

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

TESIS DOCTORAL

Autor: M^a DOLORES SANCHEZ ESQUINAS

" EFECTOS CARDIOVASCULARES DE UNA NUEVA DIHIDROPIRIDINA CON
PROPIEDADES PAF-ANTAGONISTAS"

Directores: Prof. Dr. Juan Tamargo Menéndez
Dra. M. A. González Morales

Ponente: Sr. Dr. _____

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. Angel Villar del Fresno

Vocal: Sr. Dr. Jose Jimenez

Vocal: Sr. Dr. M^o Teresa Tapelina

Vocal: Sr. D. Francisco Jugoza

Secretario: Sr. Dr. Luciano Benedi

ABREVIATURAS

AA: Acido araquidónico.
AMPc: 3',5'-Fosfato cíclico de adenosina.
ANF: Factor natriurético auricular.
APA: Amplitud del potencial de acción.
ATP: Trifosfato de adenosina.
A-V: Aurículoventricular.
BCCa: Bloqueante de los canales de Ca^{2+} .
BSA: Albúmina bovina sérica.
CO: Ciclooxygenasa.
CoA-IT: Coenzima A independiente.
DAG: Diacilglicerol.
DHPs: Dihidropiridinas.
DMSO: Dimetilsufóxido.
DNP-BSA: 2,4-Dinitrofenil-BSA.
DPA: Duración del potencial de acción.
Em: Potencial de membrana.
ECG: Electrocardiograma.
E.E.M.: Error estandar de la media.
FC: Frecuencia cardíaca.
fMLP: Formil-metil-leucil-fenilalanina.
GTP: Guanosina 5-trifosfato.
 I_{Ca} : Corriente lenta de entrada de Ca^{2+} .
 I_{Na} : Corriente rápida de entrada de Na^+ .
IgE: Inmunoglobulina E.
IgG: Inmunoglobulina G.
IL: Interleukina.
ISP: Isoproterenol.
LO: Lipoxigenasa.
LPS: Lipopolisacáridos.
LT: Leucotrieno.
MBP: Major basic protein.
MDF: Factor depresor del miocardio.
NA: Noradrenalina.
NO: Oxido nítrico.

iNOS: Oxido nítrico sintasa inducible.
O₂⁻: Anión superóxido.
OH⁻: Anión hidroxilo.
PAD: Presión arterial diastólica.
PAF: Factor activador de plaquetas.
PAM: Presión arterial media.
PAS: Presión arterial sistólica.
PE: Fosfatidiletanolamina.
PEG: Polietilenglicol.
PG: Prostaglandina.
PI: Fosfatidilinositol.
P₃I: Fosfatidilinositol trifosfato.
PKC: Protein cinasa C.
PLA₂: Fosfolipasa A₂.
PLC: Fosfolipasa C.
PMNs: Leucocitos polimorfonucleares.
PMSF: Fenilmetilfluorofosfato.
PR: Potencial de reposo.
PRE: Período refractario efectivo.
SA: Nodo sinoauricular.
SAO: Shock inducido por oclusión de la arteria esplécnica.
SHR: Rata espontáneamente hipertensa.
TNF: Factor de necrosis tumoral.
TR: Tiempo de recuperación.
V_{máx}: Velocidad máxima de despolarización.

ÍNDICE

INDICE

I INTRODUCCION

1	FACTOR ACTIVADOR PLAQUETARIO (PAF)	8
1.1.	SINTESIS DE PAF	9
1.1.1.	Vía de la Remodelación	9
1.1.2.	Biosíntesis de Novo	10
1.2.	DEGRADACION DE PAF	11
1.3.	RECEPTORES DE PAF	11
1.4.	ACCIONES DEL PAF SOBRE LAS CELULAS SANGUINEAS	13
1.4.1.	Plaquetas	13
1.4.2.	Leucocitos	13
1.4.3.	Macrófagos y Monocitos	14
1.4.4.	Linfocitos	14
1.4.5.	Eosinófilos	14
1.4.6.	Células endoteliales	15
1.5	ACCIONES FARMACOLOGICAS DEL PAF	15
1.5.1.	Aparato Cardiovascular	15
1.5.1.1.	Efectos cardíacos	15
1.5.1.2.	Efectos vasculares	17
1.5.2.	Aparato Respiratorio	20
1.5.3.	A nivel Renal	21
1.5.4.	Aparato Gastrointestinal	21
1.5.5.	Inflamación	22
1.5.6.	Respuesta Inmune	23
2	ANTAGONISTAS DE PAF	23
2.1.	INHIBIDORES NO ESPECIFICOS	24
2.2.	INHIBIDORES ESPECIFICOS	24
2.2.1.	Antagonistas Afines al PAF	24
2.2.1.1.	De cadena abierta	25
2.2.1.2.	De cadena cíclica	27
2.2.1.3.	Derivados tetrahidrofuranos	28
2.2.2.	Productos Naturales	28

	2.2.2.1. Terpenos	29
	2.2.2.2. Lignanos	30
	2.2.2.2.1. Neolignanos benzofuranoides	30
	2.2.2.2.2. Lignanos furanoides sustituidos	31
	2.2.2.2.3. Lignanos dibencilbutirolactonas	32
	2.2.2.3. Gliotoxinas y productos análogos	33
	2.2.3. Estructuras Sintéticas	33
	2.2.4. Agentes Farmacológicos	35
	2.2.4.1. Hetrazepinas	35
	2.2.4.2. Bloqueantes de los canales de calcio	37
3	CANALES DE CALCIO Y PAF	37
	3.1. CANALES DE Ca ²⁺ ACTIVADOS POR RECEPTORES	38
	3.2. CANALES DE Ca ²⁺ ACTIVADOS POR CAMBIO DE VOLTAJE	39
	3.2.1. Canales tipo-L	39
	3.2.2. Canales tipo-P	40
	3.2.3. Canales tipo-N	40
	3.2.4. Canales tipo-T	40
	3.2.5. Otros canales de Ca ²⁺	41
	3.3. MECANISMO DE ACCION DE LAS DIHIDROPIRIDINAS	42
II	JUSTIFICACION DE LA TESIS	48
III	MATERIAL Y METODOS	
1	ESTUDIOS REALIZADOS IN VITRO	50
	1.1. REGISTRO DE LA FUERZA CONTRACTIL EN LA AORTA AISLADA DE CONEJO	50
	1.1.1. Montaje de la preparación	50
	1.2. REGISTRO DE LA FUERZA CONTRACTIL EN LA ARTERIA CORONARIA AISLADA DE CERDO	51
	1.2.1. Montaje de la preparación	51
	1.3. REGISTRO DE LA FUERZA CONTRACTIL EN LA AURICULA AISLADA DE COBAYA	51
	1.3.1. Registro de la contractilidad auricular	51
	1.3.2. Montaje de la preparación	52
	1.3.3. Protocolos utilizados	52
	1.3.3.1. Estudios de inotropismo y cronotropismo auricular	52
	1.3.3.2. Interacción con Isoproterenol (ISP) en aurículas izquierdas	52

1.4.	REGISTRO DEL FLUJO DE ^{46}Ca	52
1.5.	REGISTRO DE LA CONTRACTILIDAD VENTRICULAR, DEL ELECTROGRAMA DEL HAZ DE HIS Y DEL ELECTROGRAMA PERIFERICO EN CORAZONES AISLADOS Y PERFUNDIDOS DE RATA	53
1.5.1.	Sistemas de estimulación y registro	54
1.5.2.	Montaje de la preparación y colocación de los electrodos	55
1.6.	REGISTRO DE LOS POTENCIALES DE ACCION EN FIBRAS MUSCULARES AURICULARES Y VENTRICULARES DE COBAYA	56
1.6.1.	Protocolos utilizados	56
1.6.1.1.	Registro de potenciales de acción auriculares y ventriculares	56
1.6.1.2.	Registro de potenciales de acción lentos (Ca^{2+} -dependientes)	57
1.7.	ESTUDIOS DE DESPLAZAMIENTO DEL BINDING DE [^3H]-NITRENDIPINO EN ILEON Y MUSCULO CARDIACO DE COBAYA	57
2	ESTUDIOS REALIZADOS IN VIVO	58
2.1.	MEDIDA DE LA PRESION ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA EN RATA ANESTESIA DA	58
2.1.1.	Aparato y sistema de registro utilizados	58
2.1.2.	Montaje de la preparación	58
2.2.	HIPOTENSION INDUCIDA POR PAF EN RATA ANESTESIADA	59
2.2.1.	Montaje de la preparación	59
2.3.	MODELOS DE SHOCK	60
2.3.1.	Hipotensión inducida por inmunoagregados de Inmunoglobulina G (IgG) en rata anestesiada	60
2.3.2.	Shock endotóxico inducido por lipopolisacáridos de <i>Salmonella typhosa</i>	60
2.3.3.	Shock inducido por isquemia-reperfusión intestinal tras oclusión de la arteria esplénica (Shock SAO)	60
3	FARMACOS UTILIZADOS	61
4	METODO ESTADISTICO	62
IV	RESULTADOS	
1	ESTUDIOS REALIZADOS IN VITRO	64
1.1.	EFFECTOS VASCULARES	64
1.1.1.	Contracción inducida en la aorta aislada de conejo con 35 mM de KCl	64
1.1.2.	Contracción inducida en la arteria coronaria izquierda aislada de cerdo con 35 mM de KCl	67
1.2.	EFFECTOS CARDIACOS	72
1.2.1.	Efectos inotrópicos y cronotrópicos en la aurícula aislada de cobaya	72

1.2.2.	Efectos sobre la captación de ⁴⁵ Ca en aurículas aisladas de cobaya	75
1.2.3.	Efectos electromecánicos en el corazón aislado y perfundido de rata	76
1.2.4.	Efectos electrofisiológicos del PCA-4248 en músculos auriculares y ventriculares de cobaya	81
1.2.4.1.	Potenciales de acción auriculares	81
1.2.4.2.	Potenciales de acción ventriculares	82
1.2.4.3.	Efectos del PAF sobre los potenciales de acción ventriculares: Interacción con PCA-4248	84
1.2.4.4.	Potenciales de acción lentos (Ca-dependientes) en músculo papilar de cobaya	85
1.3	ACTIVIDAD SOBRE OTROS RECEPTORES	86
1.3.1.	Actividad sobre el receptor α -adrenérgico	86
1.3.2.	Actividad sobre el receptor β -adrenérgico	88
1.3.3.	Actividad sobre canales de Ca ²⁺	90
2	ESTUDIOS REALIZADOS IN VIVO	93
2.1.	EFFECTOS HEMODINAMICOS EN RATAS	93
2.1.1.	Ratas normotensas	93
2.1.2.	Ratas espontáneamente hipertensas	97
2.2.	HIPOTENSION INDUCIDA POR PAF	103
2.2.1.	Protección de la hipotensión inducida por PAF	103
2.2.2.	Reversión de la hipotensión inducida por PAF	111
2.3.	MODELOS DE SHOCK	115
2.3.1.	Protección de la hipotensión inducida por inmunoagregados solubles de IgG	115
2.3.2.	Reversión de la hipotensión inducida por inmunoagregados solubles de IgG	120
2.3.3.	Shock endotóxico inducido por lipopolisacáridos de <i>Salmonella typhosa</i>	124
2.3.4.	Shock inducido por isquemia-reperfusión intestinal tras oclusión de la arteria esplécnica (Shock SAO)	128
V	DISCUSION	
1	ESTUDIOS REALIZADOS IN VITRO	135
1.1.	EFFECTOS EN PREPARACIONES AISLADAS	135
1.2.	EFFECTOS ELECTROFISIOLOGICOS	137
1.2.1.	Efectos del PCA-4248 sobre los cambios electrofisiológicos inducidos por el PAF en fibras musculares ventriculares	138
2	ESTUDIOS REALIZADOS IN VIVO	139

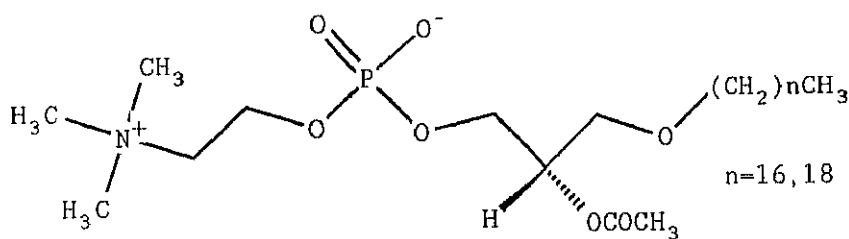
3	MODELOS DE SHOCK	141
3.1.	SHOCK INDUCIDO POR INMUNOAGREGADOS SOLUBLES DE IgG	141
3.2.	SHOCK ENDOTOXICO INDUCIDO POR LPS DE SALMONELLA TYPHOSA	143
3.3.	SHOCK INDUCIDO POR ISQUEMIA-REPERFUSION INTESTINAL (SHOCK SAO) ...	146
VI	CONCLUSIONES	150
VII	BIBLIOGRAFIA	153

INTRODUCCIÓN

1. FACTOR ACTIVADOR PLAQUETARIO (PAF).

El término Factor de Activación Plaquetaria o PAF fue primeramente propuesto por Benveniste en 1972 para designar una nueva sustancia liberada por los basófilos de conejo sensibilizados con inmunoglobulina E (IgE) que presentaban potentes acciones agregantes plaquetarias.

