de las TV, el UR-12460 es el único compuesto que ha funcionado bien de todos los probados por nosotros en este modelo. Estos resultados estarían en consonancia con las teorías que apoyan el papel importante del PAF en la génesis de las arritmias por isquemia-reperfusión miocárdica.

Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el PAF estaría implicado en la arritmogénesis de la isquemia-reperfusión miocárdica no está claro. Pueden ser importantes las acciones directas del PAF, la activación de plaquetas y/o leucocitos, etc., sin olvidar que pueden haber complejas interacciones entre el PAF y otros mediadores. Wainwright y cols. (1989), en su estudio en perros comentado anteriormente, prueban el antagonista SRI 63441 y observan que hay una reducción muy marcada de las arritmias de la segunda fase, y lo mismo ocurre con el antagonista BN 52021. En este trabajo se estudia la evolución del número de plaquetas en la sangre venosa coronaria. Se observa una disminución bifásica del recuento plaquetario durante la

isquemia. Esta disminución puede deberse a que hay agregados plaquetarios circulantes y/o se produce un atrapamiento de las plaquetas a nivel de la microcirculación coronaria. La presencia de los antagonistas del PAF inhibe esta disminución del recuento plaquetario. Sin embargo, no es evidente que el efecto agregante del PAF se correlacione con el efecto arritmogénico, sobre todo porque estos efectos siguen una secuencia temporal algo diferente: aunque hay disminución plaquetaria a los 2-5 min post-oclusión (correspondiendo a la primera fase de arritmias), una segunda disminución tiene lugar a los 30-40 min (y no coincide con la segunda fase de arritmias, que es sobre la que los antagonistas ejercen sus efectos más importantes). De todas formas, la importancia de las plaquetas puede ser relativa, ya que en la rata y el ratón estos elementos sanguíneos carecen de receptores del PAF, y en cambio sí se observa la aparición de arritmias en estas especies, prevenibles por el antagonista del PAF UR-12460.

Otras teorías contemplan que el PAF pueda ejercer un efecto directo sobre el miocito. Se sabe que el PAF tiene un potente efecto inotrópico negativo (Kenzora y cols., 1984; Stahl y Lefer, 1987), y que acorta la duración de los potenciales de acción y, en preparaciones despolarizadas, incrementa la amplitud de V_{max} de los potenciales de acción inducidos por agonistas β -adrenérgicos (Tamargo y cols., 1985). Estos efectos se han atribuido a un aumento en el número de canales lentos de calcio, aunque la utilización de antagonistas como el diltiazem no se ha mostrado efectiva en otros modelos de arritmia y se cree que su papel puede ser menos importante de lo que se había considerado hasta ahora.

Otras acciones interesantes del PAF tienen lugar a nivel del flujo coronario. La inyección intracoronaria de PAF produce un aumento transitorio del flujo, seguido de vasoconstricción prolongada (Feuerstein y cols., 1984). Se cree que este efecto puede deberse en parte a la activación del metabolismo del ácido araquidónico y la liberación de tromboxanos y leucotrienos (Riedel y Mest, 1987). El PAF puede influir en el flujo coronario mediante el secuestro de leucocitos polimorfonucleares, que a su vez liberan sustancias arritmogénicas como el radical superóxido. En el perro, la acumulación de leucocitos tiene lugar a los 15 min de la reducción del flujo coronario, es decir, en el momento en que aparecen las arritmias graves (Engler y Covell, 1987).

Tamargo y cols. (1988) han propuesto que el PAF produce sus efectos mecánicos y electrofisiológicos incrementando la entrada de calcio en el retículo sarcoplásmico y reduciendo su salida, posiblemente a través de canales de potasio calcio-dependientes, o bien a través de un cambio en la disponibilidad del calcio intracelular o en la sensibilidad miocárdica a la concentración intracelular de calcio. Algunos autores opinan que el aumento de la arritmogénesis correspondería inicialmente a este efecto directo del PAF y que posteriormente los diversos mediadores liberados contribuirían a su mantenimiento (Flores y Sheridan, 1990). Esta teoría concuerda bastante bien con nuestros resultados, ya que el único tratamiento que actúa durante la primera fase de arritmias es el antagonista del PAF UR-12460. Otros antagonistas sintetizados en nuestro laboratorio se han mostrado también efectivos en este modelo (datos no mostrados). El WEB-2086 no ha mostrado ningún efecto, aunque este compuesto tampoco se ha mostrado eficaz en varios estudios publicados sobre arritmias e infarto en modelos de isquemia-reperfusión miocárdica (Leong y cols., 1992; Black y cols., 1992), debido probablemente a su menor potencia o a problemas de selectividad tisular.

Es importante la relación entre PAF y radicales libres. En corazón aislado de cobayo, la perfusión con ácido dihidroxifumárico (un sistema generador de radicales libres) induce la producción de PAF intracoronario, al tiempo que tienen lugar alteraciones mecánicas y eléctricas (Alloati y cols., 1994). Se ha visto también que el peróxido de hidrógeno estimula la síntesis de PAF en cultivos de células endoteliales e induce la adhesión de neutrófilos (Lewis y cols., 1988). El PAF es un agente quimiotáctico muy potente para los neutrófilos, que son la fuente principal de radicales libres en la lesión isquémica. El PAF aumenta la reactividad de los leucocitos a diversos agentes y facilita la formación de radicales libres citotóxicos (Vercelotti y cols., 1988). El efecto cardioprotector de algunos antagonistas del PAF se ha relacionado con su inhibición específica de la activación de los neutrófilos inducida por PAF, y la consiguiente liberación de radicales citotóxicos (Chopra y cols., 1993). Se ha visto además que algunos antagonistas poseen acciones antiperoxidativas contra la peroxidación del sarcolema, lo cual puede contribuir parcialmente a sus acciones cardioprotectivas contra la lesión celular y las arritmias inducidas por isquemia-reperfusión (Ranaut y Singh, 1993; Chopra y cols., 1993).

La implicación de los radicales libres es uno de los temas de más actualidad como posible etiología de las arritmias de la isquemia-reperfusión miocárdica. Se sabe que los tejidos

reoxigenados liberan radicales libres, y que éstos, mediante la peroxidación lipídica de las membranas celulares, pueden provocar alteraciones electrofisiológicas (Hearse, 1990). El hallazgo de que las arritmias letales asociadas a la lesión por reperfusión eran suprimidas por varios captadores de radicales libres (superóxido dismutasa, catalasa, manitol, metionina, glutatión y desferroxiamina) (Bernier y cols., 1986) apoya todavía más la implicación de los radicales libres y la peroxidación lipídica en la arritmogénesis. En vista del creciente interés de este tema, decidimos incluir en nuestros experimentos la *N*-(2-mercaptopropionil)glicina (MPG), un análogo sintético de bajo peso molecular del glutatión, un importante antioxidante endógeno. La MPG es un excelente captador del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y del radical hidroxilo (\cdot OH), que es el más citotóxico de todos los radicales conocidos. Sin embargo, no es captador del radical superóxido (O₂⁻) (Horwitz y cols., 1994).

En nuestro experimento de valoración de arritmias, la MPG no ha tenido el efecto esperado *a priori*, ya que únicamente ha mostrado una tendencia no significativa a disminuir las TV de la oclusión, mientras que en el modelo utilizado para valorar el área de infarto (20 min de isquemia y 20 min de reperfusión) ha mostrado una gran efectividad. Estos resultados aparentemente discrepantes pueden explicarse teniendo en cuenta que el proceso de generación de radicales libres puede ser relativamente largo, con respecto a la duración total de nuestro protocolo. Todo el proceso comienza con la activación de los leucocitos, adhesión de los mismos a las células endoteliales, transmigración al espacio extravascular, adhesión a las células miocárdicas, liberación de los radicales, y reacciones de oxidación intracelulares. Horwitz y cols. (1994) proponen, basándose en estudios en perro, que toda esta serie de procesos requieren bastante tiempo, y que la mayoría de la necrosis miocárdica que origina este mecanismo tiene lugar después de la primera hora de la reperfusión. Por otra parte, de sus estudios con tres protocolos diferentes de infusión de MPG deducen que el período más crítico para la supresión de los radicales está aproximadamente entre 30 min y 4-5 horas después del comienzo de la reperfusión.

Otro de los compuestos utilizados en nuestro estudio es la quinidina. La quinidina es un antiarrítmico de clase I, uno de los más utilizados y también uno de los fármacos antiarrítmicos más antiguos. Sin embargo, como otros antiarrítmicos bien conocidos, la quinidina tiene una serie de efectos secundarios, tanto a nivel cardíaco como extracardíaco, que han llevado a

discutir su utilización en la clínica. Los efectos cardíacos incluyen alteraciones del ritmo y de la conducción; los extracardíacos incluyen toxicidades del sistema nervioso central, gastroenterológicas y hematológicas. En nuestro experimento, hemos observado que algunos animales tratados con quinidina presentan una disminución marcada de la presión arterial (la hipotensión es un efecto secundario característico de este antiarrítmico a concentraciones no tóxicas). Aunque la quinidina no ha sido capaz de inhibir las TV de la oclusión a la dosis de 3 mg/kg + 3 mg/kg/h, ha sido el único de todos los compuestos probados que ha conseguido inhibir la mortalidad en un 100%.

Lesión miocárdica por isquemia-reperfusión.

Para valorar el infarto se han realizado tanto estudios *in vivo* como *in vitro*. Estos últimos se han realizado especialmente para profundizar sobre el papel de las células sanguíneas en la génesis de la lesión por isquemia-reperfusión, y su relación con el PAF.

Para estudiar el efecto del antagonista del PAF UR-12460 en la lesión miocárdica inducida por isquemia-reperfusión *in vivo*, se ha utilizado el mismo protocolo experimental que para valorar las arritmias, pero con tiempos de isquemia y perfusión diferentes. Después de varios experimentos previos, hemos elegido el protocolo de 20 min de isquemia y 20 de perfusión porque la lesión provocada es lo suficientemente importante como para producir un infarto significativo (un 66% del área de riesgo en los animales control) y la mortalidad es muy baja. De hecho, de las 91 ratas utilizadas para realizar este experimento (incluyendo otros tratamientos que no se recogen en esta tesis) sólo 14 han muerto durante la oclusión (es decir, el 15%). Estas muertes se han producido coincidiendo generalmente con la primera fase de arritmias y, por tanto, no se asocian a ningún tratamiento. Por otra parte, no ha muerto ningún animal durante la fase de desoclusión.

Aunque este protocolo se puso a punto para valorar el área de infarto y no las arritmias cardíacas, el examen de los registros gráficos de la presión arterial permite observar la presencia de TV y/o FV (identificables por descensos transitorios de la presión arterial, que llegan cerca de

cero en el caso de la FV). Este examen permite comprobar que, una vez han aparecido las arritmias, el tratamiento con UR-12460 o MPG no inhibe la aparición de TV ni en la oclusión ni en la desoclusión. Es curioso comprobar que, mientras que en el protocolo de valoración de arritmias (6 min de isquemia y 10 min de reperfusión) se producen episodios de FV en la desoclusión, en este protocolo más largo no ocurre así. Aparentemente se produce una mayor alteración electrofisiológica después de una isquemia de 6 min que después de una de 20 min. Una posible explicación de este hecho sería que es más perjudicial para el corazón, hablando en términos de arritmogénesis, el reinstaurar el flujo coronario inmediatamente después de que hayan tenido lugar las primeras arritmias, que hacerlo después, cuando éstas ya han finalizado y el corazón parece entrar en una fase de estabilización electrofisiológica.

En lo que respecta al estudio del infarto propiamente dicho, hay que hacer especial mención a la valoración del área de riesgo. La extraordinaria homogeneidad presentada, tanto entre grupos diferentes, como dentro del mismo tratamiento, apoya la utilización de la rata como animal de elección en este modelo ya que, como se ha mencionado, las coronarias de la rata son arterias terminales, con prácticamente ninguna circulación colateral. Esto permite obtener zonas muy homogéneas sobre las que valorar el efecto de los tratamientos utilizados. Las ratas del grupo control de manipulación, que en el protocolo de valoración de arritmias no mostraron alteraciones electrofisiológicas, muestran en este otro protocolo una cierta área de infarto (19%) atribuible a la manipulación quirúrgica. Como el grupo control presenta un 66% de infarto, podemos asumir que un 47% de la lesión corresponde a la acción de la isquemia-reperfusión miocárdica propiamente dicha. De la misma forma podríamos deducir que el área "real" de infarto de los grupos tratados con UR-12460 y MPG sería de 32 y 25%, respectivamente. Ambos tratamientos se han mostrado eficaces en la reducción del infarto, aunque la MPG lo es con mayor grado de significación. Ocurre a la inversa que con el protocolo de valoración de arritmias, en donde el UR-12460 mostraba más eficacia que la MPG. La mayor o menor implicación de los radicales libres y el PAF en la génesis de arritmias y en la génesis del infarto es un tema que suscita bastante debate. Así, en nuestras condiciones experimentales, los radicales podrían tener más peso en los mecanismos causantes de lesión miocárdica con respecto a la génesis de arritmias. Como ya se ha dicho, ninguno de los dos tratamientos utilizados inhibe la aparición de arritmias. Sin embargo, el hecho de que ambos tratamientos inhiban la lesión

miocárdica también sugiere que los mecanismos arritmogénicos y los generadores de infarto pudieran ir por caminos independientes.

