

FIGURES LEGEND

Figure 1 Scheme of experimental protocol.

Figure 2. Bar graph of platelet-denuded vessel wall interaction as determined by the radioisotopic (^{111}In -labeled platelets) method. Results are expressed as mean values of Platelet Deposition (PD) ($\times 10^6/\text{cm}^2$) \pm SEM. A-B: effects of the different drug regimens on PD triggered by denuded vessel wall under low (A, B) and high (C, D) shear rate conditions. (* $P < 0.05$, significant vs placebo-control group).

Figure 3. Bar graph of platelet-disrupted vessel wall interaction as determined by the radioisotopic (^{111}In -labeled platelets) method. Results are expressed as mean values of Platelet Deposition (PD) ($\times 10^6/\text{cm}^2$) \pm SEM. A-B: effects of the different drug regimens on PD triggered by disrupted vessel wall under low (A, B) and high (C, D) shear rate conditions. (* $P < 0.005$, significant vs placebo-control group; † $P < 0.0001$ vs placebo-control group; ‡ $P < 0.05$ vs clopidogrel treated group;).

Figure 4. Platelet aggregation in vitro in the different animal groups. ADP-induced PRP-aggregation (A, B). Collagen-induced platelet aggregation in PRP (C, D) and whole blood (E, F) (A); (* $P < 0.05$ vs placebo-control; † $P < 0.001$ vs placebo-control).

Figure 5. Effect of ODQ and Carboxy-PTIO on LA816 Mediated Inhibition of Platelet Aggregation. Collagen (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)-induced platelet aggregation (A) was significantly inhibited by LA816 (0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) (B, C). However, LA816 inhibitory effects were abolished in the presence of a nitric oxide radical scavenger (P-TIO; 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) (D) or a selective guanylate cyclase inhibitor (ODQ; 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) (E).

Figure 6. Bar graph and the subsequent representative immunoblot showing RhoA membrane protein expression in platelets before and after LA816 administration in the control group. Results are expressed % of membrane RhoA protein expression vs placebo-controls \pm SEM. (* $P < 0.05$, significant vs placebo-control group).

Figure 7. Haemodynamic values throughout the experiments. Treatment with LA816 only produced a mild, reversible and nonsignificant reduction of blood pressure of 6

mm Hg (\approx 9% reduction vs basal value) (Figure A). No significant effects were noted on heart rate after the intravenous treatment with LA816 (Figure 7B). The most efficacious antithrombotic regime tested (ASA+clopidogrel+LA816) showed a constant blood pressure (Figure C) and heart rate (Figure D) throughout all the experiments. Data are given as percentage of basal value of placebo-control animals (mean basal value: 50 ± 5 mm Hg).

Group	ASA	ASA+Clo	ASA+Clo+LA816	ASA+Clo+LA816+ASA	ASA+Clo+LA816+ASA+Clo	ASA+Clo+LA816+ASA+Clo+LA816	ASA+Clo+LA816+ASA+Clo+LA816+ASA	ASA+Clo+LA816+ASA+Clo+LA816+ASA+Clo	ASA+Clo+LA816+ASA+Clo+LA816+ASA+Clo+LA816
BP (%)	100 ± 5	91 ± 5*	91 ± 5*	91 ± 5*	91 ± 5*	91 ± 5*	91 ± 5*	91 ± 5*	91 ± 5*
HR (%)	100 ± 5	100 ± 5	100 ± 5	100 ± 5	100 ± 5	100 ± 5	100 ± 5	100 ± 5	100 ± 5

TABLE 1**A**

GROUP	CONTROL	LA816	CLOPI	ASA	LA816+ CLOPI	LA816+ ASA	ASA+ CLOPI	LA816+ASA +CLOPI
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$) (5-7)	4.7 \pm 0.03	4.7 \pm 0.03	6.0 \pm 0.4	4.8 \pm 0.1	7 \pm 0.1	4.5 \pm 0.1	4.5 \pm 0.06	4.6 \pm 0.06
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$) (250-450)	420.0 \pm 11.0	380.0 \pm 20	280.0 \pm 10	410.0 \pm 10	300 \pm 10	440 \pm 10	450 \pm 10	430 \pm 20
HCT (%) (25-35)	25.8 \pm 0.2	26.0 \pm 0.3	35.0 \pm 2.3	25.8 \pm 0.6	26.4 \pm 0.2	25.3 \pm 0.5	26.3 \pm 0.1	27.4 \pm 0.2
aPTT ratio	1.9 \pm 0.07	1.6 \pm 0.08	1.8 \pm 0.04	1.5 \pm 0.01	1.7 \pm 0.02	2.0 \pm 0.05	1.6 \pm 0.01	1.6 \pm 0.01
PT (s)	12.8 \pm 0.09	13.6 \pm 0.09*	12.8 \pm 0.04	12.9 \pm 0.04	13.6 \pm 0.07*	15.8 \pm 0.4*	13.2 \pm 0.03	13.9 \pm 0.09*

Table 1. Hematological and coagulation follow up parameters. Red blood cells (RBC); platelets (PLT); hematocrit (HCT); activated partial thromboplastin time (aPTT); prothrombin time (PT). Values are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$. Between brackets normal pig values.