En 1979, este autacoide de naturaleza fosfolipídica fue identificado por tres grupos de investigadores (Benveniste y cols; Blank y cols; Demopoulos y cols) a partir de un plasminógeno natural de bovino. La síntesis definitiva del producto estableció la estructura del PAF como 1-O-alkil-2-acetil-sn-gliceril-3-fosfocolina (Figura 1) (Godfroid y cols, 1980).



FACTOR DE ACTIVACION PLAQUETARIA

Figura 1.

Con respecto a la composición de la cadena 1-O-alkil aún existen controversias. Algunos autores sólo han encontrado 1-O-hexadecil-PAF en neutrófilos estimulados (Keith y cols, 1984), mientras que otros han descrito la existencia de cadenas alquil 16:0, 17:0 y 18:1 (Oda y cols, 1985).

Los estudios realizados con análogos del PAF han permitido establecer la relación estructura-actividad. Para que esta sustancia sea activa se requiere la existencia de una unión éter en la primera cadena alquímica, un grupo acetilo en posición 2 y que el ácido graso de la posición 2 sea de cadena corta y se encuentre unido en esa posición mediante un enlace éster. La distancia entre el grupo fosforil y el N⁺ es de suma importancia, ya que aumentos de esta distancia disminuyen su eficacia (Braquet y cols, 1987).

El PAF es un mediador lipídico que parece estar implicado en multitud de procesos fisiológicos, tales como el asma, shock, sepsis, anafilaxia, isquemia miocárdica y cerebral, enfermedad renal, ovoimplantación, rechazo de transplantes y en una gran variedad de procesos inflamatorios (Braquet y cols,

1987). Entre las células capaces de sintetizarlo se encuentran plaquetas, leucocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales. Este autacoide no se acumula en estas células, sino que se sintetiza y libera en respuesta a un estímulo.

1.1. SINTESIS DE PAF.

La formación del enlace O-alkil a partir de los fosfolípidos de membrana es el primer paso en la síntesis de PAF, que es catalizado por un enzima microsomal, la alkil-DHAP-sintetasa, dando lugar a la formación de alkil-ácil-glicerofosfocolina o diácil-glicerofosfocolina. A partir de este compuesto, la biosíntesis de PAF puede seguir dos rutas metabólicas:

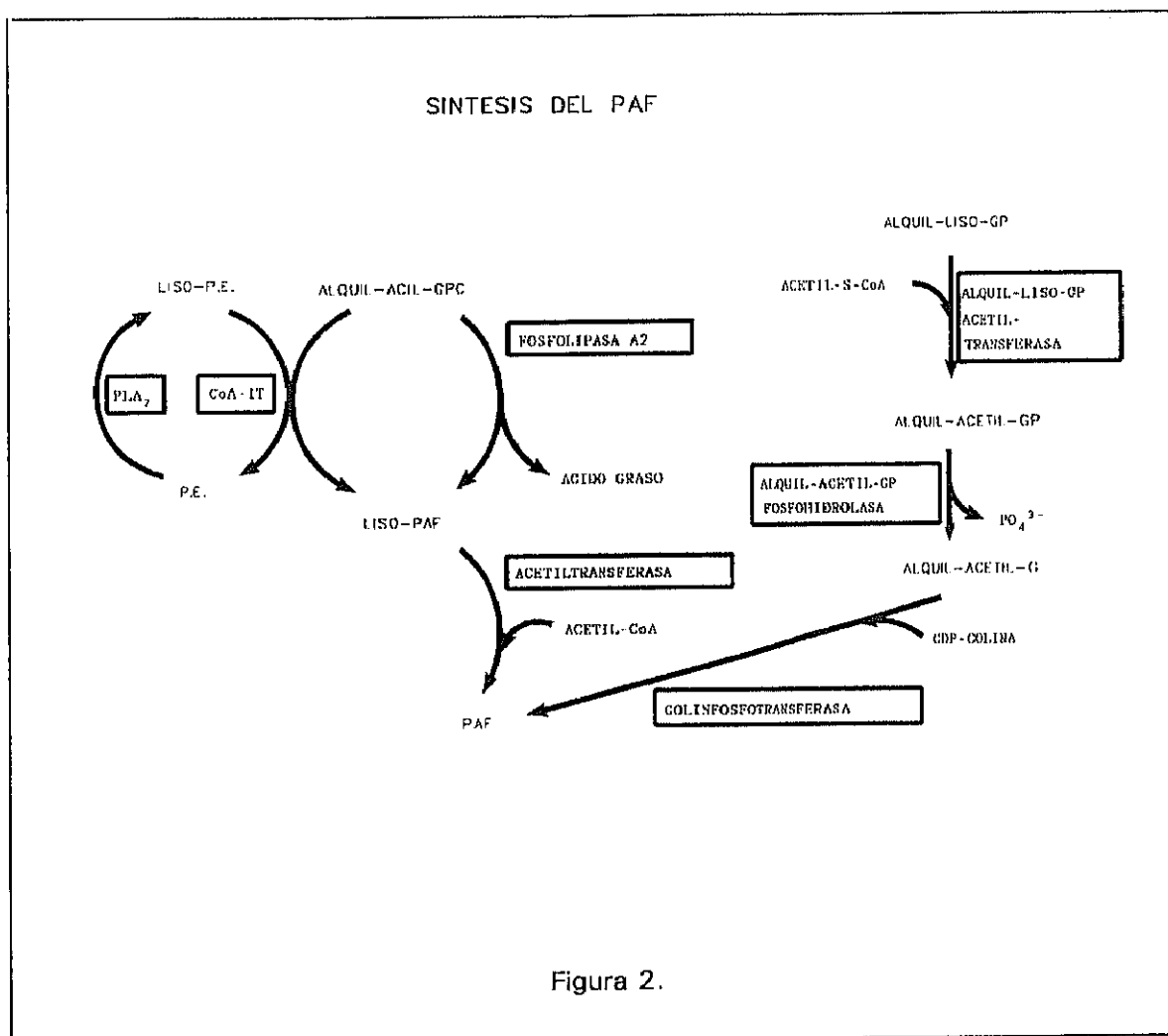
1.1.1 VIA DE LA REMODELACION.

Esta ruta metabólica fue la primera vía de síntesis que se describió y la más importante, ya que está implicada en varios procesos inflamatorios, alérgicos y anafilácticos (Figura 2). Se inicia a través de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), que hidroliza el grupo araquidonato de la posición sn-2 de los fosfolípidos de colina, generando el compuesto 1-O-alkil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina o liso-PAF, que carece de actividad biológica y la liberación ácido araquidónico (AA) (Chilton y cols, 1984). El liso-PAF, entonces, puede ser acetilado en presencia de acetil-CoA por una acetiltransferasa, para formar PAF (Wykle y cols, 1980; Holland y cols, 1992). La actividad de la acetiltransferasa aumenta a medida que se incrementan los niveles de Ca²⁺ intracelular. La actividad de la PLA₂ es regulada también por el Ca²⁺ intracelular, por las proteínas de la familia de las lipocortinas (Touqui y cols, 1986), por la cantidad de ácidos grasos disponibles y por la presencia de metabolitos de la ciclooxigenasa (CO) y lipoxigenasa (LO).

La PLA₂ no sólo actúa sobre fosfolípidos de colina, sino que también puede hidrolizar fosfolípidos de etanolamina. La acción de la PLA₂ sobre un fosfolípido de etanolamina, que en posición C₂ contenga AA, parece ser una vía implicada en la síntesis de PAF. Venable y cols (1993) han demostrado en neutrófilos estimulados la existencia de una transacilasa CoA-independiente (CoA-IT) implicada en la síntesis de PAF y ha propuesto un modelo de síntesis (Figura 2) en el que la PLA₂ actúa sobre el fosfolípido de etanolamina para liberar AA y lisofosfatidiletanolamina (liso-PE). Una vez formado el liso-PE, la transacilasa CoA-IT transfiere el AA del fosfolípido de colina al liso-PE, actuando como un aceptor de AA, y liberándose liso-PAF, compuesto que posteriormente será acetilado por la acetiltransferasa para formar PAF. La actividad de la transacilasa CoA-IT aumenta en presencia de lisofosfolípidos generados por la acción de la PLA₂. Por tanto, la PLA₂ es el primer paso para la iniciación de la síntesis de PAF, pero puede no actuar directamente sobre el fosfolípido de colina (Venable y cols, 1993).

1.1.2. BIOSINTESIS DE NOVO.

En esta vía, 1-O-alkuil-sn-glicero-3-fosfato es acetilado por un enzima, la acetiltransferasa, para formar 1-O-alkuil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfato. Sobre este compuesto actúa una fosfohidrolasa para producir 1-O-alkuil-2-acetil-sn-glicerol, que puede ser convertido en PAF en presencia de la colinofosfo-transferasa (Figura 2). Los enzimas que intervienen en esta síntesis están regulados por la disponibilidad del sustrato (Blank y cols, 1988).



1.2. DEGRADACION DE PAF.

Paralelamente a la ruta de activación o formación de PAF se produce su inactivación por hidrólisis del residuo acetilo en la posición sn-2. Esta reacción está catalizada por la acetilhidrolasa, perteneciente a la familia de las fosfolipasas. Este enzima es específico para cadenas cortas de ácidos grasos sn-2 pero independiente de los niveles de Ca^{2+} (Blank y cols, 1981) y está presente en compartimentos citosólicos y extracelulares y especialmente en el plasma. La forma plasmática está estrechamente asociada con lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y HDL respectivamente), pero es sintetizada y liberada independientemente de las apolipoproteínas (Stafforini y cols, 1987).

Después de que el PAF es inactivado, el liso-PAF resultante es reaclado por una de las tres rutas siguientes: una acetiltransferasa CoA-dependiente, una transacilasa CoA-dependiente o una transacilasa CoA-IT, introduciendo un ácido graso de cadena larga en posición sn-2. El 1-O-alkil-2-O-acilGPC se incorpora en la membrana, completándose el ciclo (Touqui y cols, 1985).

1.3. RECEPTORES DE PAF.

La existencia de sitios de unión específicos para el PAF en membranas celulares surgió tras observar que: 1) el estereoisómero (R) era efectivo en estimular la agregación y degranulación de plaquetas y neutrófilos; 2) eran necesarias concentraciones de PAF del orden de 0.1 nM para desencadenar efectos biológicos, apareciendo una desensibilización de los tejidos cuando se exponían por segunda vez al mediador; 3) los antagonistas de PAF podían inhibir sus efectos (Vargaftig y Benveniste, 1983); 4) había una buena correlación entre la concentración de antagonistas del PAF que bloqueaban sus respuestas biológicas y la unión de [^3H]PAF (Valone, 1987).