El primer estudio que destacó el importante papel del PAF en la patogénesis de la isquemia miocárdica fue el de Leprán y Lefer, en 1985. Estos autores vieron que la administración de una pequeña cantidad de PAF en corazón de gato anestesiado agravaba considerablemente los efectos de la isquemia miocárdica aguda. Uno de los mecanismos por el cual el PAF podría ser clave en estos procesos implicaría los fenómenos de agregación plaquetaria. Las plaquetas agregadas por acción del PAF liberan TXA₂, el cual es un potente vasoconstrictor que sería responsable de la reducción del flujo sanguíneo en un tejido ya isquémico. La formación de microtrombos también podría ser un factor importante en el empeoramiento de la irrigación en las zonas comprometidas. Sin embargo, como ya se comentó anteriormente, la ausencia de receptores del PAF en plaquetas de rata y ratón, llevaría a considerar otras hipótesis en estas especies. Por otra parte, cada vez hay más evidencia de que la reperfusión del tejido isquémico da lugar a una respuesta inflamatoria aguda en la cual los neutrófilos jugarían de nuevo un papel central (Entman y cols., 1991). Se ha demostrado que la inhibición farmacológica de los neutrófilos reduce la lesión por isquemia-reperfusión (Romson y cols., 1982, Simpson y cols., 1987). Los neutrófilos pueden promover el daño celular mediante la liberación de radicales superóxido, enzimas proteolíticas y citoquinas. En nuestros estudios *in vivo*, el aumento de la actividad mieloperoxidasa en el tejido miocárdico de los animales sometidos a isquemia-reperfusión indica que hay una acumulación de neutrófilos a ese nivel. La inhibición de esta actividad por parte del UR-12460 sugiere que el PAF puede tener un papel importante en la activación y adhesión de los neutrófilos.

Algunas hipótesis muy extendidas sobre el origen de la lesión son la del calcio y la de los radicales libres. La primera sugiere que la isquemia provoca un defecto en la capacidad de la célula para regular el calcio, de forma que se acumulan cantidades tóxicas de este ión y se produce necrosis celular. La hipótesis de los radicales libres propone que el daño sería causado por los radicales liberados durante la isquemia-reperfusión y, todavía más, que serían éstos a su vez los responsables de la entrada de calcio en las células. Los radicales libres pueden provocar el daño celular a tres niveles: a nivel de lípidos, por peroxidación de ácidos grasos y alteración de la permeabilidad celular; a nivel de proteínas, por la oxidación de grupos sulfhidrilo, dando lugar

a activación y/o desactivación de enzimas; y a nivel de ADN, por escisión de las cadenas y deterioro del metabolismo del NAD y del ATP.

Los estudios *in vitro* se han realizado *a posteriori* con el fin de valorar el papel de los componentes sanguíneos en la génesis del infarto por isquemia-reperfusión. Partiendo de la base de que las células sanguíneas y, en particular, los neutrófilos, juegan un papel importante en la génesis de la lesión por isquemia-reperfusión, nos planteamos si era o no correcto utilizar un modelo *in vitro*, en el cual no hay presencia de sangre, para valorar el infarto. Por este motivo, decidimos comparar las lesiones en corazones sometidos a los mismos tiempos de isquemia-reperfusión, en presencia o no de componentes sanguíneos. Los autores que utilizan modelos *in vitro* perfundiendo el corazón con soluciones coloidales convencionales, valoran básicamente alteraciones del ritmo y la función cardíaca (flujo coronario, presión del ventrículo izquierdo, presión telediastólica, etc.), existiendo varios estudios sobre el efecto de los antagonistas del PAF sobre estos parámetros funcionales (Koltai y cols., 1989; Vleeming y cols., 1992). Hay pocos autores que utilicen el método *in vitro* para valorar infartos y, cuando lo hacen, es añadiendo elementos sanguíneos (neutrófilos, plaquetas, etc.) al perfusado (Shandelya y cols., 1992; Katoh y cols., 1993; Yang y Mehta, 1994). El análisis del infarto, si se realiza, lo llevan a cabo mediante técnicas histológicas (Shandelya y cols., 1992). No hemos hallado en la literatura ningún estudio en el que se utilice la clásica técnica de la tinción por cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) para valorar infartos obtenidos *in vitro*.

La puesta a punto de nuestro modelo de isquemia-reperfusión en corazón aislado de rata, con incubación posterior con TTC, permite aunar en un mismo experimento, y bajo condiciones idénticas, la valoración de la zona de infarto y la alteración funcional del corazón. La mayoría de investigadores utilizan pruebas independientes, con el método de Langendorff por un lado, y animal anestesiado por otro, pero eso supone utilizar condiciones muy diferentes para cada tipo de experimento. Hay que comentar, por otra parte, que en nuestro modelo de isquemia-reperfusión *in vitro* estamos realizando una isquemia global y esto no se ajusta tanto a la realidad clínica, ya que es obvio que nunca se produce una isquemia de este tipo. Creemos que sería interesante perfeccionar nuestro modelo realizando isquemias regionales *in vitro* análogamente a como se ha hecho *in vivo*, es decir, por ligadura de la arteria coronaria descendente izquierda.

La primera observación que se desprende de nuestro estudio es la existencia de marcadas diferencias, dentro de un mismo protocolo, entre corazones isquémicos que han recibido sangre diluida (controles con sangre) y los que han recibido el perfusado de Krebs-Henseleit exclusivamente (controles sin sangre). Esto se hace muy evidente a partir de los 15 min de isquemia y 15 de reperfusión, con diferencias extremadamente significativas entre ambos grupos. Estas diferencias apoyan la teoría de que las células sanguíneas y, en particular, los neutrófilos, son pieza clave en la génesis de los infartos. Los neutrófilos son capaces de liberar sustancias citotóxicas, como radicales libres o el propio PAF. Es posible que también las plaquetas jueguen un papel importante aunque, como ya se ha comentado anteriormente, su importancia con relación al PAF no pueda evaluarse en la rata. De manera algo sorprendente, sin embargo, no se ha visto en los experimentos *in vitro* un aumento en la actividad mieloperoxidasa en los corazones perfundidos con sangre.

No debe descartarse la liberación de sustancias citotóxicas por parte de células no sanguíneas, como por ejemplo células endoteliales y cardiomiocitos. Estas células pueden liberar también PAF y radicales libres, a los cuales podría atribuirse ese porcentaje de lesión inferior al 15% obtenido en nuestros experimentos en los grupos control sin sangre. Algunos autores han sugerido que el PAF sintetizado por las células endoteliales no se libera, sino que permanece en su mayor parte asociado a las células (Lewis y cols., 1988). Salinas y cols. (1995), en un estudio en septo aislado de conejo, añaden metanol al perfusado durante la reperfusión para eluir el PAF que pudiera haber quedado adherido, pero no consiguen detectarlo en el efluente, por lo que concluyen que el PAF no se genera endógenamente en este modelo en ausencia de células sanguíneas. Esto se contradice con otros autores que sí han demostrado la presencia de PAF en efluente de corazón aislado (Berti y cols., 1990). Estas discrepancias pudieran explicarse por las diferencias en los métodos experimentales y/o la manera de determinar el PAF.

Otra observación interesante al comparar los infartos provocados en el grupo control con sangre y en el grupo control sin sangre es que el alargamiento del tiempo de isquemia y reperfusión sólo empeora el infarto en aquellos corazones en los que hay presencia de células sanguíneas. En los corazones sin sangre, el tiempo no parece influir bajo nuestras condiciones, por lo que podría especularse que la falta de oxígeno tiene un papel poco destacado en la patogénesis del infarto en este modelo. No podemos asegurar que esto sea así con tiempos más

largos, puesto que no hemos realizado ningún experimento con tiempos de isquemia y reperfusión superiores a los 20 min. Asumiendo que la situación de anoxia no sea suficiente por sí sola como para causar el infarto, la introducción de células sanguíneas podría representar un sistema de amplificación de la anoxia, puesto que en su presencia se producen infartos mucho mayores que los grupos control sin sangre, dependientes además del tiempo de isquemia-reperfusión.

Aunque este protocolo, como su análogo *in vivo*, no se diseñó para la valoración de alteraciones electrocardiográficas, el examen de los registros de presión ventricular permite apreciar la ausencia de episodios arrítmicos patentes, tanto en los corazones control sin sangre como en los control con sangre. Algunos autores sugieren que la susceptibilidad del tejido isquémico a las arritmias puede deberse en parte a la dispersión de la refractariedad que ocurre entre las zonas isquémicas y las no isquémicas (Bellemin-Baurreau y cols., 1994), y por ello utilizan modelos *in vitro* pero con ligadura de la arteria coronaria, provocando una isquemia regional en vez de global. Es decir, hay una interacción electrofisiológica entre tejido isquémico y no isquémico. Si esto es realmente cierto, es de esperar que en un modelo de isquemia global no se produzcan arritmias, ya que todo el tejido será isquémico. Nuestros resultados coincidirían con esta teoría. Otros autores, sin embargo, afirman que la susceptibilidad a las arritmias es idéntica tanto si hay isquemia regional como global (Tosaki y cols., 1993). Estas discrepancias pudieran deberse a diferencias metodológicas e incluso a la utilización de diferentes especies (normalmente rata y conejo) cuya anatomía coronaria, como ya se ha indicado anteriormente, sigue patrones distintos.

Además del área de infarto se han valorado otros parámetros relacionados básicamente con la contractibilidad miocárdica. Las ratas control sin sangre presentan una disminución del flujo coronario, presión del ventrículo izquierdo y producto frecuencia-presión, un ligero descenso de la presión sistólica, y un aumento de la presión telediastólica. Todas estas alteraciones son más acusadas cuanto mayor es el tiempo de isquemia-reperfusión, lo cual puede indicar que, a nivel de funcionalidad mecánica, el tiempo de anoxia sí puede ser importante en este modelo. A pesar de todas estas alteraciones, la frecuencia cardíaca no varía en ninguno de los protocolos estudiados.

Cuando se añade el perfusado de sangre diluida, todos los parámetros mencionados anteriormente empeoran significativamente con respecto a sus correspondientes controles sin sangre (sobre todo en los dos protocolos más largos). Es interesante comprobar que en el protocolo 20/20, la frecuencia cardíaca cae hasta valores cercanos a cero. De hecho, en la práctica, la mayoría de corazones dejan de latir. Cabría preguntarse si este paro cardíaco es el responsable directo del infarto, ya que la ausencia de latido impediría la correcta irrigación del miocardio. Sin embargo, en el protocolo 15/15, los corazones presentan un área de infarto muy similar al 20/20 y en ninguno de ellos se ha producido alteración de la frecuencia cardíaca. Esto sugiere que la parada cardíaca es consecuencia más que causa de infarto en este modelo de isquemia-reperfusión.

El flujo coronario depende directamente de la frecuencia cardíaca. En el protocolo 20/20, dado que la frecuencia cardíaca es prácticamente cero, es lógico que aparezcan flujos coronarios muy bajos. Sin embargo, de los resultados del protocolo 15/15 se desprende que frecuencias cardíacas normales pueden corresponder a disminuciones evidentes del flujo coronario, por lo que en este caso se podría descartar la bradicardia como causa primaria de la disminución del flujo.

Para valorar la eficacia del UR-12460 en este modelo, hemos elegido el protocolo 20/20, el mismo utilizado en el estudio *in vivo*. Excepto la presión telediastólica, todos los parámetros mejoran con respecto al grupo control con sangre. La presión telediastólica es un parámetro extremadamente sensible para indicar daño miocárdico isquémico (Nonow y Udelson, 1992; Ferdinandy y cols., 1992). Ya que en los corazones tratados hay cierto grado de lesión, es posible pensar que este parámetro se reduzca significativamente sólo en aquellos corazones en los cuales la lesión sea prácticamente inexistente.