FIGURE 1

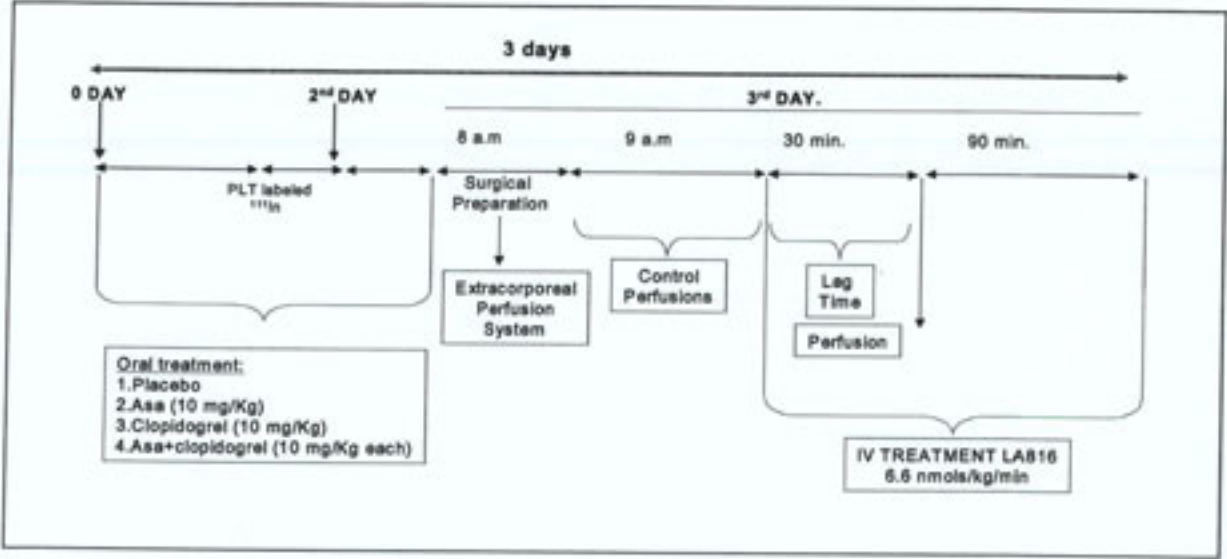


FIGURE 2

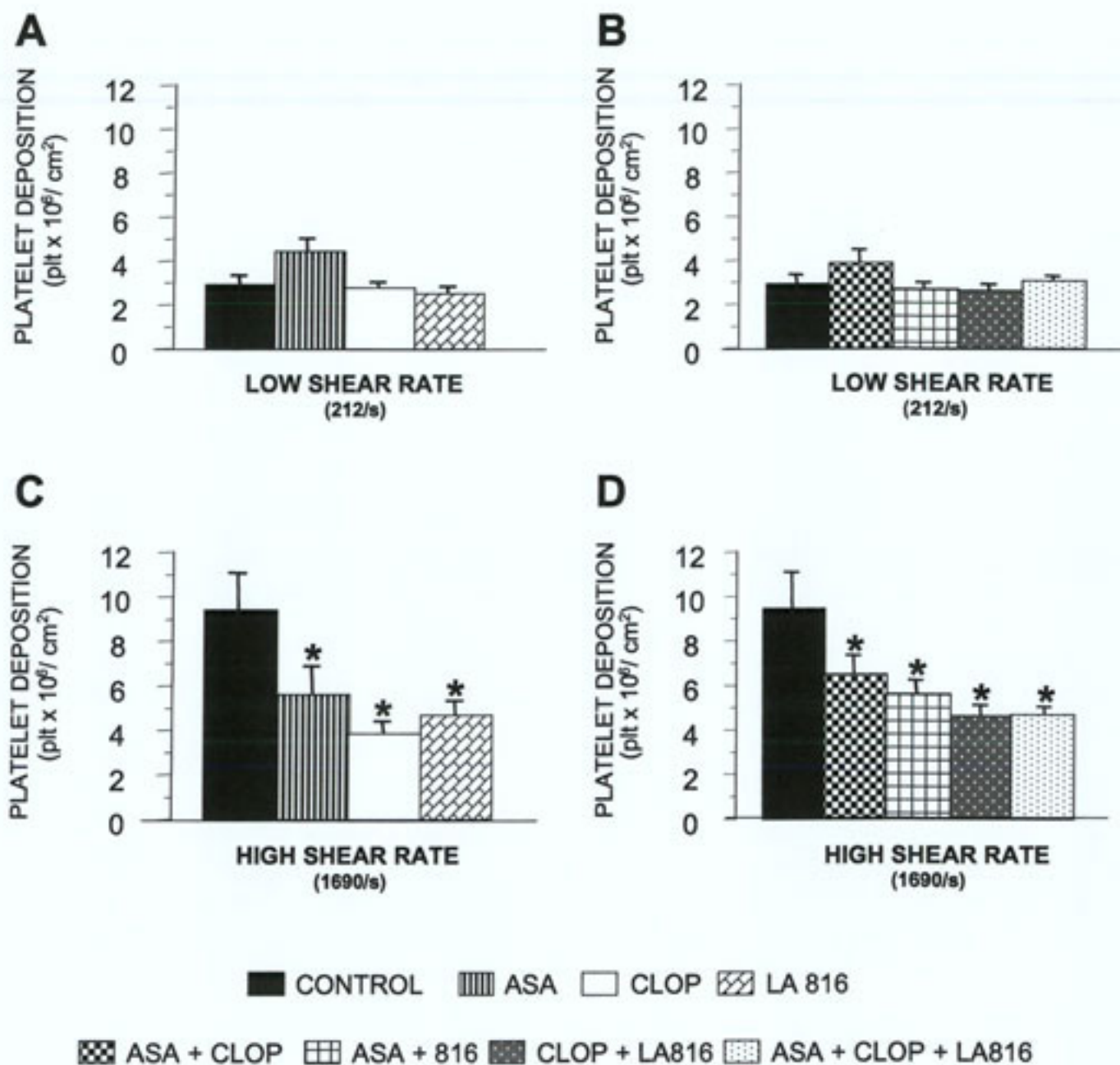


FIGURE 3