La existencia de receptores específicos para PAF ha sido demostrada mediante estudios de fijación de [^3H]PAF (Valone y cols, 1982). Los receptores de alta afinidad han sido demostrados en plaquetas de conejo y humanas, monocitos, polimorfonucleares (PMNs) y membranas plasmáticas de células de distintos tejidos. La afinidad y el número de sitios de unión es dependiente del tipo de célula, tejido y especie animal. Se ha comprobado que las plaquetas de conejo son más sensibles al PAF que las humanas, ya que estas últimas presentan menor número de sitios de unión. Sin embargo, las plaquetas de rata son totalmente refractarias al PAF ya que carecen de sitios de unión (Iñarrea y cols, 1984a).

La unión del PAF a su receptor es saturable, temperatura y concentración dependiente y es regulada por cationes monovalentes, divalentes y GTP. Así, puede ser bloqueada por Na^+ y Li^+ , mientras que K^+ , Cs^+ , Rb^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Mn^{2+} aumentan su unión. La presencia de GTP también la inhibe, lo que sugiere que el receptor de PAF está asociado al sistema de adenilato ciclasa a través de una proteína G

inhibitoria que regula los niveles de AMPc (Hwang y cols, 1986).

La utilización de análogos de PAF ha permitido establecer un posible modelo de los sitios de unión de alta afinidad para el autacoide (Heymans y cols, 1981; Vargaftig y Benveniste, 1983; Braquet y Godfroid, 1986; Ohno y cols, 1986). Tres interacciones son de particular importancia para el proceso de unión:

- a) El ácido graso de cadena larga del PAF se internaliza en la membrana en un área hidrofóbica, intercambiando enlaces con la vecindad.
- b) La activación de la membrana posiblemente deriva de una transferencia electrónica de los dobles enlaces del oxígeno de la función heteróxido a un lugar denominado "diana", presente dentro de la membrana (probablemente una subunidad de la proteína G). La presencia de dobles enlaces no deslocalizados podrían ser necesarios para una posible protonación del sitio activo o "diana".
- c) La corta cadena unida al C₂ puede formar parte del anclaje del PAF a su receptor.

Tras la activación del lugar "diana" o proteína receptoral, se desencadenan dos fenómenos:

- La hidrólisis de GTP y activación de la fosfolipasa C (PLC), que pondría en marcha el ciclo del fosfatidil inositol (PI), liberando inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), que actúa como segundo mensajero e induce movilización de Ca²⁺ de sus depósitos internos y diacilglicerol (DAG). El DAG, por otro lado, puede producir la activación de la proteína cinasa C (PKC) y la fosforilación de proteínas específicas, que también estarían implicadas en la movilización de Ca²⁺ intracelular.
- La internalización del complejo PAF-receptor por un mecanismo desconocido, que podría ser activo y/o pasivo. El PAF sería desactivado por la acetilhidrolasa citosólica, transformándose en liso-PAF, que por acilación del grupo hidroxilo en posición 2-R por acción de la acetiltransferasa, da lugar a alquil-acilglicerilfosfolina, que entraría a formar parte de la membrana celular como un fosfolípido estructural.

Ensayos realizados con antagonistas de PAF carentes de un polo catiónico utilizando mapas electrostáticos tridimensionales llevaron a establecer un nuevo modelo sobre el receptor de PAF (Dive y cols, 1989). Los autores proponen la existencia de un cilindro bipolarizado que posee un "pocket" hidrofóbico y dos áreas de potencial electrostático positivo separados por una distancia de 10-12Å. Los antagonistas funcionan generando potencial electrostático negativo cuando se unen al receptor, formando

una nube electrostática de 180°. A este efecto se le ha denominado "Cache-oreilles" (Dive y cols, 1989), pero no se adecua totalmente con la estructura del PAF.

Estudios recientes de la relación estructura-actividad (Batt y cols, 1991) han modificado algo el modelo anterior. Proponen la existencia de dos "pockets" hidrofóbicos situados en lugares opuestos, pero sólo uno de ellos es el responsable del efecto agonista. Las zonas de potencial negativo constituirían una región única y flexible a lo largo de todo el cilindro (de 10-14Å de diámetro), concordando con la idea de heterogeneidad y flexibilidad que ha de poseer un receptor de membrana (Batt y cols, 1991). Además, el análisis de la secuencia del receptor de PAF ha demostrado que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G (Honda y cols, 1991).

1.4. ACCIONES DEL PAF SOBRE LAS CELULAS SANGUINEAS.

El PAF posee un amplio rango de actividades biológicas en diferentes células y tejidos.

1.4.1. PLAQUETAS.

El PAF es liberado de las plaquetas de varias especies animales cuando éstas son estimuladas por diferentes agentes agregantes (trombina o colágena) o ionóforos de Ca^{2+} , lo que sugiere que el PAF es mediador de la denominada "tercera vía de la agregación plaquetaria", que es independiente de la liberación de ADP o de la producción de tromboxano A_2 (TXA_2) (Chignard y cols, 1980).

Los efectos del PAF sobre las plaquetas incluyen cambios de forma, agregación, degranulación, desensibilización, incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, fosforilación de proteínas, estimulación del metabolismo del PI, liberación de AA y aumento de los niveles de AMPc (Lapetina y Siegel, 1983).

El papel del Ca^{2+} en la transducción de la señal iniciada por PAF está íntimamente relacionado con los primeros pasos de la activación plaquetaria. El PAF activa la PLC, produciendo DAG y ácido fosfatídico, que se comporta como un ionóforo de Ca^{2+} , movilizándolo el Ca^{2+} unido a la membrana. Por otra parte, el aumento de DAG produce la activación de la PKC que fosforila la cadena ligera de la miosina plaquetaria e induce la liberación de serotonina de las plaquetas activadas (Lapetina y Siegel, 1983).

1.4.2. LEUCOCITOS.

En neutrófilos humanos el PAF produce una gran variedad de respuestas, tales como degranulación, agregación, quimiotaxis, quimioquinesis, producción de anión superóxido (O_2^-), alteraciones en la carga de la superficie de la membrana, aumento de la adherencia celular, estimulación del metabolismo del AA e

incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, si bien algunos de estos efectos son producidos por la acción de mediadores endógenos liberados tras la estimulación del PAF (Braquet y cols, 1987).

En PMNs, la presencia de Ca^{2+} extracelular aumenta el proceso de degranulación inducido por el PAF, mientras que antagonistas de la calmodulina la inhiben de forma dosis-dependiente (Shaw y cols, 1981). La agregación requiere la presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} extracelular y es independiente de AA y ADP.

1.4.3. MACROFAGOS Y MONOCITOS.

La estimulación de macrófagos humanos por interacción con mediadores solubles, partículas macroscópicas o células tumorales, induce la síntesis y liberación de PAF (Elstad y cols, 1989) e incrementa su capacidad de destruir microorganismos o células tumorales (Elstad y cols, 1989). El PAF producido estimula el metabolismo oxidativo, la producción de O_2^- , síntesis de eicosanoides (Fitzgerald y cols, 1989) y la agregación de monocitos (Yasaka y cols, 1982). Dicha agregación es dosis-dependiente y, en humanos, requiere la presencia de iones divalentes y glicólisis (Yasaka y cols, 1982). Al igual que ocurre en las plaquetas, el PAF induce entrada de Ca^{2+} extracelular y la movilización de Ca^{2+} intracelular (Adolfs y cols, 1989; Ng y Wong, 1989a).

1.4.4. LINFOCITOS.

También son capaces de liberar liso-PAF cuando son estimulados por el ionóforo de Ca^{2+} A23187 (Jouvin-Marche, 1984) y liberan grandes cantidades de PAF cuando se estimula la región Fc del receptor (Malavasi y cols, 1986). En células estimuladas por lipopolisacáridos (LPS), el PAF regula la proliferación de células T ya que incrementa la síntesis y liberación de interleukina 1 (IL-1) (Braquet y cols, 1987); existiría, por tanto, un feedback positivo entre IL-1 y PAF que puede estar implicado en la amplificación de la respuesta inmune. También el PAF produce un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, que podría influir en la proliferación linfocitaria dependiente del Ca^{2+} .

1.4.5. EOSINOFILOS.

La presencia de receptores específicos para PAF en eosinófilos fue demostrada por Ukena y cols (1989). El PAF produce efectos similares en estas células a los observados en monocitos y neutrófilos (Sigal y cols, 1987): quimiotaxis, agregación y producción de O_2^- . El PAF es uno de los más potentes agentes quimiotácticos, induciendo infiltración eosinofílica a nivel microvascular y liberación de leucotrieno C_4 (LTC_4) y O_2^- por dichas células (Wardlaw y Kay, 1986).

1.4.6. CELULAS ENDOTELIALES.

Las células endoteliales al ser activadas por distintos estímulos generan PAF, estando este proceso relacionado con un rápido aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y mediado por una proteína G (Lewis y cols, 1988; Whatley y cols, 1990). El PAF actúa sobre estas células produciendo cambios en la forma, alteraciones en el citoesqueleto, formación de vesículas, aumento de la permeabilidad, activación de la PKC, hiperpolarización de la membrana y adhesión leucocitaria sobre ellas (Braquet y cols, 1989). A estos cambios también contribuye la IL-1, que induce liberación de prostaciclina y PAF. El resultado son las alteraciones microvasculares características de algunas patologías, tales como isquemia, shock y rechazo de transplantes, lo que sugiere que el PAF podría ser uno de los mediadores implicados en la fisiopatología de estas entidades. Recientemente, Bkaily y cols (1993) han descrito que en células endoteliales humanas y caninas el PAF produce un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ que es insensible a Nifedipino pero que se bloquea por (-)-PN 200-110 o al disminuir la $[Ca]_o$, así como por el WEB 2170, un antagonista de los receptores del PAF. Estos hallazgos indican que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ producido por el PAF estaría mediado a través de la activación de canales tipo-R descritos en células musculares cardíacas y lisas vasculares (Bkaily y cols, 1992). Este canal podría jugar un papel importante en la contracción sostenida de la musculatura lisa y en el acoplamiento entre la excitación de las células endoteliales y la liberación de factores vasoactivos tales como el óxido nítrico (NO) o las endotelinas.

Se ha demostrado que el PAF, al igual que otros mediadores, provoca la secreción de plasminógeno tisular a partir de células endoteliales, siendo éste un mecanismo Ca^{2+} -dependiente, que implica la activación de la PLA_2 y liberación de derivados del AA (Braquet y cols, 1987).

1.5. ACCIONES FARMACOLOGICAS DEL PAF.

1.5.1. APARATO CARDIOVASCULAR.

El PAF ejerce importantes efectos sobre diferentes componentes del aparato cardiovascular.

1.5.1.1. Efectos cardíacos.

En preparaciones cardíacas aisladas de diferentes especies animales, el PAF presenta un efecto bifásico sobre la fuerza contráctil miocárdica dependiente de la dosis (inotrópico positivo a bajas concentraciones e inotrópico negativo a concentraciones elevadas) (Tamargo y cols, 1985; Tamargo y González-Morales, 1990; Díez y cols, 1990) y del tiempo (Camussi y cols, 1984a; González-Morales, 1987). Sin embargo, otros autores han descrito solamente un efecto inotrópico negativo dosis-dependiente (Levi y cols, 1984; Robertson y cols, 1988). Este efecto inotrópico negativo es atribuido a una disminución

de la corriente de entrada lenta de Ca^{2+} , ya que el PAF reduce la amplitud, duración y velocidad de los potenciales de acción lentos en músculos papilares de cobaya (Tamargo y cols, 1985) y disminuye la contractura en corazones sometidos a la paradoja del Ca^{2+} (González-Morales, 1987). Robertson y cols (1988) han propuesto que la acción inotrópica negativa del PAF puede depender de una disminución de la actividad intracelular del Na^+ mediada por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Además, en aurículas aisladas de cobaya perfundidas con soluciones ricas en K^+ y tras bloquear los canales rápidos de Na^+ con tetrodotoxina, el PAF (10^{-7}M) también produce un inotropismo negativo asociado a la reducción de la amplitud, duración y velocidad de los potenciales de acción lentos (Gollasch y cols, 1991). Todos estos resultados indican que el PAF reduce la entrada de Ca^{2+} en el sarcolema, siendo éste el principal mecanismo en la acción inotrópica negativa del PAF. Por el contrario, el aumento de la fuerza contráctil se atribuye a un incremento del flujo de Ca^{2+} a través de las corrientes de entrada lenta del Ca^{2+} (Tamargo y cols, 1985).