Además de los parámetros mencionados, tanto el UR-12460 como la MPG disminuyen notablemente el área de infarto. Estos resultados sugieren que, tanto el antagonismo del PAF como la acción captadora de radicales libres, están implicados en la disminución del área de infarto y, en general, en la mejoría de la función miocárdica durante la reperfusión. La

implicación del PAF y los radicales libres en la lesión por isquemia-reperfusión se ha comentado ya al hablar del método *in vivo*. Sin embargo, en lo que respecta a la situación *in vitro*, es interesante añadir que se ha demostrado la liberación de ambos mediadores coincidiendo con el momento de la reperfusión en corazón aislado (Garlick y cols., 1987; Montrucchio y cols., 1989).

SHOCK ENDOTÓXICO.

La administración de endotoxina proveniente de *Escherichia coli* reproduce, en la rata, los efectos característicos de los estados de shock, como por ejemplo la hipotensión y la trombocitopenia. El hecho de que la administración intravenosa de PAF también reproduzca el estado de shock (Bessin y cols., 1983; Doebber y cols., 1985), y de que su nivel plasmático se encuentre aumentado en animales con shock endotóxico (Iñarrea y cols., 1985; Chang y Feddersen, 1987; Feuerstein y cols., 1990), hizo pensar que el PAF podría tener una importancia sustancial en este tipo de shock.

En este trabajo se han estudiado diversos "marcadores" del shock endotóxico, es decir, una serie de alteraciones muy características que tienen lugar tras la administración de endotoxina (Giral y cols., 1996). Dichos marcadores son, además de la mortalidad inducida por la propia endotoxina, la hipotensión, la leucopenia, la trombocitopenia, la hemoconcentración, la coagulación intravascular diseminada, y algunos cambios bioquímicos y enzimáticos.

El perfil hipotensor puede variar bastante según el serotipo de endotoxina administrado. Nosotros hemos estudiado básicamente endotoxinas de *Escherichia coli*, pero también hemos probado lipopolisacáridos de otras bacterias Gram negativas como *Salmonella typhosa* (datos no mostrados), y su perfil hipotensor es diferente a los dos tipos estudiados de *E. coli*. El serotipo

0111:B4 es uno de los más referenciados en la literatura sobre el tema, y por tanto es el que más hemos utilizado en los estudios sobre hipotensión. Esta endotoxina, como ya se ha descrito en el apartado de resultados de esta tesis, provoca dos fases consecutivas de hipotensión. Muchos autores hablan de una fase inmediata y de una fase tardía en la hipotensión inducida por endotoxina. En un protocolo de tipo reversor, los compuestos se administran justo en el momento en que comienza a tener lugar la fase tardía de la hipotensión. En este protocolo, el UR-12460 a 1 mg/kg i.v. se ha mostrado efectivo en la inhibición de dicha fase tardía, consiguiendo incluso que los valores de presión se mantengan bastante elevados hasta el final del experimento. Otros compuestos probados, como el WEB-2086 o el CV-6209, no se han mostrado tan efectivos como el UR-12460 aunque también revierten la fase tardía de hipotensión. En el protocolo preventivo, ninguno de los antagonistas del PAF estudiados ha sido capaz de bloquear, ni total ni parcialmente, la fase inmediata de la hipotensión. Sin embargo, el UR-12460 inhibe de nuevo totalmente la segunda fase, manteniéndose la presión en valores prácticamente normales. Es posible que, en la primera fase, el PAF juegue un papel menos relevante que otros mediadores. Se ha sugerido que la hipotensión inducida por endotoxina está causada por la activación de la isoforma constitutiva calcio-dependiente de la NO sintasa (NOS) y también por la inducción de la isoforma inducible calcio-independiente (Szabó y cols., 1993a). El PAF mismo es capaz de estimular la síntesis de NO a través de ambas isoformas (Szabó y cols., 1993b). El sistema quinina-bradiquinina también está implicado en las fases inmediatas de la hipotensión inducida por endotoxina, puesto que se han encontrado niveles elevados de quininas circulantes generadas por las células endoteliales, casi inmediatamente tras la administración de endotoxina (Katori y cols., 1989; Fleming y cols., 1992). En nuestras condiciones experimentales, las quininas son importantes probablemente en la inducción de la hipotensión inmediata (en 1 min), mientras que la producción de PAF inducida por endotoxina y la subsiguiente estimulación de la síntesis de NO pudieran ser relevantes en la segunda fase de hipotensión sostenida. La ausencia de efecto con el pretratamiento con WEB-2086 a 1 mg/kg i.v. comparada con la reversión de la hipotensión conseguida por dicho producto a la misma dosis cuando se administra a los 60 min de la endotoxina, es un punto a favor del PAF en la fase tardía de la hipotensión inducida por LPS.

Por otra parte, la hipotensión inmediata ha sido atribuida a una acción directa del lipopolisacárido sobre las células endoteliales (Harlan y cols., 1983; Meyrick y cols., 1986). La

incubación con lipopolisacárido de cultivos celulares de células endoteliales de arteria pulmonar bovina, induce una serie de cambios en la morfología celular a los pocos minutos, pudiendo llevar a la muerte de las células en varias horas (Meyrick y cols., 1986). Los cambios más relevantes observados durante esta primera fase son alteraciones en las uniones intercelulares. El aumento de los espacios intercelulares produce un incremento en la permeabilidad vascular, lo que hemos observado en varios tejidos de rata incluso a los 15 min tras la administración de LPS, aunque la extravasación máxima se obtuvo tras 1 h (Balsa y cols., 1997). Algunos antagonistas del PAF, como el CV-3988 o el SRI 63-441, disminuyen los cambios en la permeabilidad vascular inducidos por LPS (Chang y cols., 1987). En nuestro estudio, las diferencias en potencia observadas en los diferentes órganos tras la administración del UR-12460, y la falta de efecto del WEB-2086 pueden explicarse, no sólo por sus diferentes potencias, sino también por sus diferentes propiedades farmacocinéticas, como puede ser su distribución tisular.

La hemoconcentración, detectable clínicamente por un aumento del valor hematócrito, es también un marcador del aumento de la permeabilidad vascular. En estudios previos hemos visto que, tanto el PAF como la endotoxina, causan un aumento del hematócrito, y que el incremento máximo se alcanza más rápidamente tras la administración de PAF (un 25% a los 5 min) que tras la administración de LPS (un 15% a los 45 min). Estos resultados están de acuerdo con los que sugieren que este menor efecto del LPS es debido a la liberación gradual de un mediador endógeno, y que este mediador podría ser el PAF (Floch y cols., 1990). Esta hipótesis viene apoyada por la observación de un incremento tiempo-dependiente de los niveles plasmáticos de PAF tras la inyección de LPS en ratas (Doebber y cols., 1985). Además, algunos antagonistas del PAF (como el RP 59227 y el SRI 63-441) son capaces de inhibir la hemoconcentración inducida por LPS (Floch y cols., 1990; Lang y Bagby, 1990). En nuestro experimento, el UR-12460 inhibe completamente el aumento del valor hematócrito observado a los 45 min de la administración de LPS, lo cual subraya aún más el papel del PAF en el incremento de la permeabilidad vascular causado por LPS.

Entre las alteraciones hematológicas causadas por la administración de endotoxina se encuentran las variaciones en el número de leucocitos circulantes. En nuestras condiciones

experimentales hemos visto una leucopenia transitoria temprana a los 5 min de haber administrado el LPS, que posteriormente se recupera. El papel de los antagonistas del PAF en la leucopenia inducida por endotoxina no está claro. Por ejemplo, la leucopenia no es inhibida por la administración de CV-3988, BN-52021 o FR-900452 en modelos de endotoxemia en rata (Chang y cols., 1987), cobayo (Adnot y cols., 1986) o conejo (Okamoto y cols., 1986), ni tampoco por los antagonistas probados por nosotros. La leucopenia, como ya se comentó al hablar de la isquemia-reperfusión miocárdica, podría ser el reflejo de un proceso de activación y adhesión leucocitaria. Es sabido que la endotoxina regula la adhesión leucocitaria tanto *in vitro* (Thomas y cols., 1988) como *in vivo* (Svensjö y cols., 1990).

La administración de LPS en ratas induce una serie de cambios que se asemejan a los del síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID) (Kawamura y cols., 1993). Niveles bajos de endotoxina circulante pueden inducir la activación de la coagulación, la cual está mediada por citoquinas, en particular por el $\text{TNF}\alpha$. Este efecto parece ser dependiente de la activación de la vía extrínseca de la coagulación sanguínea (van Deventer y cols., 1990). El PAF es capaz de reproducir por sí mismo algunos de los cambios inducidos por LPS sobre la coagulación (Imura y cols., 1986). El PAF activa el sistema de la coagulación a través de la generación de factor tisular (Kawamura y cols., 1993), y el sistema fibrinolítico a través de la liberación de activador del plasminógeno tisular (Emeis y Kluft, 1985). Varios autores han sugerido que los antagonistas del PAF pueden ejercer efectos beneficiosos en la CID (Imura y cols., 1986; Kawamura y cols., 1993). En nuestro estudio, tanto el UR-12460 como el WEB-2086 atenuan el incremento del tiempo parcial de tromboplastina activada, que es un marcador de la CID. Ni la trombocitopenia inmediata (5 min) ni la tardía (45 min) han sido inhibidas por ninguno de los antagonistas del PAF probados. La trombocitopenia inducida por LPS en ratas no está directamente mediada por PAF, puesto que las plaquetas de rata no tienen receptores de PAF específicos (Iñarrea y cols., 1984). Parece ser que el PAF provoca la trombocitopenia en ratas a través de la producción de $\text{TNF}\alpha$ (Rabinovici y cols., 1991b), aunque también podría ser debida a la incorporación de las plaquetas a los trombos durante el proceso de coagulación sanguínea (Kawamura y cols., 1993).

Tras la administración de LPS, la concentración de glucosa en sangre se incrementa a medida que la producción de glucosa sobrepasa la captación de la misma por parte de los tejidos.

El incremento en los niveles de glucosa plasmática es la consecuencia de mayores concentraciones de catecolaminas y/o glucagon, que se liberan a partir de la activación simpática. Algunos autores han especulado que la activación del sistema simpático se produciría como respuesta compensatoria a la hipotensión inducida por LPS (Lang y Bagby, 1990). El PAF también induce el incremento de las catecolaminas plasmáticas y el glucagon (Lang y cols., 1988). El pretratamiento con WEB-2086 en ratas conscientes que reciben LPS de *Salmonella enteritidis* bloquea la hipotensión, pero no el incremento de las catecolaminas, sugiriendo que hay otros mecanismos implicados, además de la hipotensión, en la activación simpática que precede la hiperglicemia y la hiperlactacidemia (Qi y Jones, 1990). En nuestro estudio, el UR-12460 inhibe el incremento de los niveles sanguíneos de glucosa y lactato inducido por LPS. Este resultado apoya la evidencia del papel del PAF en la hiperglicemia e hiperlactacidemia inducidas por LPS.

Las alteraciones producidas por el LPS a nivel del metabolismo lipídico quedan reflejadas en la disminución de los niveles de colesterol en plasma. Se ha visto que dosis bajas de PAF disminuyen la colesterolemia, lo cual parece estar asociado a un transporte acelerado de lípidos a las células. Sin embargo, dosis mayores de PAF tienden a elevar la concentración plasmática de colesterol, sugiriendo una alteración en los mecanismos de transporte lipídico. Aunque la administración del antagonista del PAF CV-6209 es capaz de inhibir dicho aumento, el mecanismo por el cual el PAF interviene en la hipercolesterolemia inducida por LPS sigue siendo poco claro (Mimura y cols., 1991). En nuestro estudio, la administración de LPS provoca una disminución en los niveles de colesterol, indicando quizás que los niveles de PAF son relativamente bajos. Si efectivamente los niveles de PAF no son importantes en este contexto, sería lógico pensar que la administración de un antagonista no conseguiría producir una recuperación de la colesterolemia. De hecho, el UR-12460 no se ha mostrado efectivo en este estudio.