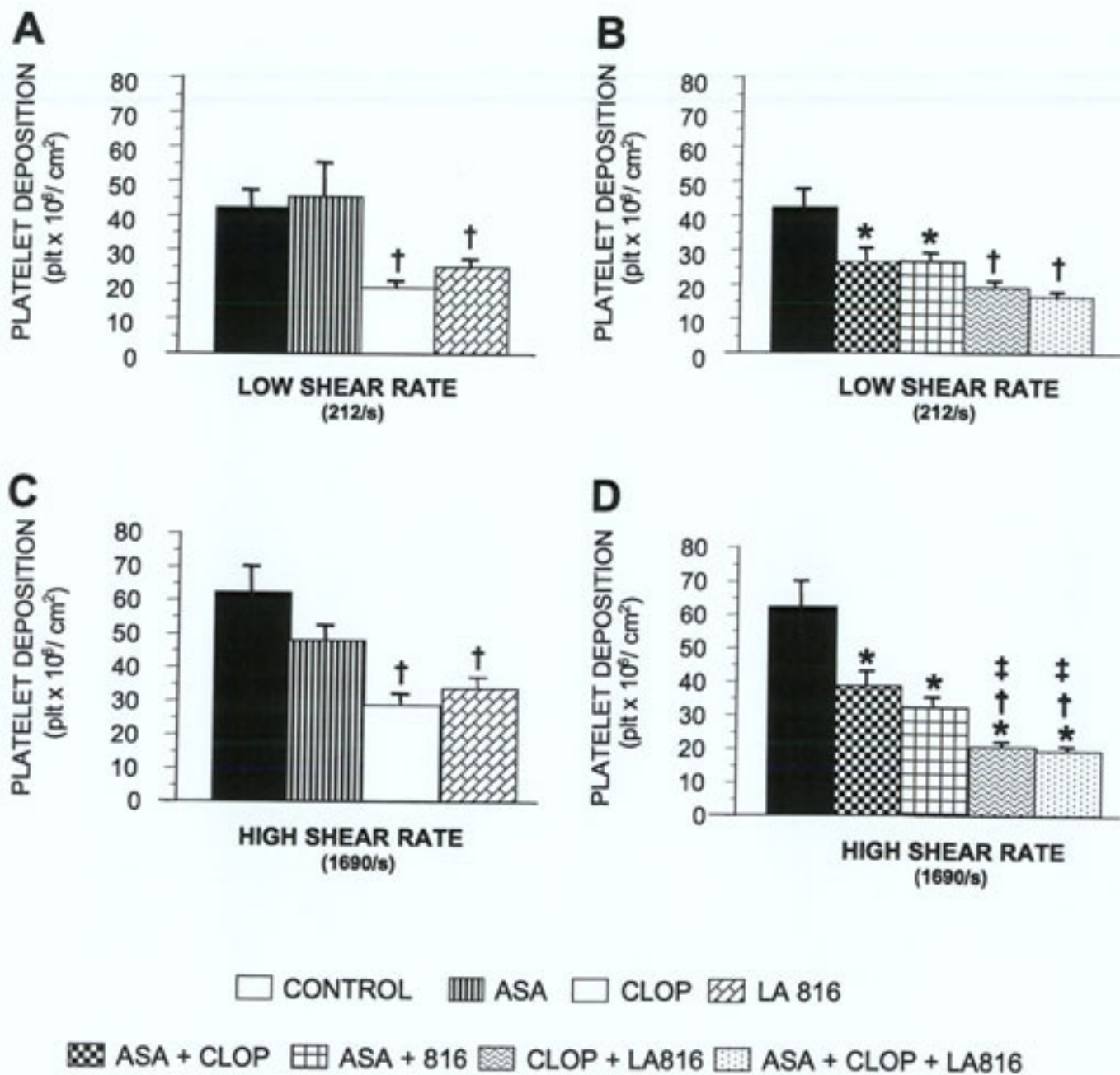


FIGURE 4

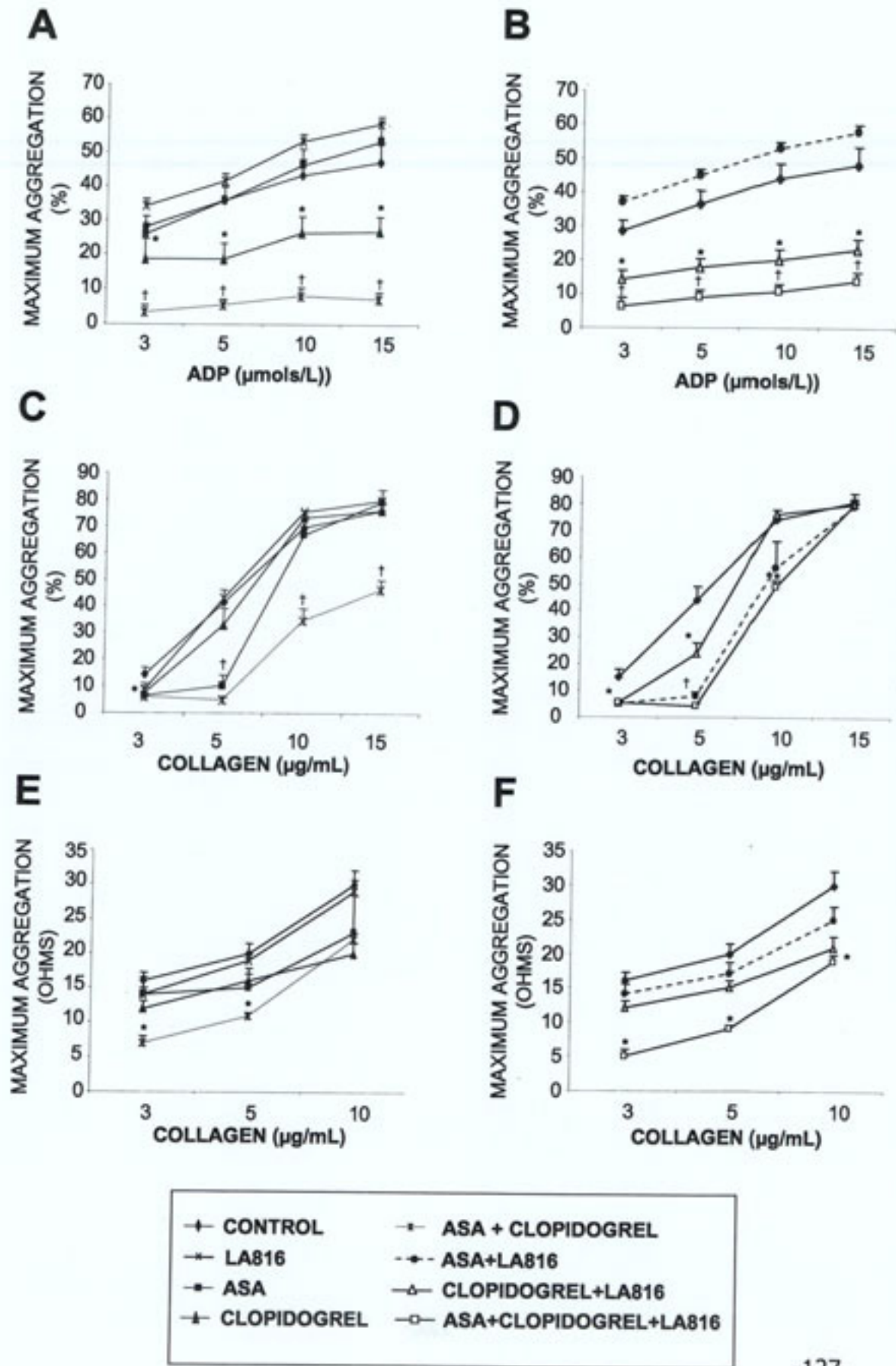


FIGURE 5