El efecto inotrópico bifásico del PAF en el miocardio de cobaya puede ser interpretado en base a la supuesta existencia de dos poblaciones, funcionalmente distintas, de receptores de PAF en las células cardíacas: una unida a la vía del IP_3 y otra asociada a la vía del AMPc (Gollasch y cols, 1991). La ocupación de los receptores de alta afinidad (PAF_2) induce la activación de la adenilato ciclasa y un aumento del AMPc y de la corriente de entrada de Ca^{2+} (Tamargo y cols, 1985), que conduce a su acción inotrópica positiva. La ocupación de los receptores de baja afinidad o PAF_1 produce el efecto inotrópico negativo del PAF, ya que activa la PLC que aumenta la conductancia al K^+ y acorta la duración del potencial de acción cardíaco, disminuyendo la entrada de Ca^{2+} a la célula (Braquet y cols, 1987).

Con respecto al flujo coronario, en corazones aislados de rata se ha observado un efecto vasodilatador, vasoconstrictor o bifásico (Man y cols, 1990). Así, la respuesta vasodilatadora aparece a dosis entre 1 fmol-1 pmol, el efecto vasoconstrictor a 1 nmol y la respuesta bifásica en un rango de dosis entre 10 y 100 pmol de PAF. El análisis del líquido de perfusión permite detectar cantidades significativas de LTC_4 , LTB_4 y LTD_4 , lo que sugiere que algunas de las acciones del PAF podrían deberse a la síntesis y liberación de leucotrienos. De este modo, los derivados de la LO son responsables de la acción vasodilatadora y vasoconstrictora del PAF, mientras que los derivados de la CO parecen no tener ningún efecto significativo sobre el flujo coronario (Man y cols, 1991). Sin embargo, otros autores sólo han encontrado una disminución dosis-dependiente del flujo coronario secundaria al incremento de las resistencias coronarias (Levi y cols, 1984; Tamargo y González-Morales, 1990).

Levi y cols (1984) han propuesto que el PAF es el mediador de las anomalías cardíacas que aparecen en el modelo de anafilaxia cardíaca, tales como la disminución de la contractilidad y del flujo coronario y las alteraciones en la conducción aurículoventricular (A-V). Estos efectos son independientes de la agregación plaquetaria o de la liberación de aminas vasoactivas por las plaquetas. La acción inotrópica negativa del PAF no está mediada por los derivados de la CO (por ejemplo, PGD_2), ya que la indometacina

no atenúa sus efectos depresores electromecánicos (Levi y cols, 1984).

Las alteraciones sobre la conducción cardíaca producidas por PAF han sido analizadas en el corazón aislado de rata. El nodo A-V (intervalo A-H) y el sistema His-Purkinje (intervalo H-Q) son los más sensibles al PAF (González-Morales, 1987). El PAF aumenta el tiempo de conducción nodal y la conducción His-Purkinje, siendo este efecto dosis y tiempo dependientes. Estos resultados sugieren que el PAF ejerce un bloqueo selectivo de la $I_{Ca,L}$, que retrasaría la conducción nodal y un bloqueo de la corriente rápida de la entrada de Na^+ , que retrasaría la conducción a través del sistema His-Purkinje. Además, a dosis elevadas ($10^{-6}M$) el PAF es capaz de producir arritmias ventriculares (extrasístoles, taquicardias y fibrilación ventricular) y bloqueos aurículoventriculares de 2° y 3er grado, posiblemente debidos a un mecanismo de re-entrada como consecuencia de las distintas modificaciones en la conducción subnodal (Levi y cols, 1984; González-Morales, 1987). También se ha observado que el PAF produce un aumento en la incidencia de fibrilación ventricular en corazones aislados de cobaya sometidos a isquemia/reperfusión (Flores y Sheridan, 1990). En ambos casos, la reducción del flujo coronario podría jugar un importante papel en la génesis de las arritmias.

A nivel cardíaco, el PAF puede ser sintetizado por granulocitos sometidos a hipoxia (Joseph y Welch, 1989), por infiltración leucocitaria en situaciones de isquemia/reperfusión (Mickelson y cols, 1988) y por los neutrófilos que se acumulan en los primeros minutos de la reperfusión (Montrucchio y cols, 1989). Estos hallazgos confirman que el PAF es un importante mediador de algunos fenómenos que se producen en la isquemia/reperfusión miocárdica.

1.5.1.2. Efectos vasculares.

La administración de PAF a dosis altas en perros anestesiados produce una inmediata caída de la presión arterial, del gasto cardíaco y de las resistencias periféricas, que se acompañan de un pequeño aumento reflejo de la frecuencia cardíaca (Otsuka y cols, 1985; Zukowska-Grojec y cols, 1985). Estos efectos también fueron observados en ratas normotensas y en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). En estas últimas, la hipotensión se manifiesta a dosis bajas, del orden de 0.1 nmol/Kg, debido a que presentan una mayor sensibilidad al PAF (Feuerstein y cols, 1982).

La hipotensión inducida por PAF se asocia a una elevación en la actividad de la renina plasmática y de los niveles plasmáticos de noradrenalina, adrenalina y TXB_2 (Feuerstein y cols, 1982). Posteriormente se ha demostrado que esta hipotensión es independiente de dichas sustancias, ya que el bloqueo de receptores histaminérgicos, β -adrenérgicos, colinérgicos o la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y bradikinas no modifican esta respuesta.

Un factor potencialmente importante en el efecto hipotensor del PAF es la disminución del volumen sanguíneo secundaria a un incremento de la permeabilidad vascular y a la dilatación de los vasos de resistencia (arteriolas y venosas), que reducen el retorno venoso al corazón (Sánchez-Crespo y cols, 1982) y, por tanto, la precarga. Estos efectos conllevan un deficiente llenado ventricular izquierdo y la disminución del rendimiento cardíaco, llegando a una situación de colapso circulatorio. Puesto que el PAF no es capaz de producir relajación de arterias aisladas ni interacciona con receptores α -adrenérgicos, en su efecto vasodilatador podría estar implicado el factor de relajación del endotelio (Sánchez-Crespo y Fernández-Gallardo, 1991) producido por las células endoteliales e identificado como NO sintetizado a partir de la L-arginina (Palmer y cols, 1988). Sin embargo, en la arteria mesentérica el PAF produce un efecto vasodilatador, posiblemente debido a la activación de receptores específicos o, alternativamente, a través de la activación de canales de Ca^{2+} tipo-R, lo que contribuiría a la extravasación capilar (Clainig y cols, 1994). Además, el PAF incrementa el tono de la vena porta (Hellegouard y cols, 1988) y en las venas mesentéricas de rata (Clainig y cols, 1994), siendo bloqueado este efecto por BN 52021, BN 52063 y dibutilil-AMPc (Sutter, 1990).

En cobayas anestesiadas a las que se infundió PAF durante 2 horas aparecen alteraciones cardiopulmonares semejantes a ciertos estados patológicos en los que el PAF está implicado (Qian y cols, 1993). Así, a dosis inferiores a 5-10 ng/Kg/min produjo hipotensión y disminución de la presión ventricular izquierda, que se revertieron espontáneamente a pesar de la infusión continuada de PAF. La disminución del gasto cardíaco podría deberse a la disminución de la contractilidad cardíaca y del volumen plasmático, secundaria al aumento de la permeabilidad vascular. La disminución de la presión telediastólica sería debida a la hemoconcentración inducida por PAF. La ausencia de taquicardia podría sugerir que el PAF presenta un efecto cronotrópico negativo directo, que enmascara el aumento reflejo de la frecuencia cardíaca que la hipotensión debería producir (Qian y cols, 1993).

A nivel de la circulación pulmonar, el PAF incrementa la resistencia vascular pulmonar, reduce el flujo sanguíneo pulmonar y produce agregación y secuestro de plaquetas y células blancas a nivel alveolar (Laurindo y cols, 1985), lo que conduce a un cuadro de hipertensión pulmonar. Este aumento de la presión pulmonar incrementa la precarga y puede conducir a una disfunción ventricular derecha, a un aumento de la presión auricular derecha y de la presión telediastólica ventricular izquierda y a una disminución del rendimiento cardíaco (Feuerstein y cols, 1984).

Los efectos del PAF sobre la microcirculación están estrechamente relacionados con los procesos de inflamación aguda, por la capacidad de producir extravasación de plasma rico en proteínas plasmáticas y producir vasoconstricción, dolor y prurito, seguido por eritema y edema. Estos efectos pueden ser explicados por la acción vasodilatadora endotelio-dependiente del PAF de las arteriolas precapilares unido a una acción constrictora, independiente del endotelio, de los vasos postcapilares; ambos efectos aumentan la presión hidrostática y aumentan el paso de líquidos hacia el espacio intersticial. Además, el PAF estimula

la adherencia de plaquetas y PMNs en la superficie del endotelio (McIntyre y cols, 1986; Sirois y cols, 1994).

La administración de PAF a concentraciones ligeramente superiores a las requeridas para producir hipotensión sistémica produce una marcada extravasación de plasma rico en proteínas, que induce hemoconcentración e incremento del hematocrito y de la viscosidad sanguínea (Sánchez-Crespo y cols, 1982). Estos fenómenos son el resultado del incremento en la permeabilidad vascular antes mencionado, posiblemente agravada por el aumento en la presión venosa central secundario al fallo ventricular derecho.

Las acciones cardiovasculares del PAF conducen a un colapso circulatorio agudo, debido a la dramática disminución del volumen sanguíneo y del volumen minuto. El cuadro general se caracteriza por hipotensión sistémica, hipertensión pulmonar, aumento de la permeabilidad vascular y extravasación de plasma rico en proteínas, lo que sugiere que el PAF juega un importante papel en la génesis del shock endotóxico. La administración de agregados de IgG (Doebber y cols, 1986) o endotoxina procedente de bacterias gram negativas, producen sepsis semejantes a las observadas tras la administración de PAF (Doebber y cols, 1985). En ambos modelos experimentales de shock se liberan PAF, aminas vasoactivas, citocinas (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF $_{\alpha}$) (Sánchez-Crespo y Fernández-Gallardo, 1991), por lo que parece existir una estrecha interrelación entre PAF, IL-1 y TNF $_{\alpha}$ en diversos estados patológicos (Braquet y cols, 1989). Todos estos mediadores son sintetizados por macrófagos, PMNs y células endoteliales. Estos mismos factores también intervienen en la coagulación intravascular diseminada, en el fallo cardíaco múltiple causado por shock endotóxico (Ou y cols, 1994) y en el shock inducido por oclusión de la arteria esplénica, donde PAF y TNF $_{\alpha}$ juegan un importante papel en la adhesión leucocitaria (Squadrito y cols, 1994a).

El PAF también puede actuar como un agente trombogénico in vivo, facilitando la formación de trombos de plaquetas en vasos sanguíneos dañados por acción del PAF liberado a partir de células endoteliales (Braquet y cols, 1987). Tras la administración de PAF (10^{-7} M) en arterias mesentéricas de cobaya, las células endoteliales sufren un proceso de retracción en la zona expuesta a la acción del PAF. Como resultado de esta retracción, la subíntima se pone en contacto con el flujo sanguíneo y las plaquetas se adhieren a esta zona, desencadenándose el proceso de formación del trombo. Los PMNs adheridos al trombo potencian la liberación de O $_2$ y anión hidroxilo (OH $^-$) y activan a las plaquetas para sintetizar trombina, ATP e IL-1, que actúan sobre las plaquetas para generar más PAF. La presencia del edema intersticial es indicativo de extravasación plasmática debido al aumento de la permeabilidad vascular (Braquet y cols, 1989).