La endotoxemia se asocia a un aumento significativo en la actividad sérica de la aspartato-aminotransferasa (AST) y la alanina-aminotransferasa (ALT), y en los niveles de bilirrubina, marcadores todos ellos de disfunción hepática. Tanto ALT como AST son marcadores de lesión del parénquima hepático, mientras que la bilirrubina es un marcador específico del desarrollo de colestasis (Thiemermann y cols., 1995). Se sabe que el transporte de

bilirrubina se encuentra disminuido, y que esta disminución no está causada por un descenso en la conjugación (Roelofsen y cols., 1994). Parece ser que hay una reducción en la captación de bilirrubina a nivel sinusoidal, proceso que puede verse agravado posiblemente por la disminución en la secreción. Estos hallazgos obtenidos en la rata son muy similares a los obtenidos en pacientes con sepsis que muestran hiperbilirrubinemia (Franson y cols., 1985; Pirovino y cols., 1989). La administración de UR-12460 atenúa el aumento de bilirrubina y de ALT. La disminución del AST, que es un enzima no específico de lesión hepática, no llega a ser significativa.

Por otra parte, el aumento de los niveles de creatinina y urea en plasma de ratas que han recibido LPS es un claro indicador de insuficiencia renal. La creatinina, concretamente, es un marcador de la reducción de la tasa de filtración glomerular, mientras que el aumento de urea indica una alteración en la función excretora del riñón y/o un aumento del catabolismo. El tratamiento con UR-12460 disminuye significativamente ambos marcadores. Tanto la insuficiencia renal como la hepática se engloban dentro del llamado fracaso multiorgánico, que puede considerarse como un fallo secuencial de diversos sistemas u órganos, que puede conducir a la muerte. La efectividad de los antagonistas del PAF da idea de que este mediador puede estar implicado en los mecanismos de origen de la insuficiencia renal y/o hepática.

El incremento en la actividad plasmática de la lactato deshidrogenasa (LDH) tras la administración de LPS, considerada como marcador de daño tisular, es inhibida en nuestros estudios tanto por el UR-12460 como por el WEB-2086. El origen celular de la LDH en el shock endotóxico puede ser múltiple (como reflejo de un proceso de fracaso multiorgánico), ya que el LPS provoca un extenso daño tisular. Por tanto, la efectividad de los antagonistas puede depender de forma decisiva de su afinidad por diferentes tejidos, en una forma similar a lo que ocurre en los estudios de permeabilidad. El WEB-2086 inhibe además el incremento en fosfatasa ácida (ACP). Esta actividad ACP por encima de lo normal observada en las ratas que han recibido LPS indica activación lisosomal y, en nuestras condiciones, está asociada principalmente a inflamación prostática (Dra. Balsa, comunicación personal).

Los antagonistas del PAF no sólo mejoran muchos de los síntomas inducidos por la administración de LPS sino que también protegen contra la mortalidad. Existe una buena

correlación lineal entre la actividad antagonista del PAF *in vivo* (test de mortalidad por PAF) y la actividad antagonista encontrada en la prueba de mortalidad inducida por LPS en ratón. Estos datos refuerzan el papel del PAF como un mediador clave en la cascada de acontecimientos que dan lugar a la mortalidad tras la administración de LPS.

Las discrepancias existentes entre los buenos resultados obtenidos en modelos experimentales y la falta de eficacia a nivel clínico, ya comentada anteriormente, podrían explicarse por el hecho de que los animales son sujetos más homogéneos, sanos y jóvenes que los pacientes con sepsis, lo cual dificulta la extrapolación de los resultados. Es posible que tenga una gran relevancia el diferente estado inmunológico de cada paciente en concreto y el balance entre los niveles de mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios, de forma que la administración del tratamiento en un paciente con un estado predominantemente antiinflamatorio podría ser no sólo ineficaz sino incluso perjudicial.

SHOCK HIPOVOLÉMICO HEMORRÁGICO.

El estudio del efecto de los antagonistas del PAF en el modelo de shock hemorrágico lo hemos enfocado sobre dos parámetros: la mortalidad y la evolución de la presión arterial como indicadora del estado de shock. Como ya se mencionó en los apartados de metodología y resultados, se utilizaron inicialmente dos volúmenes de extracción de sangre pero se eligió el de 3 mL por provocar un estado de shock mucho menos grave que el de 6 mL, permitiendo que al finalizar el experimento (120 min) sólo haya una mortalidad del 50% aproximadamente en el grupo control.

El shock hemorrágico experimental es una forma letal de shock que se ajusta bastante bien a los acontecimientos que tienen lugar en el estado irreversible de shock hemorrágico humano (Hess y cols., 1983). De hecho, en la mayoría de estudios realizados con este modelo, los animales control mueren en 20-30 min desde el final de la hemorragia, incluso aunque se

inyecte una cantidad de suero fisiológico idéntica a la de sangre extraída. Se describe la presencia de dos fases: una temprana (compensada) y otra más tardía (descompensada). Si la hemorragia no es lo bastante importante y la presión arterial no disminuye por debajo de un límite crítico, se produce un shock compensado o no progresivo, poniéndose en marcha mecanismos compensatorios que pueden llevar a la recuperación del animal o del paciente. Cuando se sobrepasa ese límite crítico, se produce un shock progresivo, produciéndose un deterioro circulatorio general e instaurándose un círculo vicioso que lleva a la muerte. Cuando se llega a esta fase irreversible del shock, no se puede salvar la vida del animal o del paciente ni siquiera administrando un volumen de sangre idéntico al que se ha perdido.

Los autores que utilizan el método del shock hipovolémico, en general, no realizan extracciones de volumen constante sino que provocan pequeñas hemorragias intermitentes con el fin de llegar a unos límites previamente fijados y que, en la rata, suelen establecerse entre 20 y 30 mmHg. En nuestro caso hemos extraído un volumen constante pero hemos obtenido unos valores de presión muy homogéneos (42 ± 0.9 mmHg, $n=114$). En la bibliografía consultada, todos los autores realizan unas hemorragias que suponen entre un 40 y un 50% de la volemia de las ratas de ese peso. Prácticamente todos los animales control mueren antes de los 30 min cuando la presión arterial se ha hecho descender hasta 20-25 mmHg. En nuestro caso, la extracción de 6 mL de sangre se ajustaría bastante a estos protocolos mencionados, es decir, a una reducción del 40% de la volemia, y a un tiempo medio de supervivencia de 25 ± 7 min, muy similar a los valores de la bibliografía. Sin embargo, a la vista de la controversia existente sobre la efectividad de los antagonistas del PAF en este modelo de shock, decidimos disminuir la gravedad extrayendo 3 mL de sangre, lo que supone un 25% aproximadamente de la volemia, y que permite, al disminuir la mortalidad, analizar de manera más fiable la evolución de la presión arterial media.

Algunos autores utilizan modelos en los que la extracción de sangre va acompañada de reposición de fluidos, bien con la propia sangre del animal, bien con soluciones coloidales o cristaloides. El hecho de reinfundir sangre o soluciones coloidales puede jugar un papel importante. Stahl y colaboradores (1988) demuestran una buena actividad por parte del CV-6209 en un modelo en rata que incluye reinfusión. En un experimento con un antagonista similar, aunque menos potente, el CV-3988, Toth y Mikulascheck (1986) no observan mejoras en un

protocolo sin reposición de flúidos. Es posible que otros parámetros puedan influir en la reversión del shock hemorrágico, como por ejemplo el tipo de anestesia utilizado. Algunos anestésicos, como el pentobarbital, disminuyen de forma marcada la capacidad de los animales para compensar la hemorragia (Simon y Olsen, 1969).

Hay cierta controversia sobre el papel del PAF en los estados de shock hipovolémico. Se sugiere incluso que el PAF no estaría implicado en los mecanismos patológicos del shock hemorrágico (Duncan y cols., 1986; Toth y Mikulascheck, 1986; Barefoot y cols., 1987). Por otra parte, algunos autores hacen especial hincapié en la participación de otros mediadores, como por ejemplo el factor depresor del miocardio (MDF) (Zingarelli y cols., 1994). De hecho, el MDF fue descubierto en el plasma de gatos que habían sido sometidos a un shock hemorrágico (Brand y Lefer, 1966). Como ya se comentó al hablar del shock por oclusión de las arterias esplácnicas, el PAF alcanza unos niveles plasmáticos máximos en fases relativamente tempranas del shock y, a medida que estos niveles comienzan a disminuir, se incrementan los de otros mediadores (probablemente estimulados a su vez por el propio PAF) como el MDF o el TNF (Zingarelli y cols., 1992). Parece ser que el MDF se libera principalmente a nivel pancreático (Lefer, 1970). La hipotensión producida durante la hemorragia hace que se instaure un proceso de hipoxia esplácnica que estimula la ruptura lisosomal pancreática y la activación de enzimas. Como consecuencia de ello, se liberan grandes cantidades de enzimas proteolíticos en el citoplasma de las células acinares pancreáticas, que estimulan a su vez la formación de MDF.

Es posible que la administración de los antagonistas pueda contrarrestar los efectos perjudiciales del PAF en fases tempranas del shock hemorrágico, como así ocurre en nuestras condiciones (aumento de la presión arterial en los primeros minutos). Sin embargo, bien porque se entra en un estado de shock progresivo, bien porque comienzan a actuar otros mediadores más importantes, los antagonistas no muestran efecto en fases más tardías en nuestro modelo de shock hipovolémico y, a la larga, no son capaces de disminuir la mortalidad provocada por la hemorragia.

En resumen, se ha estudiado la actividad anti-PAF del UR-12460 comparado con otros compuestos utilizados como patrones de referencia, y se ha probado en modelos de shock en distintos sistemas experimentales. Puede decirse que, en general, el UR-12460 es activo, al menos parcialmente, en varios modelos de shock, reforzando la idea de la participación importante del PAF en estos procesos de etiologías tan diversas. Sin embargo, el hecho de que este compuesto no tenga efecto sobre varios de los marcadores de shock estudiados hace pensar que el futuro de un posible tratamiento del shock pasaría por la administración conjunta de diferentes sustancias, dirigidas cada una a los diferentes mediadores del shock que, además del PAF, intervienen en mayor o menor grado en su etiopatogenia.

V. CONCLUSIONES

1.- Las pruebas realizadas en nuestro laboratorio demuestran que el compuesto UR-12460 es un antagonista del PAF potente y selectivo, tanto *in vitro* como *in vivo*.

2.- El UR-12460 presenta actividad en modelos de shock anafiláctico activo en el ratón y en el cobayo. Además, para una serie de antagonistas del PAF, hay una buena correlación entre la inhibición de la mortalidad inducida por PAF y la mortalidad inducida por shock anafiláctico activo en el ratón, lo cual indica claramente que el PAF está involucrado en estos procesos. Sin embargo, la ineficacia del UR-12460 en el modelo de anafilaxia pasiva sugiere una menor importancia relativa del PAF con respecto a otros mediadores como la histamina.

3.- Los resultados obtenidos en el modelo de isquemia-reperfusión esplácnica en la rata indican que la administración de antagonistas del PAF, para ser efectiva, debe realizarse justo tras la desoclusión, es decir, cuando los niveles de PAF son más elevados. Además, durante la oclusión, la deficiente irrigación intestinal puede impedir que los antagonistas actúen a nivel local, disminuyendo su efectividad. El UR-12460 y el WEB-2086 se han mostrado parcialmente efectivos en este modelo de shock esplácnico, inhibiendo significativamente la trombocitopenia y la mortalidad.

4.- En el modelo de isquemia miocárdica en la rata, con oclusión de 6 minutos y perfusión de 10, el compuesto UR-12460 produce una disminución de las taquicardias ventriculares de la oclusión y, al igual que el antiarrítmico quinidina, disminuye la aparición de fibrilación ventricular en la perfusión. Esto apoya el papel del PAF en la arritmogénesis por isquemia-reperfusión.

5.- En el modelo de isquemia miocárdica con oclusión y perfusión de 20 minutos no se han observado episodios de fibrilación ventricular durante la fase de perfusión. La ausencia de fibrilación cuando la perfusión se realiza en un momento en que el corazón no presenta arritmias (a pesar de un tiempo de

oclusión mayor) sugiere que el momento de reinstauración del flujo coronario es un factor clave en la arritmogénesis inducida por la isquemia-reperusión miocárdica.

6.- La oclusión y reperusión coronaria en el corazón aislado de rata, con incubación posterior con cloruro de trifeniltetrazolio, permite aunar en un mismo experimento, y bajo condiciones idénticas, la valoración de la zona de infarto y la alteración funcional del corazón. Por otra parte, la utilización de la rata permite obtener una extraordinaria homogeneidad entre las áreas de riesgo de todos los animales.