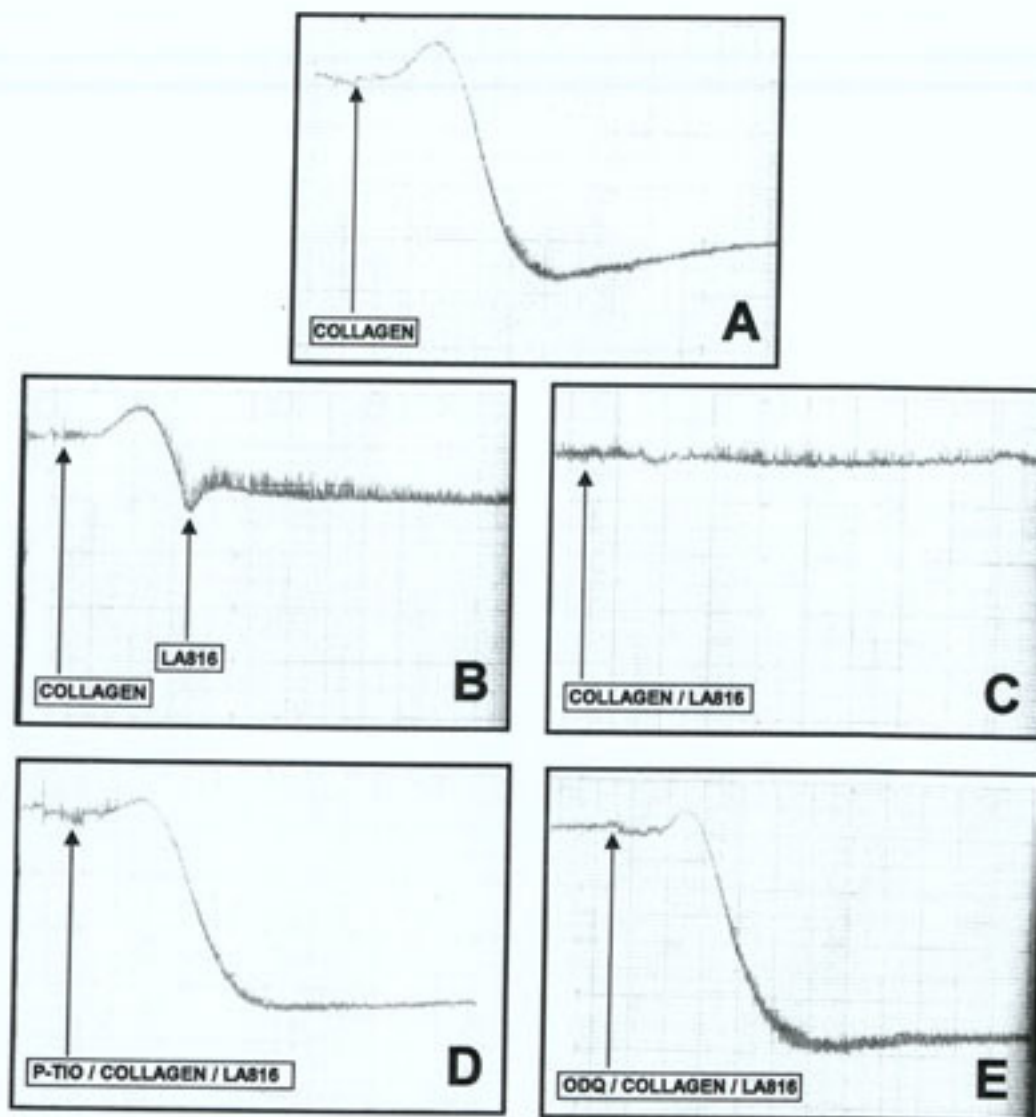


FIGURE 6

A

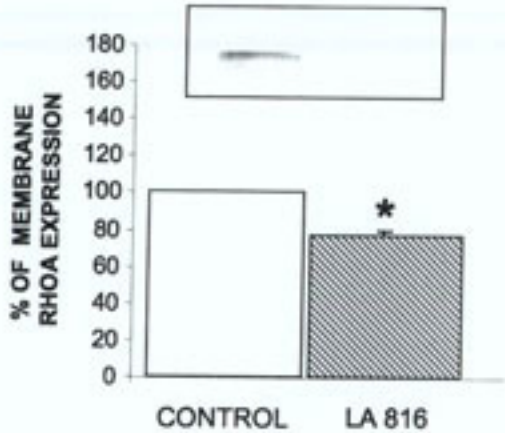
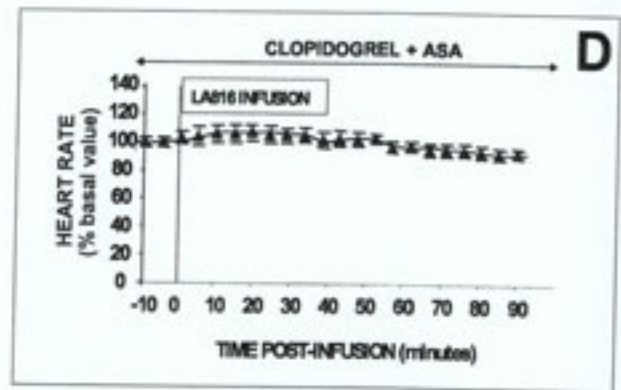