Cuando se infunden prostaciclina, inhibidores de la PLA $_2$ o de la acetiltransferasa o bloqueantes de los canales de Ca $^{2+}$, el trombo se disgrega pero, al suspenderse la infusión, el trombo se vuelve a formar inmediatamente. Ello no sucede si se administran antagonistas de PAF, lo que sugiere que la

administración exógena de PAF induce la generación de PAF endógeno, existiendo un feedback positivo que perpetua el fenómeno trombótico (Braquet y cols, 1989).

El daño endotelial celular, la infiltración de células sanguíneas, la formación del trombo y el edema producidos por el PAF son las alteraciones microvasculares observadas en diversas patologías como isquemia, shock, sepsis, rechazo de trasplantes y asma (Braquet y cols, 1987), por lo que se le considera mediador de estas patologías. Actualmente, se está estudiando la posible relación entre PAF e hipertensión arterial y aterogénesis (Koltai y cols, 1991).

1.5.2. APARATO RESPIRATORIO.

El PAF produce numerosos efectos en el sistema broncopulmonar semejantes a los observados en el asma por lo que se le considera como uno de los mediadores de la reacción asmática.

El PAF produce hiperreactividad bronquial en animales de experimentación y en el hombre (Cuss y cols, 1986). Administrado sistémicamente o por inhalación, el PAF produce una marcada broncoconstricción, aumenta la resistencia pulmonar y disminuye la compliance (Sánchez Crespo y Fernández-Gallardo, 1991) e incrementa la reactividad de las vías aéreas, efecto que puede durar hasta siete días (Cuss y cols, 1986) y que es semejante al producido por la inhalación del antígeno en pacientes asmáticos. Esta respuesta se asocia a acúmulo de macrófagos en los espacios alveolares, de plaquetas y PMNs en la luz alveolar, infiltración eosinofílica en la submucosa, edema y cambios degenerativos de las células endoteliales (Braquet y cols, 1987; Herd y cols, 1994). Los gránulos de los eosinófilos contienen proteínas catiónicas, incluyendo la MBP (major basic protein), que son liberadas por acción del PAF y producen lesión microvascular y endotelial. Dichas células también generan LTC₄ y O₂⁻, agentes que lesionan directamente la integridad endotelial. El mecanismo molecular por el cual el PAF es capaz de producir la degranulación de los eosinófilos parece estar relacionado con la entrada de Ca²⁺ a través de los canales activados por receptores específicos y con la hidrólisis de fosfoinosítidos que libera Ca²⁺ de los almacenes intracelulares (Braquet y cols, 1989). Todos estos procesos incrementan la hiperreactividad bronquial, la alteración característica del asma. Además, a nivel bronquial, el PAF incrementa la secreción mucosa, altera sus propiedades físicas y produce daños en el epitelio respiratorio ciliar (Braquet y cols, 1987). Sin embargo, no está claro si estos cambios están producidos por acción directa del PAF o por la liberación de sustancias citotóxicas por el infiltrado eosinofílico. Todos estos efectos son semejantes a los observados tras la administración de un alérgeno por inhalación en conejos sensibilizados por IgE y en los procesos asmáticos (Vargaftig y Braquet, 1987). Broncoconstricción e inflamación pulmonar también pueden ser producidos por histamina, derivados del AA (Vargaftig y Braquet, 1987) y por inhalación de ozono (O₃), siendo este último capaz de estimular la liberación de PAF y activar diversas fosfolipasas (PLA₂, PLC y PLD) de las células epiteliales traqueales (Wright y cols, 1994).

Qiang y cols (1993) demostraron que la infusión i.v. de PAF (20 ng/Kg/min durante 2 horas) en cobayas anestesiadas produce una disminución de la frecuencia respiratoria, volumen minuto y compliance pulmonar, a la vez que aumenta la presión y resistencia vascular pulmonar. La disminución de la frecuencia respiratoria es secundaria a un efecto sobre el centro respiratorio bulbar, como consecuencia de la isquemia cerebral inducida por PAF y el resto de las alteraciones son el resultado de la isquemia pulmonar causada por la disminución del rendimiento cardíaco e incremento de las resistencias periféricas pulmonares. La disminución de la frecuencia respiratoria, compliance pulmonar y volumen minuto producen una hipoxia que inhibe aún más la función cardíaca, siendo ésta la causa de la muerte inducida por PAF (Qiang y cols, 1993).

1.5.3. A NIVEL RENAL.

En cultivos de células mesangiales glomerulares procedentes de riñones aislados de rata, el PAF induce formación de anión superóxido, tromboxanos y prostaglandinas. Además, estas células son capaces de liberar PAF cuando son estimuladas por ionóforos de Ca^{2+} , que a su vez produce la contracción y cambios en la forma de dichas células (Pirotsky y cols, 1984), cambios que se asocian a un pasajero aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, siendo este efecto inhibido por bloqueantes de los canales de Ca^{2+} (verapamilo) y por el factor natriurético auricular (ANF) (Olivera y cols, 1994). El pretratamiento con PAF bloquea la natriuresis y diuresis inducida por el ANF en perros anestesiados (Braquet y cols, 1987). El antagonista de PAF, BN 52021 y el captoprilo potencian las acciones del ANF, aunque no está claro si este efecto está relacionado con el bloqueo de las acciones del PAF o es un efecto directo del BN 52021.

La administración sistémica de PAF reduce la filtración glomerular, el flujo sanguíneo renal y la excreción de Na^+ (Schlondorff y Neuwirth, 1986; Hebert y cols, 1987), efectos posiblemente dependientes de las alteraciones cardiovasculares que produce. La infusión intrarrenal de PAF se asocia a agregación y degranulación de plaquetas y neutrófilos en los capilares glomerulares, liberación de proteínas desde las plaquetas y neutrófilos y proteinuria (Camussi y cols, 1984b), por lo que se le ha implicado al PAF en procesos patológicos renales, como la nefritis tóxica o la glomerulonefritis (Braquet y cols, 1987).

1.5.4. APARATO GASTROINTESTINAL.

La microcirculación juega un importante papel en el mantenimiento de la integridad funcional de la mucosa gástrica (Wallace, 1990). Cambios en el flujo sanguíneo por liberación local de mediadores vasoactivos y citotóxicos, incluyendo radicales libres derivados del O_2 , eicosanoides y PAF han sido implicados en la patogénesis del ulcus gástrico y de la gastritis erosiva.

La infusión intravenosa de PAF produce hipotensión, hemoconcentración y daño de la mucosa gástrica, asociadas a congestión vascular en la mucosa y submucosa, aumento de la producción de

radicales libres, peroxidación lipídica (Binnaka y cols, 1989), hemorragias en estómago e intestino grueso, aunque no en el colon distal, e hiperemia, siendo estos efectos similares a los observados tras la administración de endotoxina (Wallace y cols, 1987). La ulceración gástrica inducida por el PAF se acompaña de una reducción en el número de PMNs y un incremento en la adherencia de dichas células sobre el endotelio microvascular, dañándolo y produciendo la liberación de otros mediadores que agravan aún más el cuadro.

Los efectos del PAF no están limitados sólo a la mucosa gástrica, sino que se han observado lesiones similares en el duodeno, yeyuno e íleon. Ratas tratadas con PAF o endotoxina desarrollan enterocolitis necrotizante asociada a un estado de shock (Sun y Hsueh, 1988). La administración intravenosa de TNF_{α} produce cambios morfológicos a nivel intestinal semejantes a los observados tras la infusión de PAF o de endotoxina. Todo ello sugiere que la liberación de PAF inducida por endotoxina y TNF_{α} durante el shock séptico puede contribuir al daño de la mucosa gastrointestinal y a la aparición de ulceración gástrica (Sun y Hsueh, 1988).

1.5.5. INFLAMACION.

El posible papel del PAF como mediador en las reacciones inflamatorias es un hecho de considerable interés, ya que conlleva un daño microcirculatorio, que es un hallazgo común en patologías tan diversas como shock, sepsis, asma, isquemia y rechazo de transplantes (Braquet y cols, 1989).

La administración subplantar de PAF en la rata produce edema e hiperalgesia (Goldenberg y Meurer, 1984; Cordeiro y cols, 1986). El análisis del exudado de la primera fase del edema inducido por carragenina demostró la existencia de PAF, lo que sugiere que su liberación, junto a la de histaminas y kininas, puede jugar un papel importante en el desarrollo de la reacción inflamatoria inducida por carragenina (Hwang y cols, 1986).

La inyección intradérmica de PAF en rata, cobaya y humanos provoca una marcada respuesta inflamatoria, aumenta la permeabilidad vascular y la extravasación de proteínas plasmáticas y facilita la acumulación de plaquetas, PMNs, monocitos y eosinófilos (Braquet y cols, 1989). Estas células cuando son estimuladas por el PAF son capaces de liberar proteasas lisosomales, O_2^- y LTC_4 , así como de desencadenar reacciones de degranulación y agregación (Watanabe y cols, 1994). Además, el PAF puede inducir liberación de varias citocinas inflamatorias (TNF_{α} , IL-1 e IL-2), así como LT's procedentes de monocitos, PMNs y células endoteliales, que agravan aún más el proceso inflamatorio (Braquet y cols, 1989; McDonald y cols, 1994); por tanto, existen numerosas interacciones entre los mediadores y las células implicadas en la respuesta inflamatoria. Entre PAF, IL-1 y TNF_{α} puede establecerse un feedback positivo que amplifica la reacción inflamatoria. PAF y TNF_{α} , además, juegan un papel importante en el ciclo inicial de la respuesta inflamatoria de procesos como artritis o la lesión pulmonar inducidas tras la

administración de LPS/PAF (Rabinovici y cols, 1993). También se ha relacionado al PAF con alteraciones alérgicas del tipo de urticaria al frío y la psoriasis (Braquet y cols, 1987). Todo ello indica que el PAF es un importante mediador que estaría implicado en la respuesta inflamatoria.

1.5.6. RESPUESTA INMUNE.

El PAF puede regular la función linfocitaria de forma indirecta, por inducir la formación de leucotrienos, y de forma directa, activando la función de macrófagos y células T (Rola-Pleszczynsky y cols, 1984). En el rechazo de trasplantes existe proliferación de linfocitos, infiltración de linfocitos y monocitos, así como adherencia de plaquetas, neutrófilos y fibrina a las células endoteliales vasculares del órgano transplantado (Braquet y cols, 1989). Debido a que las células del infiltrado inmune son capaces de sintetizar PAF, se podría proponer que la producción de PAF podría jugar un importante papel en el proceso de rechazo de trasplantes y en el deterioro del órgano transplantado (Mangino y cols, 1987).

La producción de PAF por células inmunes activadas podría también estimular la hidrólisis de fosfolípidos y la liberación de AA no esterificado, dando como resultado la formación de eicosanoides y toxicidad celular. El PAF también estimula la síntesis de IL-1 por los macrófagos y facilita la secreción de diversas linfocinas que median la respuesta inmunitaria. Estos eventos pueden ser inhibidos por antagonistas del PAF, que podrían aumentar la supervivencia del trasplante y reducir otros eventos indeseables asociados al rechazo (Braquet y cols, 1989; Jiménez de la Puerta, 1993).