7.- Las marcadas diferencias observadas entre los corazones isquémicos que han recibido sangre diluida y los que no, sugieren que las células sanguíneas son pieza clave en la génesis de los infartos y en el deterioro del funcionalismo cardíaco en el modelo de isquemia-reperusión miocárdica *in vitro*.

8.- La ausencia de una relación directa entre el tiempo de isquemia-reperusión y la gravedad del infarto, en ausencia de sangre, sugiere que la situación de anoxia no es un factor determinante en la génesis del infarto en este modelo. Por el contrario, sí existe relación entre el tiempo de isquemia-reperusión y las alteraciones de la función mecánica. La introducción de células sanguíneas podría representar un sistema de amplificación del daño causado por la anoxia.

9.- Los resultados obtenidos con el compuesto UR-12460 y el antioxidante mercaptopropionilglicina sugieren que tanto el antagonismo del PAF como la acción captadora de radicales libres pueden ser útiles en la disminución del infarto y, en general, en la mejoría de la función miocárdica durante la reperusión y en la disminución de la aparición de arritmias.

10.- La administración de endotoxina de *E. coli* 0111:B4 en la rata produce un característico efecto bifásico de hipotensión arterial. Los resultados obtenidos administrando UR-12460 antes de la endotoxina o una hora después, indican que

el PAF no juega un papel importante en la hipotensión inicial, ya que la administración preventiva del antagonista no produce ningún efecto sobre esa fase hipotensora. La segunda fase de hipotensión sí resulta inhibida por los antagonistas del PAF probados.

11.- Los estudios de aumento de permeabilidad vascular en ratas tratadas con endotoxina han permitido comprobar que sólo algunos órganos resultan afectados significativamente (tráquea, timo, estómago y vesícula seminal) y que el aumento de permeabilidad es visible a partir de los 15 minutos de la administración de la endotoxina. El UR-12460 inhibe la extravasación a nivel de tráquea y de vesícula seminal.

12.- La buena correlación entre la inhibición de la mortalidad inducida por PAF y la mortalidad inducida por endotoxina en ratón, refuerza de manera importante la participación del PAF como mediador clave en la cascada de acontecimientos que dan lugar a la mortalidad por endotoxina.

13.- La eficacia de los antagonistas UR-12460 y WEB-2086 atenuando las alteraciones bioquímicas y enzimáticas inducidas por endotoxina en la rata refuerza el papel del PAF en la génesis de dichas alteraciones. Además, ambos antagonistas inhiben el aumento del tiempo parcial de tromboplastina activada, lo que indica que el PAF puede estar implicado en los mecanismos que conducen al síndrome de coagulación intravascular diseminada en la rata.

14.- La importancia del PAF en los mecanismos del shock hipovolémico no está clara. En nuestro modelo de shock hemorrágico en rata, los antagonistas probados no se han mostrado efectivos. Es probable que la administración de los antagonistas sea beneficiosa solamente en fases iniciales de la hemorragia, mientras que no sea de utilidad cuando se instaura un shock progresivo o se empiezan a liberar otros mediadores.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS GA. Platelet aggregation. En: Longenecker GL, ed. The platelets. Physiology and Pharmacology, 5-9. Orlando: Academic Press, 1985.
- ADNOT S, LEFORT J, BRAQUET P, VARGAFTIG BB. Interference of the PAF-acether antagonist BN 52021 with endotoxin-induced hypotension in the guinea pig. Prostaglandins, **32**: 791-802, 1986.
- ALDRIDGE S. Meeting the challenge of sepsis. Trends Biotechnol, **11**: 373-375, 1993
- ALLOATTI G, MONTRUCCHIO G, CAMUSSI G. Role of platelet-activating factor (PAF) in oxygen radical-induced cardiac dysfunction. J Pharmacol Exp Ther, **269**: 766-771, 1994.
- ALPERT JS, RIPPE JM. Introducción al sistema cardiovascular. Shock. En: Manual de diagnóstico y terapéutica cardiovasculares, 89-105. Barcelona: Ediciones Científicas y técnicas, 1992.
- ALTURA BM. Endothelium, reticuloendothelial cells, and microvascular integrity: roles in host defense. En: Altura BM, ed. Handbook of shock and trauma. Vol. 1: Basic Science, 51-95. Nueva York: Raven Press, 1983.
- ANDERSSON P. Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea-pigs. Pattern of response in relation to immunization regimen. Allergy, **35**: 65-71, 1980.
- AOKI N, LEFER AM. Protective effects of thromboxane receptor blockade in splanchnic artery occlusion shock. Methods Find Exp Clin Pharmacol, **10**: 413-418, 1988.
- BALSA D, MERLOS M, GIRAL M, FERRANDO R, GARCIA-RAFANELL J, FORN J. Effect of endotoxin and platelet-activating factor on rat vascular permeability: role of vasoactive mediators. J Lipid Mediators, 1997 (*pendiente de publicación*).
- BARANES J, HELLEGOUARCH A, BRAQUET P. The effect of PAF-acether on the cardiovascular system and their inhibition by a new highly specific PAF-acether receptor antagonist, BN 52021. Pharmacol Res Commun, **18**: 717-737, 1986.
- BAREFOOT ST, TOTH PD, VERDUN M, MIKULASCHEK AW. The effects of a platelet-activating factor antagonist, L-652,731, on PAF and hemorrhagic hypotension and neutrophil activation. Fed Proc, **46**: 1262, 1987.
- BARTROLÍ J, CARCELLER E, MERLOS M, GARCÍA-RAFANELL J, FORN J. Disubstituted Tetrahydrofurans and Dioxolanes as PAF antagonists. J Med Chem, **34**: 373-386, 1991a.
- BARTROLÍ J, CARCELLER E, MERLOS M, GIRAL M, GARCÍA-RAFANELL J, FORN J. Design of potent linear PAF antagonists. J Med Chem, **34**: 3328-3334, 1991b.
- BATT JP, LAMOURI A., TAVET F, HEYMANS F, DIVE G, GODFROID JJ. New hypothesis on the conformation of the PAF receptor from studies on the geometry of selected platelet-activating factor antagonists. J Lipid Mediators, **4**: 343-346, 1991.
- BAZIN H, BARTA O, BARTA VD. Hypersensibilité de type I. En: Pastoret P, Govaerts A, Bazin H, eds. Immunologie animale, 313, Paris: Flammarion, 1990.
- BELLEMIN-BAURREAU J, POIZOT A, HICKS PE, ARMSTRONG M. An *in vitro* method for the evaluation of antiarrhythmic and antiischemic agents by using programmed electrical stimulation of rabbit heart. J Pharmacol Methods, **31**: 31-40, 1994.
- BENVENISTE J, HENSON PM, COCHRANE CG. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and platelet-activating factor. J Exp Med, **136**: 1356-1377, 1972.

- BENVENISTE J, TENCÉ M, VARENNE P, BIDAULT J, BOULLET C, POLONSKY J. Semi-synthèse et structure proposée du facteur activant les plaquettes (PAF): PAF-acether, un alkyl ether analogue de la phosphatidylcholine. Paris: CR Academic Science, **289**: 1037-1040, 1979.
- BERNIER M, HEARSE DJ, MANNING AS. Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. Studies with "anti-free radical" interventions and a free radical-generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ Res*, **58**: 331-340, 1986.
- BERTI F, MAGNI F, ROSSONI G, DE ANGELIS L, GALLI G. Production and biologic interactions of prostacyclin and platelet-activating factor in acute myocardial ischemia in the perfused rabbit heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, **16**: 727-732, 1990.
- BESSIN P, BONNET J, APFFEL D, SOULARD C, DESGROUX L, PELAS I, BENVENISTE J. Acute circulating collapse caused by platelet activating factor (PAF acether) in dogs. *Eur J Pharmacol*, **86**: 403-413, 1983.
- BITO H, HONDA Z, NAKAMURA M, SHIMIZU T. Cloning, expression and tissue distribution of rat platelet-activating factor receptor cDNA. *Eur J Biochem*, **221**: 211-218, 1994.
- BLACK SC, DRISCOLL EM, LUCCHESI BR. Inhibition of platelet-activating factor fails to limit ischemia and reperfusion-induced myocardial damage. *J Cardiovasc Pharmacol*, **20**: 997-1005, 1992.
- BLALOCK A. Acute circulatory failure as exemplified by shock and hemorrhage. *Surg Gynecol Obstet*, **58**: 551-566, 1934.
- BLANK ML, LEE TC, FITZGERALD V, SNYDER F. A specific hydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine hypotensive platelet activating lipid. *J Biol Chem*, **256**: 175-178, 1981.
- BOCHNER BS, PEACHELL PT, BROWN KE, SCHLEIMER RP. Adherence of human basophils to cultured umbilical vein endothelial cells. *J Clin Invest*, **81**: 1355-1364, 1988.
- BONE RC. Why sepsis trials fail. *J Am Med Assoc*, **276**: 565-566, 1996.
- BORN GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, **194**: 927, 1962.
- BRAND EA, LEFER AM. Myocardial depressant factor in plasma from cats in irreversible post-oligemic shock. *Proc Soc Exp Biol Med*, **122**: 200-203, 1966.
- BRAQUET P, GODFROID JJ. PAF-acether specific binding sites: 2. Design of specific antagonists. *Trends Pharmacol Sci*, **7**: 397-403, 1986.
- BRAQUET P, TOUQUI L, SHEN TY, VARGAFTIG BB. Perspectives in platelet activating factor research. *Pharmacol Rev*, **39**: 97-145, 1987.
- BRUGÈRE H. Le choc. *Rec Méd Vét*, **165**: 933-945, 1989.
- BUSER PT, WAGNER S, WU S, HIGGINS CB, WIKMAN-COFFELT J. Protective effects of calcium antagonists on energy and substrate metabolism during ischemia and reperfusion in hypertensive myocardial hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*, **18 (Suppl. 10)**: S87-S92, 1991.
- BUSSOLINO F, CAMUSSI G, AGLIETTA M, BRAQUET P, BOSIA A, PESCARMONA G, SANAVIO F, D'URSO N, MARCHISIO PC. Human endothelial cells are targets for platelet-activating factor. I. Platelet-activating factor changes the cytoskeleton structures and promotes albumin diffusion across endothelial monolayer. *J Immunol*, **139**: 2439-2446, 1987.

CABRERA JE. Manejo del shock en la unidad de cuidados intensivos. En: Díaz-Rubio M y Espinós D, eds. Tratado de medicina interna, 815-829. Madrid: Médica Panamericana, 1994.

CANALE P, SQUADRITO F, ALTAVILLA D, IOCLANO M, ZINGARELLI B, CAMPO GM, URNA G, SARDELLA A, SQUADRITO G, CAPUTI AP. TCV-309, a novel platelet activating factor antagonist, inhibits leukocyte accumulation and protects against splanchnic artery occlusion shock. *Agents Actions*, **42**: 128-134, 1994.

CANNON WB. Traumatic shock. Nueva York: Appleton, 1923.

CARCELLER E, MERLOS M, GIRAL M, BARTROLÍ J, GARCÍA-RAFANELL J, FORN J. 4-Substituted 2-alkoxytetrahydrofurans as potent and long lasting PAF antagonists. *J Med Chem*, **35**: 676-683, 1992a.

CARCELLER E, ALMANSA C, MERLOS M, GIRAL M, BARTROLÍ J, GARCÍA-RAFANELL J, FORN J. (Pyridylcyanomethyl)piperazines as orally active PAF antagonists. *J Med Chem*, **35**: 4118-4134, 1992b.

CARCELLER E, MERLOS M, GIRAL M, ALMANSA C, BARTROLÍ J, GARCÍA-RAFANELL J, FORN J. Synthesis and structure-activity relationships of 1-acyl-4-((2-methyl-3-pyridyl)cyanomethyl)piperazines as PAF antagonists. *J Med Chem*, **36**: 2984-2997, 1993.

CASALS-STENZEL J. Effects of WEB-2086, a novel antagonist of platelet activating factor, in active and passive anaphylaxis. *Immunopharmacology*, **13**: 117-124, 1987.

CHAKRABARTY S, FLUCK DS, FLORES NA, SHERIDAN DJ. Effects of the PAF antagonists BN50726 and BN50739 on arrhythmogenesis and extent of necrosis during myocardial ischaemia/reperfusion in rabbits. *Br J Pharmacol*, **107**: 705-709, 1992.