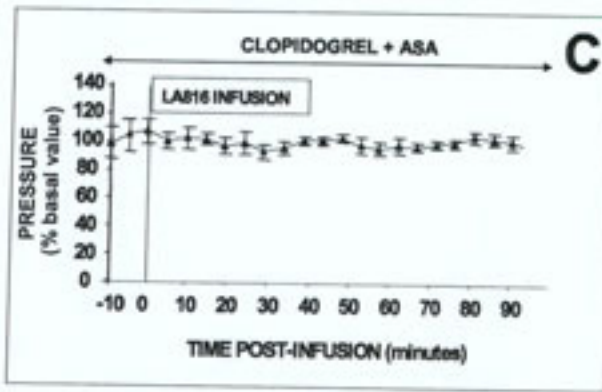
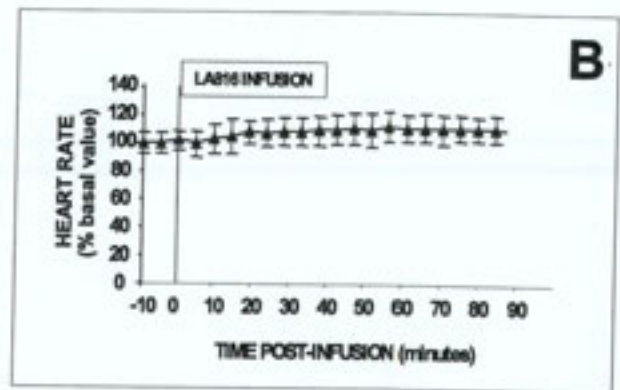
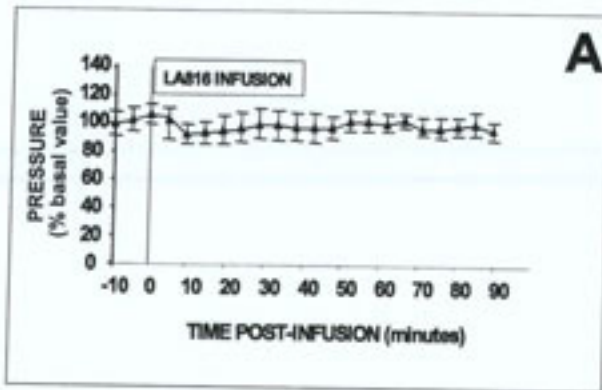