2. ANTAGONISTAS DE PAF.

La importancia del papel fisiopatológico del PAF ha conducido a la síntesis de compuestos capaces de antagonizar específicamente sus acciones fisiofarmacológicas. La mayoría de estos compuestos actúan de modo competitivo y reversible, desplazando al PAF de su unión al receptor, pero carecen de actividad intrínseca. Estos compuestos se clasifican en 4 grupos:

2.1. Inhibidores no específicos.

2.2. Inhibidores específicos.

2.2.1. Antagonistas afines al PAF: de cadena abierta, de cadena cíclica y derivados tetrahidrofuranos.

2.2.2. Productos naturales: terpenos, lignanos y gliotoxinas.

2.2.3. Productos sintéticos.

2.2.4. Agentes farmacológicos: hexazepinas y Bloqueantes de los canales de Ca^{2+} .

2.1. INHIBIDORES NO ESPECIFICOS.

Existen una amplia variedad de compuestos capaces de antagonizar los efectos del PAF de modo no específico, es decir, sin unirse directamente al receptor. Estos fueron los primeros fármacos que se estudiaron e incluyen:

- A. Compuestos que disminuyen la $[Ca^{2+}]$, y, por tanto, interfieren con la respuesta celular del PAF in vitro e in vivo. Estos agentes pueden actuar:
 - 1.- Directamente, como los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} , los inhibidores de la calmodulina, agentes quelantes y anestésicos locales (Braquet y cols, 1987). Los primeros inhiben la entrada de Ca^{2+} a través de canales activados por PAF tras interactuar con sus receptores; los agentes quelantes disminuyen la $[Ca^{2+}]$ intracelular y extracelular e inhiben la respuesta del PAF; los inhibidores de la calmodulina y los anestésicos locales también inhiben la liberación de Ca^{2+} intracelular y la entrada de Ca^{2+} extracelular, lo que se traduce en una inhibición de la respuesta inducida por PAF (Schmidt y cols, 1992).
 - 2.- Indirectamente, modulando los niveles de nucleótidos cíclicos. Los compuestos que aumentan los niveles intracelulares de AMPc (PGE_2 , PGI_2 e inhibidores de la fosfodiesterasa) inhiben la movilización de Ca^{2+} y la síntesis de PAF (Schmidt y cols, 1992).
- B. Cromoglicato sódico, factor liberador de la tirotrópina (THR) y su análogo MK 711, naloxona, algunos derivados cuaternarios de prometazina y la proteína C reactiva inhiben la síntesis y liberación de PAF. Igual sucede con los inhibidores de la PLA_2 , los antagonistas de TX's y LT's y con fármacos antidepresivos como la doxepina (Braquet y cols, 1987).

2.2. INHIBIDORES ESPECIFICOS.

Estos compuestos han servido para definir el papel biológico del PAF y las propiedades conformacionales de los sitios de unión del receptor del PAF. Son moléculas capaces de desplazar al PAF de su unión a su receptor (antagonistas competitivos) y de antagonizar sus efectos. La característica estructural más importante es la presencia de al menos un heteroátomo, especialmente un oxígeno, incluido en un anillo tetrahidrofurano. Se clasifican en 4 grupos:

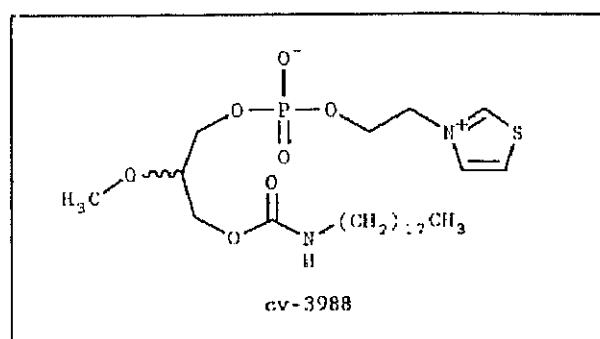
2.2.1. ANTAGONISTAS AFINES AL PAF.

Son compuestos relacionados con la molécula de PAF y la mayoría se obtienen por modificación

de su estructura, especialmente en la cadena glicerol.

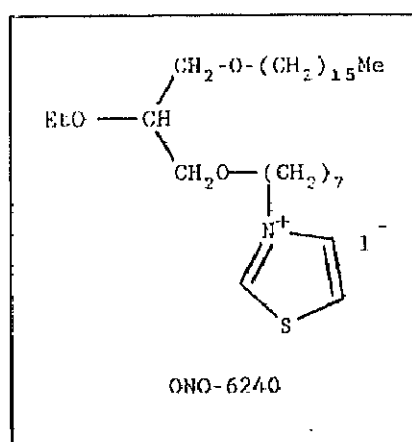
2.2.1.1. De cadena abierta.

- CV 3988 (Takeda). Fue el primer producto descrito en esta serie, sintetizado durante un estudio de análogos de lisofosfolípidos que incorporan un grupo carbamato como agentes potencialmente citotóxicos y antifúngicos (Terashita y cols, 1983).

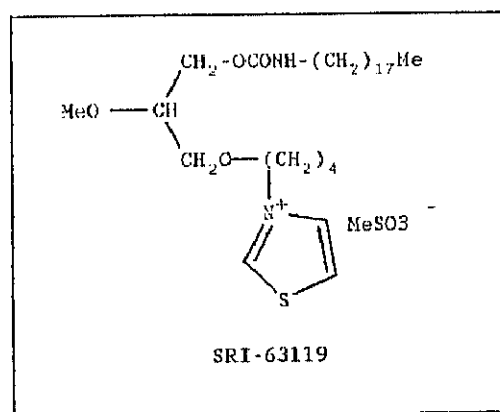
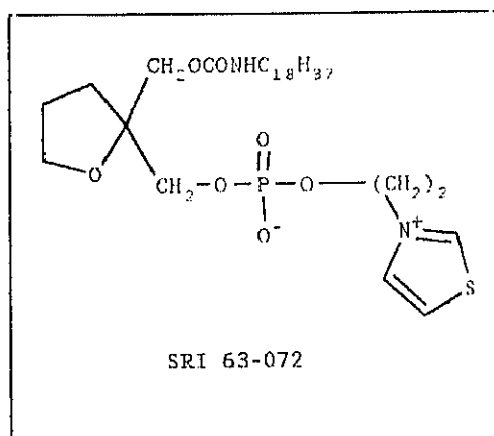
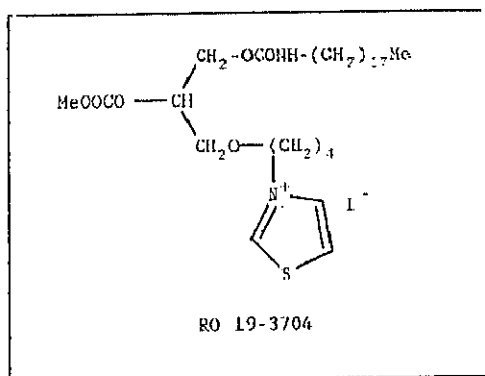


Es un potente antagonista activo por vía oral. A concentraciones altas presenta un efecto agonista parcial. Inhibe específicamente la agregación plaquetaria inducida por PAF, aunque a concentraciones elevadas también antagoniza la inducida por AA, ADP y colágena. Evita la hipotensión y la trombopenia causadas por PAF y el daño intestinal y la coagulación intravascular diseminada asociada al shock inducido en ratas por la endotoxina (Wallace y Whittle, 1986).

- ONO-6240. Inhibe la agregación plaquetaria y la hipotensión y broncoconstricción inducida por PAF en ratas y cobayas (Braquet y cols, 1987). También previene parcialmente la disminución del gasto cardíaco y la caída de presión arterial sistémica inducida por la endotoxina de E.coli en ovejas (Hosford y Braquet, 1990).



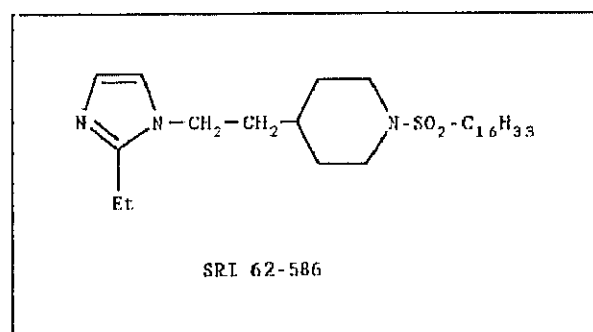
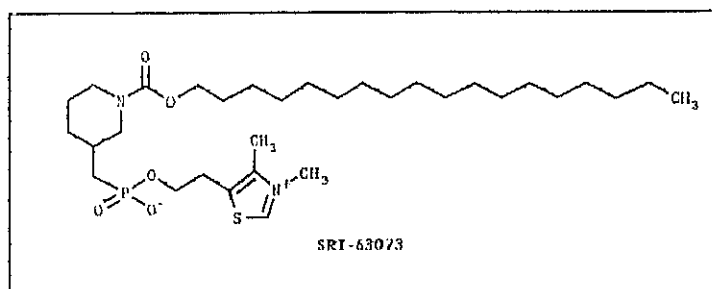
- Por modificaciones en el C₃ se obtuvieron los compuestos RO19-3704, RO19-1400, RO18-8736 y RO18-7953 (Hoffman La Roche) (Burri y cols, 1985). El más activo de todos es el RO19-3704, que inhibe la agregación plaquetaria inducida por el PAF en conejos, cobayas y humanos, así como la hipotensión, broncoconstricción, trombocitopenia, leucocitopenia y el aumento de la permeabilidad vascular inducida por PAF en varias especies animales. También previene la activación de los macrófagos alveolares y la formación de TXs en el pulmón aislado de cobaya estimulado por PAF (Braquet y cols, 1987).



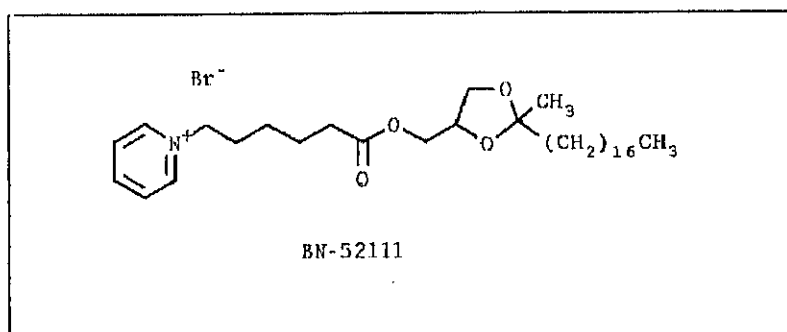
-Sandoz ha sintetizado dos compuestos de cadena abierta: SRI 63-072 y SRI 63-119. El primero inhibe la agregación plaquetaria en cobayas, conejos y humanos, previene la broncoconstricción y hemoconcentración inducidas por el PAF en cobayas e inhibe, de modo parcial, la extravasación dérmica producida en la reacción de Arthus en cobayas y ratas (Braquet y cols, 1987). En esta última especie, disminuye la glomerulonefritis inducida por inmunocomplejos (Hosford y Braquet, 1990). El SRI 63-119 inhibe la agregación plaquetaria producida por PAF en humanos, la hipotensión en ratas, la hemoconcentración, broncoconstricción y extravasación microvascular inducida por PAF en cobayas y, parcialmente, la extravasación dérmica en la reacción de Arthus (Hosford y Braquet, 1990). Además, evita la necrosis intestinal inducida por TNF_α, endotoxina y PAF en ratas (Sun y Hsueh, 1988).

2.2.1.2. De cadena cíclica.

Por ciclación de la molécula de PAF se obtienen el derivado piperidínico SRI 63-073 y el SRI 62-586. El SRI 63-073 (Roche) incluye una cabeza polar de fosfato de tiamina en su molécula. Tiene una potencia relativa baja, buena absorción oral y carece de efecto agonista parcial (Lee y cols, 1985). El SRI 62-586 (Sandoz) inhibe la agregación plaquetaria, la hemoconcentración y el incremento de presión pulmonar inducidos por el PAF (Winslow y cols, 1985).