CHANG SW, FEDDERSEN CO, HENSON PM, VOELKEL NF. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest*, **79**: 1498-1509, 1987.

CHIEN S, SIMCHON S. The sympathetic and central nervous systems in shock. En: Altura BM, ed. Handbook of shock and trauma. Vol. 1: Basic Science, 149-166. Nueva York: Raven Press, 1983.

CHOPRA K, SINGH M, GUPTA S, GANGULY NK. Involvement of oxygen free radicals in the action of BN 52021 (PAF antagonist) to limit myocardial infarct size. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, **15**: 437-445, 1993.

COLATSKY TJ. Models of myocardial ischemia and reperfusion injury: role of inflammatory mediators in determining infarct size. En: Chang JY y Lewis AJ, eds. Modern methods in Pharmacology. Vol. 5: Pharmacological methods in the control of inflammation, 283-320. Nueva York: Alan R. Liss, Inc., 1989.

CRILE GW. An experimental research into surgical shock. Philadelphia: Lippincott, 1899.

CZARNETZKI BM, BENVENISTE J. Effect of synthetic PAF-acether on human neutrophil function. *Agents Actions*, **11**: 549-550, 1981.

DeJOY SQ, ORONSKY AL, WICK MM, KERWAR SS. Preclinical studies with platelet-activating factor antagonists in models of septic shock. *Int J Antimicrob Agents*, **3**: 175-186, 1993.

DEMOPOULOS CA, PINCKARD RN, HANAHAH DJ. Platelet-activating factor: evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem*, **254**: 9355-9358, 1979.

DESQUAND S, TOUVAY C, RANDON J, LAGENTE V, VILAIN B, BRAQUET P. Interference of BN 52021 (ginkgolide B) with the bronchopulmonary effects of PAF-acether in the guinea pig. *Eur J Pharmacol*, **127**: 83-95, 1986.

DHAINAUT JFA, TENAILLON A, LE TULZO Y, SCHLEMMER B, SOLET JP, WOLFF M, HOLZAPFEL L, ZENI F, DREYFUSS D, MIRA JP, DE VATHAIRE F, GUINOT P. Platelet-activating factor receptor antagonist BN 52021 in the treatment of severe sepsis: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial. *Crit Care Med*, **22**: 1720-1728, 1994.

DINARELLO CA. Molecular mechanisms in endotoxic fever. *Agents Actions*, **13**: 470-486, 1983.

DIVE G, GODFROID JJ, LAMOTTE-BRASSEUR J, BATT JP, HEYMANS F, DUPONT L, BRAQUET P. PAF-receptor. 1. "Cache oreilles" effect of selected high potency platelet-activating factor (PAF) antagonists. *J Lipid Mediators*, **1**: 201-215, 1989.

DOEBBER TW, WU MS, ROBBINS JC, CHOY BM, CHANG MN, SHEN TY. Platelet activating factor (PAF) involvement in endotoxin-induced hypotension in rats. Studies with PAF-receptor antagonist kadsurenone. *Biochem Biophys Res Commun*, **127**: 799-808, 1985.

DOLE WP, O'ROURKE RA. Pathophysiology and management of cardiogenic shock. *Curr Probl Cardiol*, **8**: 1-72, 1983.

DÖRING HJ, DEHNERT H. The isolated perfused heart according to Langendorff. Biomesstechnik-Verlag, March, 1988.

DUNCAN SG, DEMETER RJ, TOTH PD. The effects of platelet-activating factor antagonist (CV-3988) on endotoxic and hemorrhagic shock in dogs. *Crit Care Med*, **14**: 413, 1986.

ELIN R, WOLFF SM. Bacterial endotoxins. En: Laskin AI y Chevalier HA, eds. *CRC Handbook on Microbiology*, 215-239. Cleveland: CRC Press, 1973.

EMEIS JJ, KLUFT C. PAF-acether-induced release of tissue-type plasminogen activator from vessel walls. *Blood*, **66**: 86-91, 1985.

ENGLER R, COVELL W. Granulocytes cause reperfusion ventricular dysfunction after 15-minute ischemia in the dog. *Circ Res*, **61**: 20-28, 1987.

ENTMAN M, MICHAEL L, ROSSEN RD, DREYER WJ, ANDERSON DC, TAYLER AA, SMITH CW. Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *Fed Am Soc Exp Biol J*, **5**: 2529-2537, 1991.

EVANGELOU AM. Platelet-activating factor (PAF): implications for coronary heart and vascular diseases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **50**: 1-28, 1994.

FERDINANDY P, KOLTAI M, TOSAKI A, BERTHET P, TARRADE T, ESANU A, BRAQUET P. Cicletanine improves myocardial function deteriorated by ischemia/reperfusion in isolated working rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*, **19**: 181-189, 1992.

FEUERSTEIN G, ZUKOWSKA-GROJEC Z, KRAUSZ MM, BLANK ML, SNYDER F, KOPIN IJ. Cardiovascular and sympathetic effects of 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine in conscious SHR and WKY rats. *Clin Exp Hypertens*, **A4**: 1335-1350, 1982.

FEUERSTEIN G, BOYD LM, EZRA D, GOLDSTEIN R. Effect of platelet activating factor on coronary circulation in the domestic pig. *Am J Physiol*, **246**: H466-H471, 1984.

FEUERSTEIN G, LUX WE Jr, EZRA D, HAYES EC, SNYDER F, FADEN AI. Thyrotropin releasing hormone blocks the hypotensive effect of platelet activating factor in the unanesthetized guinea pig. *J Cardiovasc Pharmacol*, **7**: 335-340, 1985.

- FEUERSTEIN G, GOLDSTEIN RE. Effect of PAF on the cardiovascular system. En: Snyder F, ed. Platelet-activating factor and related lipid mediators, 403-424. Nueva York: Plenum Press, 1987.
- FEUERSTEIN G, HOLLENBECK JM, VANATTA B, RABINOVICI R, ESSER K, PERERA PY, VOGEL S.N. Effect of gram negative endotoxin on levels of serum corticosterone, TNF α , circulating blood cells and the survival of rats. *Circ Shock*, **30**: 265-278, 1990.
- FILEP J, HERMAN F, BRAQUET P, MOZES T. Increased levels of platelet-activating factor in blood following intestinal ischemia in the dog. *Biochem Biophys Res Commun*, **158**: 353-359, 1989.
- FLEMING I, DAMBACHER T, BUSSE R. Endothelium-derived kinins account for the immediate response of endothelial cells to bacterial lipopolysaccharide. *J Cardiovasc Pharmacol*, **20**: S135-S138, 1992.
- FLOCH A, MASSA N, CAVERO I. Studies on the pharmacological mechanisms responsible for the hemoconcentration produced by PAF and endotoxin in rats. En: Handley DA, Saunders RN, Houlihan WJ y Tomesch JC, eds. Platelet activating factor in endotoxin and immune diseases, 577-588, Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 1990.
- FLORES NA, SHERIDAN DJ. Electrophysiological and arrhythmogenic effects of platelet activating factor during normal perfusion, myocardial ischemia and reperfusion in the guinea pig. *Br J Pharmacol*, **101**: 734-738, 1990.
- FRANSON TR, HIERHOLTZER WJ, LaBRECQUE DR. Frequency and characteristics of hyperbilirubinemia associated with bacteremia. *Rev Infect Dis*, **7**: 1-9, 1985.
- FURLAN LE, JOHNSON G III, SIEGFRIED M, LEFER A. Protective effects of the specific thromboxane receptor antagonist (+)-S145Na in splanchnic artery occlusion shock in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **253**: 287-291, 1990.
- GALANOS C, FREUDENBERG MA, REUTTER W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **26**: 5939-5943, 1979.
- GARCÍA DE LA FUENTE A, GUIASOLA MC. Shock y síncope. En: Díaz-Rubio M y Espinós D, eds. Tratado de Medicina interna, 294-304. Madrid: Médica Panamericana, 1994.
- GARLICK PB, DAVIES MJ, HEARSE DJ, SLATER TF. Direct detection of free radicals in the reperfused rat using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res*, **61**: 757-760, 1987.
- GATELL JM, TRILLA A, LATORRE X, ALMELA M, MENSA J, MORENO A, *et al.* Nosocomial bacteremia in a large spanish teaching hospital: analysis of factors influencing prognosis. *Rev Infect Dis*, **10**: 203-210, 1988.
- GIRAL M, BALSÀ D, FERRANDO R, MERLOS M, GARCIA-RAFANELL J, FORN J. Effects of UR-12633, a new antagonist of platelet-activating factor, in rodent models of endotoxic shock. *Br J Pharmacol*, **118**: 1223-1231, 1996.
- GODFROID JJ, HEYMANS F, MICHEL E, REDEUILH C, STEINER E, BENVENISTE J. Platelet-activating factor (PAF-acether): total synthesis of 1-O-octadecyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine. *FEBS Lett*, **116**: 161-164, 1980.
- GODFROID JJ, DIVE G, LAMOTTE-BRASSEUR J, BATT JP, HEYMANS F. PAF receptor structure: a hypothesis. *Lipids*, **26**: 1162-1166, 1990.
- GOLDSTEIN RE, LAURINDO FRM, EZRA D, FEUERSTEIN G. Mechanism of circulating collapse induced by PAF-acether. En: Braquet M, ed. Lipid mediators in immunology of burn and sepsis, New York: Plenum Press, 1987.

GROVER GJ, DZWONCZYK S, PARHAM CS, SLEPH PG. The protective effects of cromakalim and pinacidil on reperfusion function and infarct size in isolated perfused rat hearts and anesthetized dogs. *Cardiovasc Drugs Ther*, **4**: 465-474, 1990.

GUYTON AC. Shock circulatorio y fisiología de su tratamiento. En: Tratado de fisiología médica, 272-281. Madrid: Interamericana, 1992.

HANDLEY DA. Preclinical and clinical pharmacology of platelet activating factor receptor antagonists. *Med Res Rev*, **10**: 351-370, 1990a.

HANDLEY DA. Platelet-activating factor as a mediator of endotoxin-related diseases. En: Handley DA, Saunders RN, Houlihan WJ y Tomesch JC, eds. Platelet activating factor in endotoxin and immune diseases, 451-495, Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 1990b.

HARLAN JM, HARKER LA, REIDY MA, GAJDUSEK CM, SCHWARTZ SM, STRIKER GE. Lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury *in vitro*. *Lab. Invest.* **48**: 269-274, 1983.

HEARSE DJ. Free radicals, membrane injury, and electrophysiological disorders. En: Zipes DP y Jalife J, eds. Cardiac electrophysiology, from cell to bedside, 442-447, Filadelfia: Saunders, 1990.

HELLEWELL PG, JOSE PJ, WILLIAMS TJ. Inflammatory mechanisms in the passive cutaneous anaphylactic reaction in the rabbit: evidence that novel mediators are involved. *Br J Pharmacol*, **107**: 1163-1172, 1992.

HESS LM, WARNER M, OKABE E. Hemorrhagic shock. En: Altura BM, Lefer AM y Schumer W, eds. Handbook of shock and trauma, Vol. 1, 393-412. Nueva York: Raven Press, 1983.

HONDA Z, NAKAMURA M, MIKI I, MINAMI M, WATANABE T, SEYAMA Y, OKADO H, TOH H, ITO K, MIYAMOTO T, SHIMIZU T. Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature*, **349**: 342-346, 1991.

HORWITZ LD., FENNESSEY, PV, SHIKES RH, KONG Y. Marked reduction in myocardial infarct size due to prolonged infusion of an antioxidant during reperfusion. *Circulation*, **89**: 1792-1801, 1994.

HUNT F. Patterns of LPS synthesis in gram negative bacteria. *J Theor Biol*, **115**: 213-219, 1985.

HWANG SB, LAM MH. Species difference in the specific receptor of platelet activating factor. *Biochem Pharmacol*, **35**: 4511, 1986.

HWANG SB, WANG S. Wheat germ agglutinin-potentiated specific binding of platelet-activating factor (PAF) to human platelet membranes: possible existence of endogenous modulator of PAF receptor and intracellular PAF receptor. En: Braquet P, Hsieh KH, Pirotzky E, Mencia-Huerta JM, eds. Platelet activating factor in immune responses and renal diseases, 9. Hong Kong: Excerpta Medica Asia, 1989.

IMURA Y, TERASHITA Z, NISHIKAWA K. Possible role of platelet activating factor (PAF) in disseminated intravascular coagulation (DIC), evidenced by use of a PAF antagonist, CV-3988. *Life Sci*, **39**: 111-117, 1986.