FIGURE 7



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La arteriosclerosis se define como una enfermedad silente que tiene una progresión lenta. Su evolución se prolonga -en la mayoría de los casos- a lo largo de muchos años, durante los cuales la luz arterial va disminuyendo por acumulación de grasas en las células espumosas en la pared, migración y proliferación de SMC que secretan ECM al medio y por la formación de pequeños trombos. Las manifestaciones clínicas de la arteriosclerosis, tales como la angina de pecho, el infarto de miocardio y los accidentes vasculares cerebrales, suponen, de hecho, la mayor causa de muerte en los países occidentales. Dichas patologías están causadas por la reducción del flujo y oxígeno de la sangre al corazón, lo que conlleva la aparición de isquemia local que puede causar graves trastornos e incluso la muerte.

La enfermedad isquémica del corazón presenta fases clínicas bien definidas: asintomática, angina estable, angina progresiva y angina inestable (Kachru R y cols., 2001). Las arterias coronarias de pacientes que sufren angina estable también contienen placas no-obstructivas (interrupción parcial del flujo sanguíneo), las cuales no sólo disminuyen el aporte de oxígeno (isquemia) sino que tienen tendencia a fisurarse o a romperse induciendo trombosis, con el consiguiente riesgo de sufrir síndromes coronarios agudos (angina inestable o infarto agudo de miocardio) (Thadani U. 1999).

En los últimos años, los avances en el conocimiento de los mecanismos que regulan la coagulación sanguínea han sido paralelos a la identificación de nuevos y más eficaces compuestos para el tratamiento farmacológico de la trombosis. Sin embargo y a pesar de tales avances terapéuticos, la trombosis continua teniendo un papel preponderante en la patogénesis de la angina inestable y el infarto agudo de miocardio. Por ello, la atención se centra, actualmente, en la búsqueda de nuevas estrategias antitrombóticas que permitan reducir la morbi-mortalidad coronaria.

La tesis doctoral que se presenta se ha centrado en el estudio de cuatro nuevos fármacos antiplaquetares (saratina, LA419, LA810 y LA816), diseñados con la finalidad de reducir el riesgo trombótico. Los efectos que de su administración derivan podrían contribuir al beneficio clínico de pacientes que han sufrido o tienen riesgo de sufrir patología isquémica coronaria asociada a proceso trombótico, así como de pacientes con enfermedad aterosclerótica sintomática a quienes se les van a realizar intervenciones de revascularización (angioplastia).

La cámara de perfusión Badimon, sistema *ex vivo*, ha sido el diseño experimental utilizado en la presente investigación para evaluar la eficacia de estas nuevas estrategias terapéuticas en la reducción de la deposición plaquetar (formación del trombo). Este sistema, ampliamente utilizado en el área cardiovascular (Badimon L y cols., 1986; Fernández-Ortiz A y cols., 1994; 1997; Badimon JJ et al., 1999; Lev EI y cols., 2004; Osende JI y cols., 2004; Schecter M y cols., 2000), supone un paso obligado para la comprensión de los mecanismos que participan en la trombogénesis (ya que permite modular la mayoría de los parámetros, sobre todo las condiciones de flujo y el sustrato reactivo), así como para la evaluación de posibles agentes antitrombóticos.