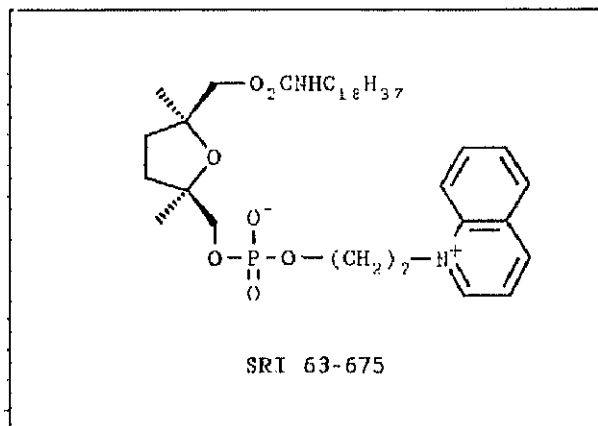
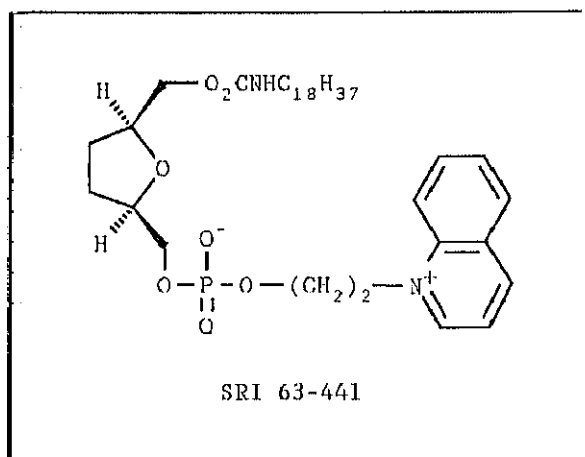
- La inclusión del anillo 1,3-dioxolano ha llevado a la síntesis del compuesto **BN 52111** (Hosford y Braquet, 1990) que inhibe la agregación plaquetaria en conejos, la agregación de neutrófilos en ratas y la movilización de Ca²⁺ inducido por el PAF. Administrado por vía intravenosa, previene la formación de trombos causados por PAF en arterias mesentéricas e inhibe el aumento de la resistencia de las vías aéreas, la broncoconstricción y la hipotensión en cobayas (Pons y cols, 1989). Sin embargo, es inactivo por vía oral y muestra una alta toxicidad.



2.2.1.3. Derivados tetrahidrofuranos.

La inserción de un anillo de tetrahidrofurano ha llevado a la síntesis de los compuestos SRI 63-441 y SRI 63-675 (Sandoz). El SRI 63-441 es un inhibidor específico de la agregación plaquetaria inducida por PAF en humanos. Así mismo, protege de las lesiones hemorrágicas de la mucosa gástrica producidas por PAF, atenúa el daño pulmonar inducido por endotoxina en ratas, mejora el flujo coronario en un modelo de anafilaxia cardíaca (Braquet y cols, 1987), disminuye el número de arritmias ventriculares inducidas por isquemia/reperfusión y la cantidad de plaquetas acumuladas en la zona isquémica (Wainwright y cols, 1989).

El SRI 63-675 es semejante al anterior y muestra un perfil de actividad similar. Inhibe parcialmente la formación de edema inducido por inyección intradérmica de PAF y PGE_2 en la piel de conejo (Hellewell y Williams, 1989) y mejora significativamente la disminución de flujo renal, filtración glomerular y flujo urinario inducido por endotoxina en ratas (Tolins y cols, 1989). Ambos carecen de actividad agonista parcial.



2.2.2. PRODUCTOS NATURALES.

Tras la obtención de antagonistas específicos de estructura análoga a la molécula de PAF, se buscaron compuestos no relacionados con la estructura del autacoide y que poseyeran un antagonismo potente y específico. De este modo, se obtuvieron una serie de productos naturales que se agrupan en 3 grupos:

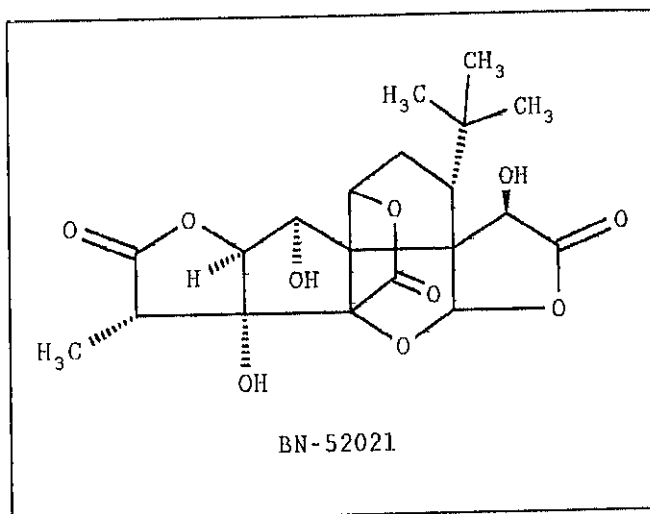
2.2.2.1. Terpenos.

A este grupo pertenecen una familia de compuestos obtenidos del árbol *Ginkgo biloba*, denominados ginkgólidos A, B, C, M y J (BN 52020, BN 52021, BN 52022, BN 52023 y BN 52024, respectivamente) (Braquet, 1987). Son moléculas de 20 carbonos que incorporan un grupo terbutilo y seis anillos de cinco miembros constituidos por un ciclopentano, un anillo espiro [4,4] nonano, un ciclo tetrahidrofurano y tres anillos de lactona.

- BN 52021. Es el compuesto más activo de todos los de esta serie ($IC_{50} = 10^{-7}M$). Presenta una alta especificidad y potente capacidad de unión al receptor del PAF en plaquetas de conejo y humanas y disminuye la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el PAF, lo que indica que también inhibe la subsecuente respuesta celular mediada por la activación del ciclo de los PI y la movilización de Ca^{2+} (Braquet y cols, 1987).

Este compuesto inhibe la vasoconstricción y la reducción en la fuerza contráctil miocárdica en corazones aislados de cobaya sometidos a anafilaxia cardíaca (Koltai y cols, 1986), disminuye la incidencia de arritmias ventriculares (extrasístoles ventriculares, taquicardia y fibrilación ventricular) producidas en situaciones de isquemia sin modificar la función cardíaca (Koltai y cols, 1989) y reduce el tamaño del área de infarto. Además, inhibe o revierte la hipotensión, hemoconcentración y extravasación inducida por PAF e IgG; previene la hipotensión y edema pulmonar provocados por la endotoxina; evita las alteraciones electromecánicas que ocurren en la anafilaxia cardíaca en cobayas sensibilizadas activa y pasivamente; prolonga la supervivencia del trasplante cardíaco en ratas (Koltai y cols, 1991); aumenta la filtración glomerular, flujo renal y excreción de Na^+ en modelos de nefropatía producida por endotoxina en ratas (Tolins y cols, 1989) y por la administración de PAF por vía sistémica e intrarrenal en perros (Hebert y cols, 1987); inhibe la producción de úlceras gastrointestinales inducidas por PAF y endotoxina (Braquet y cols, 1988); contrarresta la hipotensión, trombocitopenia y leucocitopenia producidas en el shock endotóxico (Sánchez-Crespo y Fernández-Gallardo, 1991); antagoniza la hiperreactividad de vías aéreas y la trombocitopenia inducidas por PAF (Pons y cols, 1989); inhibe la formación de edema inducido por inyección intradérmica de PAF en piel de conejo (Hellewell y Williams, 1989) y protege de forma dosis-dependiente de la muerte inducida por el PAF en el ratón (Myers y cols, 1988).

- BN 52063. Es una mezcla estandarizada de los ginkgólidos A, B y C. Inhibe la ulceración gástrica inducida por PAF y endotoxina en ratas (Braquet y cols, 1988); potencia los efectos de dosis submaximales de ciclosporina A en trasplantes de órganos y suprime la dermatitis de contacto en el ratón (Koltai y cols, 1991).



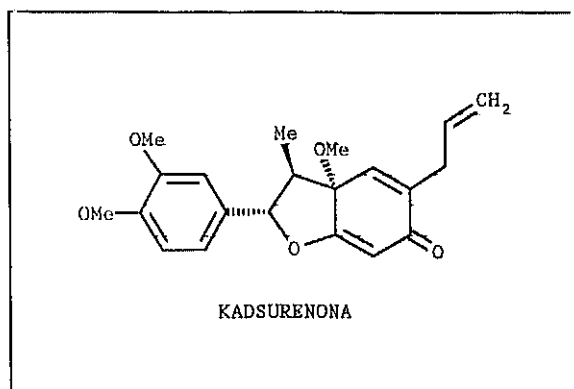
2.2.2.2. Lignanos.

Lignanos y neolignanos constituyen una inmensa familia química formada biogénicamente por dimerización oxidativa del hidroxialcoxifenilpropano (Braquet y cols, 1987). El término lignano queda reservado para los compuestos cuyo precursor se dimeriza en el C β de cada cadena lateral, mientras que el de neolignano se aplica a los productos en los que la dimerización se realiza en el C no β .

2.2.2.2.1. Neolignanos benzofuranoides.

Se obtienen a partir de la *Piper futokadsurae*, planta utilizada como antirreumático y antialérgico. Se han aislado varios compuestos naturales denominados Kadsurenona, Kadsurin A, Kadsurin B y piperona (Merck), de los cuales la Kadsurenona es un potente inhibidor de la unión de [3 H]PAF en plaquetas de conejo ($IC_{50} = 10^{-7}M$). El resto de los productos muestran una débil actividad biológica (Shen y cols, 1985).

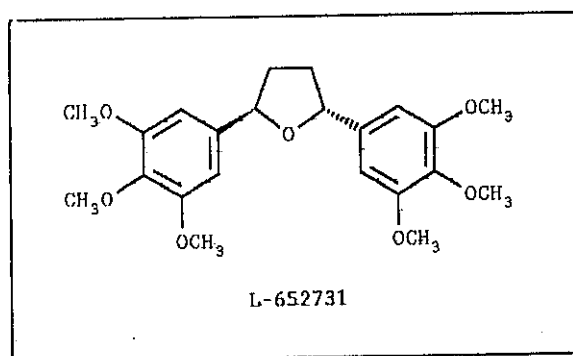
- **KADSURENONA.** Inhibe la agregación y degranulación inducida por el PAF en neutrófilos humanos y la unión de [3 H]PAF a plaquetas y receptores de pulmón (Shen y cols, 1985). En un modelo de anafilaxia realizado en corazones aislados y perfundidos de cobaya, este compuesto bloquea la disminución de la fuerza contráctil y del flujo coronario (Levi y cols, 1984), así como el aumento del hematocrito y los cambios cardiovasculares producidos por el PAF (Hwang y cols, 1985a). Así mismo, inhibe la hipotensión inducida por endotoxina, la liberación de enzimas lisosomales (Doebber y cols, 1985), la formación del edema (Hellewell y Williams, 1989) y el aumento de permeabilidad cutánea producido en el cobaya tras la inyección de PAF. Sin embargo, la Kadsurenona presenta una semivida que oscila entre 30 minutos y 2 horas en animales, ya que es rápidamente metabolizada a glucurónidos por oxidación de la cadena lateral (Braquet y cols, 1987).



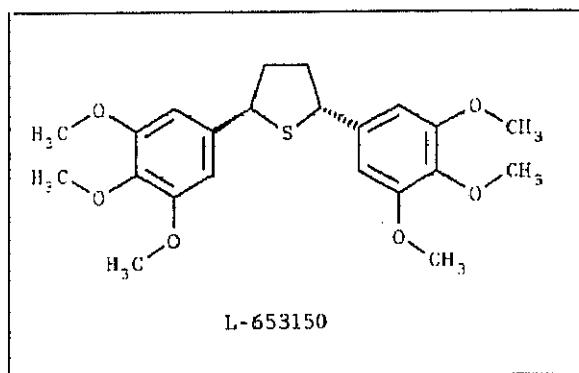
2.2.2.2. Lignanos furanoides sustituidos.

Varias estructuras de esta serie son potentes antagonistas de PAF. El **BURSERAN**, aislado de la *Bursera microphylla*, es un inhibidor específico, aunque poco potente, de la agregación plaquetaria inducida por PAF en conejos (Braquet y Godfroid, 1986). El **NECTANDRIN A** (BN 52010) y **B** (BN 52011), aislados de la *Nectandra rigida* brasileña (Braquet y Godfroid, 1986) y el **BN 52004**, aislado de la *Magnolia salicifolia*, son compuestos que también poseen propiedades antagonistas de PAF.