IÑARREA P, GÓMEZ CAMBRONERO J, NIETO M, SÁNCHEZ CRESPO M. Characteristics of the binding of platelet-activating factor to platelets of different animal species. *Eur J Pharmacol*, **105**: 309-315, 1984.

IÑARREA P, GOMEZ-CAMBRONERO J, PASCUAL J, PONTE C, HERNANDO L, SANCHEZ-CRESPO M. Synthesis of PAF-acether and blood volume changes in gram-negative sepsis. *Immunopharmacology* **9**: 45-52, 1985.

- JOHNS TNP, OLSON BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*, **140**: 675-682, 1954.
- KANE KA, PARRAT JR, WILLIAMS FM. An investigation into the characteristics of reperfusion-induced arrhythmias in the anaesthetized rat and their susceptibility to antiarrhythmic agents. *Br J Pharmacol*, **82**: 349-357, 1984.
- KATOH S, TOYAMA J, KODAMA I, KOIKE A, ABE T. Role of platelet activating factor in ischaemia-reperfusion injury of isolated rabbit hearts: protective effect of a specific platelet activating factor antagonist, TCV-309. *Cardiovasc Res*, **27**: 1430-1434, 1993.
- KATORI M, MAJIMA M, ODOI-ADOME R, SUNAHARA N, UCHIDA Y. Evidence for the involvement of a plasma kallikrein-kinin system in the immediate hypotension produced by endotoxin in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol*, **98**: 1383-1391, 1989.
- KAWAMURA M, TERASHITA Z, IMURA Y, SHINO A, NISHIKAWA K. Inhibitory effect of TCV-309, a novel platelet activating factor (PAF) antagonist, on endotoxin induced disseminated intravascular coagulation in rats: possible role of PAF in tissue factor generation. *Thromb Res*, **70**: 281-293, 1993.
- KENZORA JL, PEREZ JE, BERGMANN SR, LANGE LG. Effects of acetyl glyceryl ether of phosphorylcholine (platelet activating factor) on ventricular preload, afterload and contractility in dogs. *J Clin Invest*, **74**: 1193-1203, 1984.
- KOLTAI M, TOSAKI A, HOSFORD D, BRAQUET P. Ginkgolide B protects isolated hearts against arrhythmias induced by ischemia but not reperfusion. *Eur J Pharmacol*, **164**: 293-302, 1989.
- KOLTAI M, HOSFORD D, BRAQUET P. PAF-induced amplification of mediator release in septic shock: Prevention or downregulation by PAF antagonists. *J Lipid Mediators*, **6**: 183-198, 1993.
- KOLTAI M, GUINOT P, HOSFORD D, BRAQUET PG. Platelet-activating factor antagonists: scientific background and possible clinical applications. *Adv Pharmacol*, **28**: 81-167, 1994.
- KONZETT H, RÖSSLER R. Versuchsanordnung zu Untersuchungen an der Bronkialmuskulatur. *Arch Exp Path Pharmacol*, **195**: 71-74, 1940.
- KRELL RD, CHAKRIN LW. Preclinical evaluation of antiallergic agents. *J Pharm Sci*, **69**: 239-243, 1980.
- KROEGEL C, YUKAWA T, WESTWICK J, BARNES PJ. Evidence for two platelet activating factor receptors on eosinophils: dissociation between PAF-induced extracellular calcium mobilization and degranulation and superoxides anion generation in eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun*, **162**: 511-521, 1989.
- KUBES P, SUZUKI M, GRANGER DN. Platelet-activating factor induced microvascular dysfunction: Role of adherent leukocytes. *Am J Physiol*, **258**: G158-G163, 1990.
- KUBES P, GRANGER DN. Role of leukocytes in reperfusion-induced intestinal dysfunction. *Drug News Perspect*, **5**: 197-206, 1992.
- KUTTNER RE. Gastrointestinal tract including liver. En: Altura BM, ed. *Handbook of shock and trauma*. Vol. 1: Basic Science, 129-147. Nueva York: Raven Press, 1983.
- LANG CH, DOBRESCU C, HARGROVE DM, BAGBY GJ, SPITZER JJ. Platelet-activating factor-induced increases in glucose kinetics. *Am J Physiol*, **254**: E193-E200, 1988.

- LANG CH, BAGBY GJ. The role of platelet-activating factor in endotoxin-, sepsis-, and burn-induced changes in hemodynamics and metabolism. En: Handley DA, Saunders RN, Houlihan WJ y Tomesch JC, eds. Platelet activating factor in endotoxin and immune diseases, 609-628. Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 1990.
- LE DRAN HF. A treatise of reflections drawn from practice on gunshot wounds (traducido). Londres: Clarke, 1743.
- LEFER AM. Role of myocardial depressant factor in the pathogenesis of circulatory shock. Fed Proc, **29**: 1836-1847, 1970.
- LEFER AM. Interaction between myocardial depressant factor and vasoactive mediators with ischemia and shock. Am J Physiol, **252**: R193-R205, 1987.
- LEFER AM, MA X. Endothelial dysfunction in the splanchnic circulation following ischemia and reperfusion. J Cardiovasc Pharmacol, **17(Suppl. 3)**: S186-S190, 1991.
- LEONG LLL, STURM MJ, PAPADIMITRIOU JM, STEPHENS CJ, TAYLOR RR. The effects of a PAF antagonist on ischemic myocardial damage and arrhythmia in the dog. J Mol Cell Cardiol, **24**: 641-649, 1992.
- LEPRÁN I, LEFER AM. Ischemia aggravating effects of platelet-activating factor in acute myocardial ischemia. Basic Res Cardiol, **80**: 135-141, 1985.
- LEWIS MS, WHATLEY RE, CAIN P, McINTYRE TM, PRESCOTT SM, ZIMMERMAN GA. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. J Clin Invest, **82**: 2045-2055, 1988.
- LOHMAN IC, HALONEN M. Effects of the PAF antagonist WEB-2086 on PAF-induced physiologic alterations and on IgE anaphylaxis in the rabbit. Am Rev Respir Dis, **142**: 390-397, 1990.
- LUCAS CE, LEDGERWOOD AM. Cardiovascular and renal response to hemorrhagic and septic shock. En: Clowes, GHA Jr, ed. Trauma, sepsis and shock. The physiological basis of therapy, 187-215. Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 1988.
- MAJNO G, AMES A, CHIANG J, WRIGHT RL. No reflow after cerebral ischaemia. Lancet, **2**: 569-570, 1967.
- MAXWELL MP, HEARSE DJ, YELLON DM. Species variation on the coronary collateral circulation during myocardial ischemia: A critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. Cardiovasc Res, **21**: 737-746, 1987.
- MEYRICK BO, RYAN US, BRIGHAM KL. Direct effects of *E. coli* endotoxin on structure and permeability of pulmonary endothelial monolayers and the endothelial layer of intimal explants. Am J Pathol, **122**: 140-151, 1986.
- MIMURA K, YUKAWA S, MORI Y, OKADA K, MUNE M, NISHIKAWA O, HIBINO A, SONOBE M, GOTO T, NOMOTO H. Effect of platelet-activating factor on lipoprotein lipase and blood lipids. Lipids, **26**: 1102-1107, 1991.
- MONTRUCCHIO G, ALLOATTI G, TETTA C, DE LUCA R, SAUNDERS RN, EMANUELLI G, CAMUSSI G. Release of platelet-activating factor from ischemic reperfused rabbit heart. Am J Physiol, **25**: H1236-H1246, 1989.
- MORRIS EA. A practical treatise on shock after operations and injuries. Londres: Hardwicke, 1867.
- MOZES T, BRAQUET P, FILEP J. Platelet-activating factor: an endogenous mediator of mesenteric ischemia reperfusion induced shock. Am J Physiol, **257**: R872-R877, 1989.

- MUIRHEAD EE, JONES F, STIRMAN JA. Antihypertensive property in renoprival hypertension of extract from the renal medulla. *J Lab Clin Med*, **56**: 167-180, 1960.
- NAGAOKA J, HARADA K, KIMURA A, KOBAYASHI S, MURAKAMI M, YOSHIMURA T, YAMADA K, ASANO O, KATAYAMA K, YAMATSU I. Inhibitory effects of the novel platelet activating factor receptor antagonist, 1-Ethyl-2-[N-(2-methoxy)benzoyl-N-[(2R)-2-methoxy-3-(4-octadecylcarbamoyloxy)piperidinocarbonyloxypropyloxy]carbonyl]aminomethyl-pyridinium chloride, in several experimentally induced shock models. *Arzneim -Forsch Drug Res*, **41**: 719-724, 1991.
- NAKAMURA M, HONDA Z, IZUMI T, SAKANAKA C, MUTOH H, MINAMI M, BITO H, SEYAMA Y, MATSUMOTO T, NOMA M, SHIMIZU T. Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J Biol Chem*, **266**: 20400-20405, 1991.
- NONOW RO, UDELSON JE. Left ventricular diastolic dysfunction as a cause of congestive heart failure. *Ann Intern Med*, **117**: 502-510, 1992.
- OEI HHH, ZOGANAS HC, SAKANE Y, ROBSON RD, GLENN TM. Inhibition of thromboxane biosynthesis in splanchnic ischemia shock. *Circ Shock*, **18**: 95-106, 1986.
- OKAMOTO M, YOSHIDA K, NISHIKAWA M, KOHSAKA M, AOKI M. Platelet activating factor (PAF) involvement in endotoxin-induced thrombocytopenia in rabbits: studies with FR-900452, a specific inhibitor of PAF. *Thromb Res*, **42**: 661-671, 1986.
- PACKER M. Sudden unexpected death in patients with congestive heart failure: a second frontier. *Circulation*, **72**: 681-385, 1985.
- PANTRIDGE JF, WEBB SW, ADGEY AAJ, GEDEES JS. The first hour after the onset of acute myocardial infarction. En: Yu PN y Goodwin JF, eds. *Progress in cardiology*. Cap. 5. Philadelphia: Lea & Febiger, 1974.
- PARRILLO JE. Septic shock in humans. *Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy*. *Ann Intern Med*, **113**: 227-242, 1990.
- PASSMORE JC. Role of the kidney in shock: current views. En: Altura BM, ed. *Handbook of shock and trauma*. Vol. 1: Basic science, 113-128. Nueva York: Raven Press, 1983.
- PINCKARD RN, FARR RS, HANAHAH DJ. Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released *in vivo* during IgE anaphylaxis with PAF released *in vitro* from IgE sensitized basophils. *J Immunol*, **123**: 1847-1857, 1979.
- PIROVINO M, MEISTER F, RUBLI E, KARLAGANIS G. Preserved cytosolic and synthetic liver function in jaundice of severe extrahepatic infection. *Gastroenterology*, **96**: 1589-1595, 1989.
- POGWIZD SM, CORR BP. Reentrant and no reentrant mechanisms contribute to arrhythmogenesis during early myocardial ischemia: results using three dimensional mapping. *Circ Res*, **61**: 352-371, 1987.
- PREWITT RL, LEACH BE, BYERS LW, BROOKS S, LANDS WEM, MUIRHEAD EE. Antihypertensive polar renomedullary lipid, a semisynthetic vasodilator. *Hypertension*, **1**: 299-308, 1979.
- QI M, JONES SB. Contribution of platelet activating factor to hemodynamic and sympathetic responses to bacterial endotoxin in conscious rats. *Circ Shock*, **32**: 153-163, 1990.
- RABINOVICI R, YUE T, FARHAT M, SMITH EF, ESSER KM, SLIVJAK M, FEUERSTEIN G. Platelet activating factor (PAF) and tumor necrosis factor (TNF_α) interactions in endotoxemic shock: Studies with BN 50739, a novel PAF antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, **255**: 256-263, 1991a.