La ventaja principal del estudio de la deposición plaquetar en una cámara de perfusión (sistema *ex vivo*) sobre los sistemas de agregación *in vitro*, tales como la turbidimetría (en PRP) o impedancia (sangre total), es que se modelan las condiciones de flujo que existen *in vivo*; así, hay interacciones plaqueta-plaqueta o plaqueta-vaso que sólo ocurren a velocidades de cizalladura determinadas, mientras que en la agregación *in vitro* la velocidad de cizalladura es arbitraria, los agonistas son exógenos y la sangre es recogida en citrato, lo que disminuye la presencia de calcio libre.

En relación a los sistemas *in vivo* (inducción de una lesión vascular que simule la aterosclerosis o una lesión producida tras la rotura de una placa), su principal ventaja es que permiten controlar no sólo la velocidad de cizalladura (determinada por el grosor del canal), sino también el vaso que se expone. Por el contrario, estas mismas variables no pueden ser controladas en los experimentos *in vivo*, ya que no pueden evaluarse los procesos de vasoconstricción y vasorelajación.

En cuanto a posibles inconvenientes de este modelo *ex vivo*, uno de los principales a oponer sería el hecho de que, en los sistemas de perfusión extracorpóreos, es necesario heparinizar al animal para evitar la activación del sistema de coagulación. No obstante, la heparinización controlada, a un nivel determinado de aPTT no altera la deposición de plaquetas ni el fibrinógeno respecto a valores basales (Badimon L y cols., 1986).

PRIMER OBJETIVO

Inhibición de la adhesión plaquetar: saratina.

1. ARTÍCULO I : *Antithrombotic effects of saratin on human atherosclerotic plaques.*

Tras la rotura -espontánea o inducida- de la lesión aterosclerótica, el vWF juega un papel preponderante en la mediación de la adhesión plaquetar a la matriz subendotelial o al colágeno expuesto bajo elevadas condiciones de flujo. Hasta el momento sólo unos pocos estudios, todos ellos en modelos animales, han descrito la eficacia en la inhibición de la interacción plaqueta- vWF para reducir la trombogénesis desencadenada por sistemas proteínicos purificados o por arterias sanas dañadas. Estos estudios incluyen el uso de anticuerpos monoclonales anti-GPIb (Cauwenberghs N y cols., 2000; Cadroy Y y cols., 1994), anticuerpos monoclonales anti- vWF, (Wu D y cols., 2002), VCL (Zahger D y cols., 1995) y otras sustancias derivadas de las glándulas salivares de las sanguijuelas, tales como calin (Deckmyn H y cols., 1995) o LAPP (Schaffer LW y cols., 1993). Dichos inhibidores, a pesar de haber demostrado su eficacia, van asociados a la presencia de efectos secundarios adversos que limitan su uso terapéutico. Así, se ha concluido que los anticuerpos monolonaes anti-GPIb parecen inducir trombocitopenia severa, (Cauwenberghs N y cols., 2000; Schaffer LW y cols., 1993), el VCL prolonga el tiempo de sangrado (McGhie AI y cols., 1994) y el tratamiento local con LAPP no ha demostrado ningún efecto antitrombótico en babuínos (Schaffer LW y cols., 1993). Sin embargo, no nos constan, a fecha de hoy, estudios que valoren el impacto de la inhibición de la adhesión plaquetar en la trombosis arterial desencadenada por placas ateroscleróticas humanas.

Este primer estudio permite poner de manifiesto el importante papel que juega saratina, un inhibidor de la adhesión plaquetar, en la reducción del potencial trombótico desencadenado por lesiones ateroscleróticas humanas bajo determinadas condiciones de flujo.

La saratina (MerkGaC), ya caracterizada por Barnes CS (2001), es una proteína recombinante, aislada de la saliva de la sanguijuela medicinal *Hirudo medicinalis*. La saratina se une al colágeno tipo I o tipo III, impidiendo así su interacción con el dominio

A3 del vWF, el primer paso de la adhesión plaquetar (Maurer T y cols., 2001). La saratina ya ha demostrado su eficacia en reducir adhesión plaquetar, hiperplasia (Smith y cols., 2003) y estenosis luminal (Cruz CP y cols., 2001) en ratas con endarterectomía carotídea. Sin embargo, lo cierto es que hasta ahora la saratina, al igual que los demás inhibidores de la adhesión plaquetar, sólo ha demostrado efectos antiplaquetares en sistemas proteínicos purificados o en lesiones vasculares en vasos sanos, pero nunca en lesiones arterioscleróticas humanas.