- RABINOVICI R, ESSER KM, LYSKO PG, YUE T, GRISWOLD DE, HILLEGASS LM, BUGELSKI PJ, HALLENBECK JM, FEUERSTEIN G. Priming by platelet-activating factor of endotoxin-induced lung injury and cardiovascular shock. *Circ Res*, **69**: 12-25, 1991b.
- RAMESHA CS, PICKETT WC. Species-specific variations in the molecular heterogeneity of platelet-activating factor. *J Immunol*, **138**: 1559-1563, 1987.
- RANAUT K, SINGH M. BN 50239: a PAF antagonist and limitation of myocardial infarct size. *Meth Find Exp Clin Pharmacol*, **15**: 9-14, 1993.
- RIEDEL A, MEST HJ. The effect of PAF (platelet activating factor) on experimental cardiac arrhythmias and its inhibition by substances influencing arachidonic acid metabolites. *Prostaglandins Leukot Med*, **28**: 103-109, 1987.
- ROELOFSEN H, VAN DER VEERE CN, OTTENHOFF R, SCHOEMAKER B, JANSEN PLM, OUDE ELFERINK RPJ. Decreased bilirubin transport in the perfused liver of endotoxemic rats. *Gastroenterology*, **107**: 1075-1084, 1994.
- ROLA-PLESZCZYNSKI M, POULIOT C, TURCOTTE S, PIGNOL B, BRAQUET P, BOUVRETTE L. Immune regulation by platelet-activating factor. I. Induction of suppressor cell activity in human monocytes and CD8⁺T cells and of helper cell activity in CD4⁺T cells. *J Immunol*, **140**: 3547-3552, 1988.
- ROMSON JL, HOOK BG, RIGOT VH, SCHORK MA, SWANSON DR, LUCCHESI BR. The effect of ibuprofen on accumulation of indium-111-labeled platelets and leukocytes in experimental myocardial infarction. *Circulation*, **66**: 1002-1011, 1982.
- SALINAS P, PÉREZ MD, FERNÁNDEZ-SANPABLO R, FERNÁNDEZ-GALLARDO S, SÁNCHEZ-CRESPO M, BARRIGÓN S. Lack of platelet-activating factor release on acute myocardial ischemia in the isolated interventricular septum of rabbit heart. *Eur J Pharmacol*, **293**: 65-70, 1995.
- SALVÁ JA, ARMENGOL M, OLLER B, DE CASTRO J. Shock. Concepto, fisiopatología, clasificación. En: Salvá JA y Guardia J, eds. *Urgencias médico-quirúrgicas*. 8, 21-36. Barcelona: Universidad Autónoma, 1989a.
- SALVÁ JA, ARMENGOL M, OLLER B, ESCUDERO LE. Repercusión del shock sobre los órganos. En: Salvá JA y Guardia J, eds. *Urgencias médico-quirúrgicas*. 8, 47-58. Barcelona: Universidad Autónoma, 1989b.
- SANCHEZ-CRESPO M, ALONSO F, IÑARREA P, EGIDO J. Non-platelet mediated vascular actions of 1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycerol phosphorylcholine (a synthetic PAF). *Agents Actions*, **11**: 565-566, 1981.
- SÁNCHEZ GARCÍA M. El fracaso multiorgánico. *Inflamación*, **6**: 173-184, 1995.
- SCHAFFER WA, COBB LA. Recurrent ventricular fibrillation and modes of death in survivors of out-of-hospital ventricular fibrillation. *New Engl J Med*, **293**: 259-262, 1975.
- SELYE H, BAJUSZ E, GRASSOS S, MENDELL P. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*, **11**: 398-407, 1960.
- SEWELL WH, KOTH DR, HUGGINS CE. Ventricular fibrillation in dogs after sudden return of flow to the coronary artery. *Surgery*, **38**: 1050-1053, 1955.
- SHANDELYA SML, KUPPUSAMY P, WEISFELDT ML, ZWEIER JL. Evaluation of the role of polymorphonuclear leukocytes on contractile function in myocardial reperfusion injury. *Circulation*, **87**: 536-546, 1992.

- SHAPIRO P, BRONSTHER B, FRANK ED, FINE J. Host resistance to hemorrhagic shock. XI. Role of deficient flow through intestine in development of irreversibility. *Proc Soc Exp Biol Med*, **97**: 372-376, 1958.
- SHUMER W, SPERLING R. Shock and its effect on the cell. *J Am Med Assoc*, **205**: 215-219, 1969.
- SIMON MA, OLSEN WR. II. Hemorrhage in the anesthetized pig. *Arch Surg*, **99**: 634-636, 1969.
- SIMPSON PJ, MITSOS SE, VENTURA A, GALLAGHER KP, FANTONE JC, ABRAMS GD, SCHORK AM, LUCCHESI BR. Prostacyclin protects ischemic reperfusion myocardium in the dog by inhibition of neutrophil activation. *Am Heart J*, **113**: 129-137, 1987.
- SMILEY PL, STREMLER KE, PRESCOTT SM, ZIMMERMAN GA, McINTYRE TM. Oxidatively fragmented phosphatidylcholines activate human neutrophils through the receptor for platelet-activating factor. *J Biol Chem*, **266**: 11104-11110, 1991.
- STAHL GL, LEFER AM. Mechanisms of platelet activating factor-induced cardiac depression in the isolated perfused rat heart. *Circ Shock*, **23**: 165-177, 1987.
- STAHL GL, BITTERMAN H, TERASHITA Z, LEFER AM. Salutary consequences of blockade of platelet activating factor in hemorrhagic shock. *Eur J Pharmacol*, **149**: 233-240, 1988.
- STOLL LL, DENNING GM, KASNER NA, HUNNINGHAKE GW. Platelet-activating factor may stimulate both receptor-dependent and receptor-independent increases in $[Ca^{2+}]$ in human airway epithelial cells. *J Biol Chem*, **269**: 4254-4259, 1994.
- SVENSJÖ E, ERLANSSON M, VAN DEN BOSS GC. Endotoxin-induced increase in leukocyte adherence and macromolecular permeability of postcapillary venules. *Agents Actions*, **29**: 21-23, 1990.
- SZABÓ C, MITCHELL JA, THIEMERMANN C, VANE JR. Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxic shock. *Br J Pharmacol*, **108**: 786-792, 1993a.
- SZABÓ C, WU CC, MITCHELL JA, GROSS SS, THIEMERMANN C, VANE JR. Platelet-activating factor contributes to the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *Circ Res*, **73**: 991-999, 1993b.
- TAIRA M, KOHNO SW, YAMAMURA H, OHATA K. Lack of involvement of leukotriene and platelet activating factor in passive cutaneous anaphylaxis in rats. *Agents Actions*, **24**: 189-195, 1988.
- TAMARGO J, TEJERINA T, DELGADO C, BARRIGAN S. Electrophysiological effects of platelet activating factor (PAF) in guinea-pig papillary muscles. *Eur J Pharmacol*, **109**: 219-228, 1985.
- TAMARGO J, DELGADO C, DIEZ J, DELPÓN E. Cardiac electrophysiology of PAF-acether and PAF-acether antagonists. En: Braquet P, ed. *Ginkgolides. Chemistry, Biology, Pharmacology and clinical perspectives*. Vol. 1, 417-431. Barcelona: J.R. Prous Science Publishers, 1988.
- TEPLITZ C. The pathology and ultrastructure of cellular injury and inflammation in the progression and outcome of trauma, sepsis and shock. En: Clowes GHA Jr, ed. *Trauma, sepsis and shock. The physiological basis of therapy*, 187-215. Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 1988.
- TERASHITA Z, IMURA Y, NISHIKAWA K, SUMIDA S. Is platelet activating factor (PAF) a mediator of endotoxin shock? *Eur J Pharmacol*, **109**: 257-261, 1985.
- TERASHITA Z, IMURA Y, SHINO A, NISHIKAWA K. A lethal role of platelet activating factor in anaphylactic shock in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **243**: 378-383, 1987.

- TERASHITA Z, IMURA Y, NISHIKAWA K. Possible pathophysiological roles of platelet activating factor in shock and the PAF antagonists, CV-3988 and CV-6209. En: Handley DA, Saunders RN, Houlihan WJ, Tomesch JC. eds. Platelet activating factor in endotoxin and immune diseases, 547-575. Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 1990.
- THIEMERMANN C, RUETTEN H, WU CC, VANE JR. The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*, **116**: 2845-2851, 1995.
- THOMAS PD, HAMPSON FW, CASALE JM, HUNTINGHAKE GW. Neutrophil adherence to human endothelial cells. *J Clin Med*, **III**: 286-292, 1988.
- TILNEY NL, BAILEY GL, MORGAN AP. Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care. *Ann Surg*, **178**: 117-122, 1973.
- TJOELKER LW, WILDER C, EBERHARDT C, STAFFORINI DM, DIETSCH G, SCHIMPF B, HOOPER S, LE TRONG H, COUSENS LS, ZIMMERMAN GA, YAMADA Y, McINTYRE TM, PRESCOTT SM, GRAY PW. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature*, **374**: 549-553, 1995.
- TOSAKI A, SZERDAHELYI P, ENGELMAN RM, DAS DK. Potassium channel openers and blockers: do they possess proarrhythmic or antiarrhythmic activity in ischemic and reperfused rat hearts?. *J Pharmacol Exp Ther*, **267**: 1355-1362, 1993.
- TOTH PD, MIKULASCHEK AW. Effects of a platelet-activating factor antagonist, CV-3988, on different shock models in the rat. *Circ Shock*, **20**: 193-203, 1986.
- VALONE FH, COLES E, REINHOLD VR, GOETZ EJ. Specific binding of phospholipid platelet-activating factor by human platelets. *J Immunol*, **129**: 1637-1641, 1982.
- VAN DEVENTER SJH, BULLER HR, TEN CATE JW, AARDEN LA, HACK CE, STURK A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic and complement pathways. *Blood*. **76**: 2520-2526, 1990.
- VERCELOTTI GM, YIN HQ, GUSTAFSON KS, NELSON RD, JACOB HS. Platelet activating factor primes neutrophils response to agonists: role in promoting neutrophil mediated endothelial damage. *Blood*, **71**: 1100-1107, 1988.
- VLEEMING W, WEMER J, PORSIUS AJ. Modulation of antigen- and ischemia-induced effects by the platelet-activating factor antagonist WEB-2086 in isolated sensitized rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*, **20**: 790-799, 1992.
- WAINWRIGHT CL, PARRAT JR, BIGAUD M. The effects of PAF antagonists on arrhythmias and platelets during acute myocardial ischaemia and reperfusion. *Eur Heart J*, **10**: 235-243, 1989.
- WAISBREN BA. Bacteremia due to gram-negative bacilli other than *Salmonella*. *Arch Intern Med*, **88**: 467-488, 1951.
- WARDLAW AJ, MOQBEL R, CROMWELL O, KAY AB. Platelet-activating factor: a potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J Clin Invest*, **78**: 1701-1706, 1986.
- WATANABE N, OVARY Z. Antigen and antibody detection by *in vivo* methods: a reevaluation of passive cutaneous anaphylactic reactions. *J Immunol Methods*, **14**: 381-390, 1977.

- WEG VB, WATSON ML, CORDEIRO RB, WILLIAMS TJ. Histamine, leukotriene D₄ and platelet-activating factor in guinea pig passive cutaneous anaphylaxis. *Eur J Pharmacol*, **204**: 157-163, 1991.
- WERNIS SW, GRUM CM, VENTURA A, HAHN RA, HO PPK, TOWNER RD, FANTONE JC, SCHORK MA, LUCCHESI BR. Xantine oxidase inhibition does not limit canine infarct size. *Circulation*, **83**: 995-1005, 1991.
- WESTPHAL O. Bacterial endotoxins. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **49**: 1-43, 1975.
- WICHTERMAN KA, BAUE AE, CHAUDRY IH. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*, **29**: 189-201, 1980.
- WIGGERS CJ. Physiology of shock. Nueva York: The Commonwealth Fund, 1950.
- YANG BC, MEHTA JL. Platelet-derived adenosine contributes to the cardioprotective effects of platelets against ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, **24**: 779-785, 1994.
- YASAKA T, BOXER LA, BAEHNER RL. Monocyte aggregation and superoxide anion release in response to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) and platelet-activating factor (PAF). *J Immunol*, **128**: 1939-1944, 1982.
- ZIMMERMAN GA, LORANT DE, McINTYRE TM, PRESCOTT SM. Juxtacrine intercellular signalling: another way to do it. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **9**: 537-577, 1993.
- ZINGARELLI B, SQUADRITO F, IOCOLANO M, ALTAVILLA D, BUSSOLINO F, CAMPO GM, CAPUTI AP. Platelet activating factor interaction with tumor necrosis factor and myocardial depressant factor in splanchnic artery occlusion shock. *Eur J Pharmacol*, **222**: 13-19, 1992.
- ZINGARELLI B, SQUADRITO F, BUSSOLINO F, CALAPAI G, ALTAVILLA D, IOCOLANO M, CAMPO GM, CANALE P, CAPUTI AP. Evidence for a role of platelet activating factor in hypovolemic shock in the rat. *J Lipid Mediators*, **9**: 123-134, 1994.