Antes de evaluar las propiedades antitrombóticas de la saratina en lesiones ateroscleróticas humanas, nuestro primer objetivo era conocer las concentraciones y condiciones óptimas de incubación del fármaco (temperatura y tiempo de incubación) que redujeran la formación del trombo. Con esta finalidad, incubamos (1, 5 y/o 10 minutos) sustratos porcinos severamente dañados con concentraciones crecientes de saratina (desde 0,03 hasta 2290 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a temperatura ambiente o a 37 °C. Teniendo en cuenta las condiciones obtenidas (concentración óptima de saratina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$; periodo de incubación 5 minutos; temperatura de incubación 37 °C) evaluamos los efectos antitrombóticos de saratina en presencia de diferentes componentes de la placa aterosclerótica. De este modo analizamos, por un lado, la trombosis desencadenada por vasos ligeramente dañados (vasos desendotelizados y estría grasa), tal y como ocurre en las fases tempranas de la enfermedad arterial y por otro, la trombosis inducida por daño arterial severo (pared vascular severamente desgarrada y placa aterosclerótica), tal y como tiene lugar tras intervenciones mecánicas o tras rotura de la placa aterosclerótica. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento local con saratina reduce el potencial trombotico de vasos humanos con distintos grados de lesión aterosclerótica, a saber, produce una reducción en la deposición plaquetar del 44% en vasos desendotelizados, del 47% en vasos con presencia de estrías grasa, del 51% vasos mecánicamente dañados y del 57% en placas ateroscleróticas en comparación con vasos sanos (no tratados) a velocidades de cizalladura típicos de vasos moderadamente estenóticos (800/s). Nuestros resultados indican, que el bloqueo por parte de la saratina de la interacción entre el colágeno tipo I/III y el dominio A3 del vWF es más eficaz en lesiones ateroscleróticas avanzadas. De hecho, ya se ha sido descrito que, a medida que progresa la lesión aterosclerótica vascular, se da un aumento simultáneo del colágeno tipo I y III (Yang F y cols., 1998; Barnes MJ & Farndale RW, 1999).

A velocidades de flujo más elevadas (1700 y 3400/s) la saratina no reduce la trombosis desencadenada por lesiones ateroscleróticas humanas. Estos resultados sugieren la existencia de un estímulo trombogénico, distinto del colágeno, que induce la formación de trombo. Sin embargo, para cerciorarnos que la ausencia de reducción plaquetar no era debida al desprendimiento de la saratina, evaluamos su efecto antitrombótico sobre superficies recubiertas exclusivamente con colágeno fibrilar. Tal y como esperábamos, observamos que, a mayor flujo, mayor es el papel del vWF en la adhesión plaquetar; es decir, a 800/s el efecto inhibitor de la saratina alcanza un 75% mientras que a 3400/s es del 94%. Sin embargo, es preciso remarcar que el vWF ha demostrado participar en un amplio rango de flujos; así, mientras que en monocapas de colágeno purificado los efectos adherentes dependientes del vWF son evidentes en flujos típicos de la microcirculación (>1000 /s), (Sugimoto M y cols., 1999), en sustratos vasculares porcinos nuestro grupo ha demostrado previamente que los efectos del vWF también se observan en flujos bajos típicos de vasos mayores (200 a 400/s) (Badimon L y cols., 1989).

Atendiendo a estos datos, nuestros resultados sugieren que la trombosis desencadenada por vasos ateroscleróticos humanos a altas velocidades de flujo no es tan dependiente del vWF como en el caso del colágeno purificado. De hecho, nuestro grupo ha demostrado en estudios previos que la inhibición de la trombina es una vía altamente efectiva para reducir la trombosis desencadenada por superficies altamente trombogénicas (Badimon JJ y cols., 1999). Es más, recientemente se ha descrito que el uso de ximelagatran (un inhibidor directo de la trombina) reduce la trombosis (85% reducción) desencadenada por pared porcina dañada a velocidades de flujo de 1700/s (Sarich TC y cols., 2004) en el mismo sistema de cámaras de perfusión que el usado para evaluar el efecto de la saratina.

Otro aspecto de los resultados obtenidos que merece especial atención es que los efectos de la saratina, en lesiones ateroscleróticas humanas, son significativos a flujos típicos de la circulación coronaria. Tal y como ya se ha descrito previamente (Turitto VT. 1982; Nerem RM y cols., 1981) las arterias sanas (no obstruidas) presentan flujos que oscilan entre 106-500/s, mientras que valores más altos corresponden a valores típicos de arterias coronarias moderadamente estenóticas. De hecho, la mayor prevalencia de síndromes coronarios agudos dependientes de trombosis ocurre en arterias coronarias moderadamente estenóticas (Fuster V y cols., 1990), mientras que valores muy altos de flujo (entre 1700 y 3400) son valores que normalmente se encuentran en la

microcirculación, pero no en vasos arteriales. Además, la presencia de estenosis severa, que teóricamente debería producir flujos muy elevados, va asociada a vasodilatación distal compensatoria, que reduce el flujo y consiguientemente, la velocidad de cizalladura (Gould KL y cols., 1975).

Finalmente, el análisis histológico convencional y el análisis inmunohistoquímico permiten caracterizar la lesión aterosclerótica y refuerzan los resultados de deposición plaquetar previamente observados.