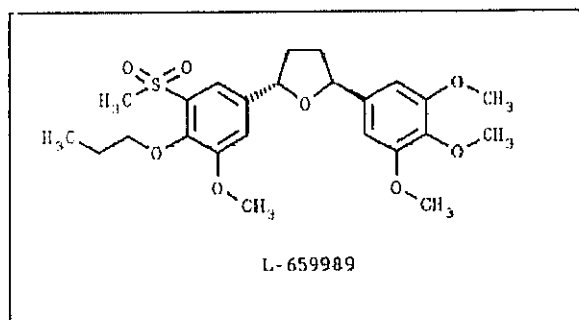
- La síntesis de una molécula similar a los lignanos tetrahidrofuranos pertenecientes a esta serie dió origen al compuesto **L-652731**, activo por vía oral y más potente que Kadsurenona tanto in vitro como in vivo (Hwang y cols, 1985a). Es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria inducida por PAF en humanos y conejos y antagoniza la degranulación de los neutrófilos humanos. Revierte la hipotensión, extravasación de proteínas plasmáticas, neutropenia y liberación de enzimas lisosomales producidas por el PAF o por inmunocomplejos solubles en rata (Doebber y cols, 1986) y la endotoxemia (Doebber y cols, 1985). También revierte la respuesta inflamatoria alérgica tipo Arthus en conejos (Hwang y cols, 1985b), inhibe el incremento de presión intragástrica, la hipotensión sistémica, la hemoconcentración y el desarrollo de erosiones agudas en la mucosa gastrointestinal inducidas por endotoxina (Koltai y cols, 1991). Además, protege de forma dosis-dependiente de la muerte inducida por PAF en ratón (Myers y cols, 1988).



- **L-653150**. Es un tioéster sintético del anterior que presenta mayor eficacia y duración de acción. Inhibe la agregación y degranulación de neutrófilos humanos, la agregación plaquetaria en conejo, la agregación de neutrófilos en cobaya, la liberación de enzimas, la permeabilidad vascular y la hipotensión producida por PAF (Hosford y Braquet, 1990).



- **L-659989**. Es la molécula más potente de esta serie. Bloquea la agregación plaquetaria y la degranulación de neutrófilos inducida por PAF y previene la extravasación y la liberación de enzimas lisosomales, siendo la duración de su acción de 12 a 16 horas (Hosford y Braquet, 1990). Evita la formación del edema inducido por PAF en piel de conejo (Hellewell y Williams, 1989). En modelos de isquemia/reperfusión, aumenta en un 80% la supervivencia de los animales, reduce el daño miocárdico y la infiltración leucocitaria (Ioculano y cols, 1994).



2.2.2.2.3. Lignanos dibencilbutirolactonas.

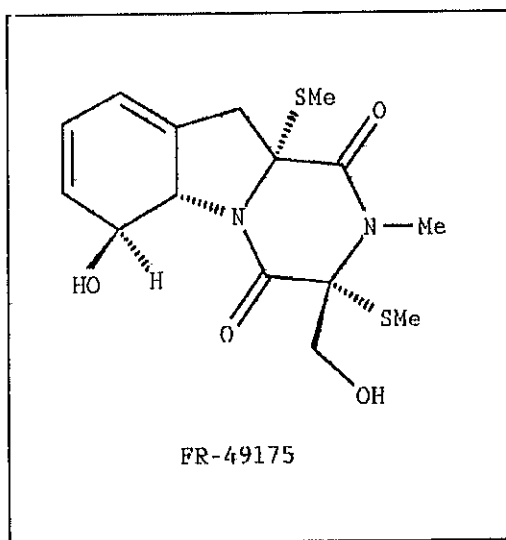
La mayoría de estos compuestos proceden de plantas, pero también han sido identificados en la orina animal y humana (Setchell y cols, 1983) por lo que se les ha atribuido un papel de inhibidores endógenos de PAF (Braquet y cols, 1987). La principal molécula identificada en la orina de mamíferos es la **Enterolactona**. Son inhibidores débiles de la agregación plaquetaria inducida por PAF y del intercambio Na^+/K^+ en eritrocitos humanos y en corazón de cobaya.

2.2.2.3. Gliotoxinas y productos análogos.

Gliotoxinas y otras epipolítidioxopiperazinas son toxinas que proceden de la fermentación de ciertos hongos y actinomicetes. La mayoría presentan una estructura común, la dialquiltiopiperazindiona y los dos compuestos más importantes son:

- **FR-49175**. Aislado de *Penicillium terlikowskii*, inhibe la agregación plaquetaria inducida por el PAF en conejo y parcialmente la agregación inducida por la colágena; también antagoniza la broncoconstricción inducida por el PAF en el cobaya. (Okamoto y cols, 1986).

- **FR-900452**. Al igual que el anterior, inhibe la agregación plaquetaria inducida por PAF y colágena. En modelos de shock endotóxico previene casi completamente la trombocitopenia y leucocitopenia producida por el PAF en conejos y reduce la proteinuria en ratas nefróticas (Hosford y Braquet, 1990).



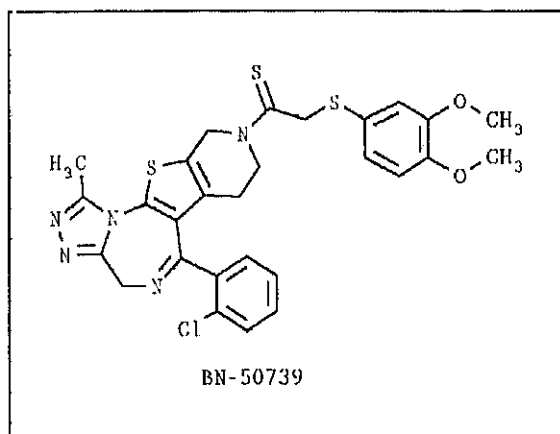
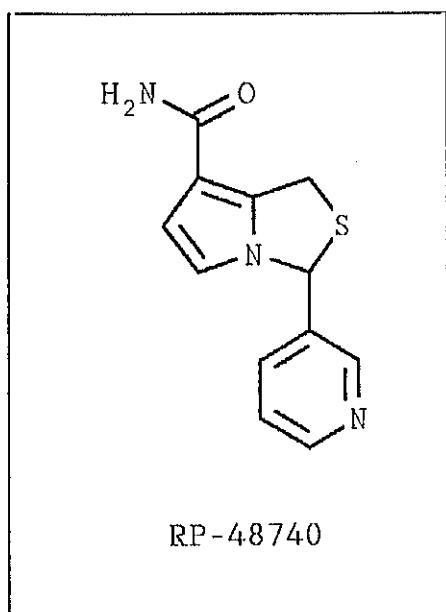
2.2.3. ESTRUCTURAS SINTÉTICAS.

En este grupo se incluyen fármacos que muestran una gran potencia inhibitoria de los efectos de PAF.

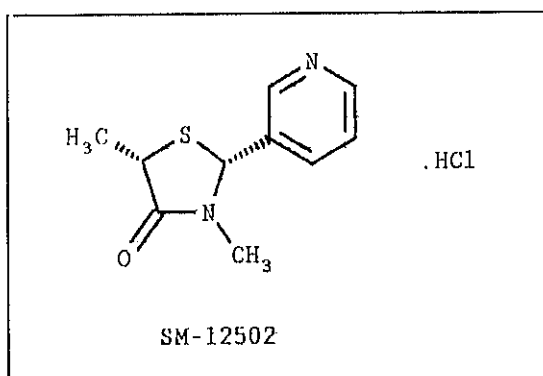
- **RP-48740**. Inhibe la agregación plaquetaria inducida por el PAF en conejos y humanos; antagoniza la hipotensión, trombocitopenia, hemoconcentración, hiperfibrinólisis, broncoespasmo y ulceración gástrica inducida por PAF en conejos y ratas y la hemoconcentración causada por la endotoxina (Hosford y Braquet, 1990). Además, previene el edema inducido por el PAF en la piel del conejo (Hellewell

y Williams, 1989).

- **BN 50739**. Inhibe la agregación plaquetaria inducida por PAF in vivo y ex vivo. Disminuye significativamente la incidencia de arritmias ventriculares inducidas en corazones aislados de ratas sometidos a isquemia regional, pero no modifica la función cardíaca; reduce el tamaño del área de infarto y previene la hipotensión y el shock inducido por TNF_α y endotoxina en conejos y ratas conscientes (Koltai y cols, 1991).

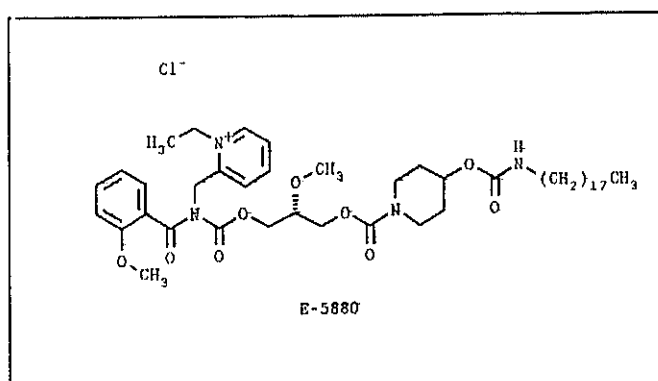


- **SM-12502**. Inhibe la agregación plaquetaria, la hemoconcentración e hipotensión inducida por el PAF en conejos y humanos y previene la muerte producida por el PAF en el ratón. Muestra una rápida absorción oral y es soluble en agua, propiedad de la que carecen la mayoría de los antagonistas del PAF (Imanishi y cols, 1994).



- **E-5880**. Inhibe la agregación plaquetaria inducida por el PAF en humanos, siendo uno de los antagonistas más potentes de esta serie. En modelos de sepsis producida por bacterias gram negativas,

atenúa de forma dosis-dependiente las manifestaciones de la coagulación intravascular diseminada y previene los cambios histológicos que se producen en hígado y riñón (Ou y cols, 1994).



2.2.4. AGENTES FARMACOLOGICOS.

Existen compuestos que, aunque pertenecen a clases o grupos farmacológicos bien definidos, muestran una acción antagonista de PAF. Entre estos están:

2.2.4.1. Hetrazepinas.

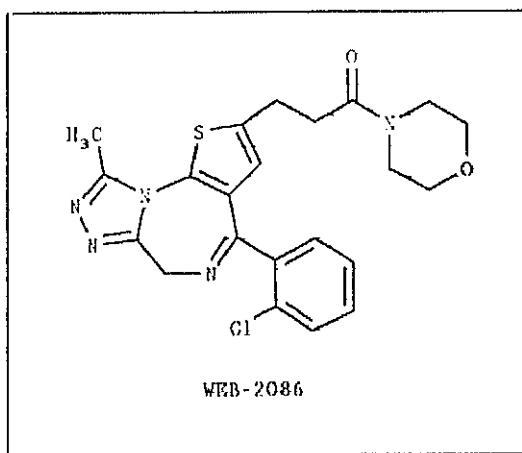
Se definen como Oxazepinas, Tiazepinas o Diazepinas según el tipo de heteroátomo que incluya el anillo diazepínico de siete miembros (O, S ó N, respectivamente). Por lo general, son compuestos que actúan sobre el sistema nervioso central (SNC). En el hombre y otros mamíferos, los efectos más característicos de estos fármacos son sedación, hipnosis, disminución de la ansiedad, relajación muscular, actividad anticonvulsivante y actividad antidepresiva (alprazolam). Únicamente, dos efectos de estos fármacos parecen deberse a acciones sobre los tejidos periféricos: la vasodilatación coronaria, que aparece después de la administración intravenosa de dosis terapéuticas de ciertas diazepinas y el bloqueo neuromuscular, que aparece a dosis muy altas. Algunos de estos fármacos tienen actividad antagonista del PAF:

- **ALPRAZOLAM** y **TRIAZOLAM**. Presentan un nitrógeno incluido en el anillo diazepínico y dos anillos (bencénico y triazolo) fusionados a él. Son inhibidores específicos de la agregación plaquetaria inducida por el PAF en conejos (Hosford y Braquet, 1990) y de la movilización de Ca^{2+} libre citosólico producido por el PAF en plaquetas humanas (Koltai y cols, 1991).

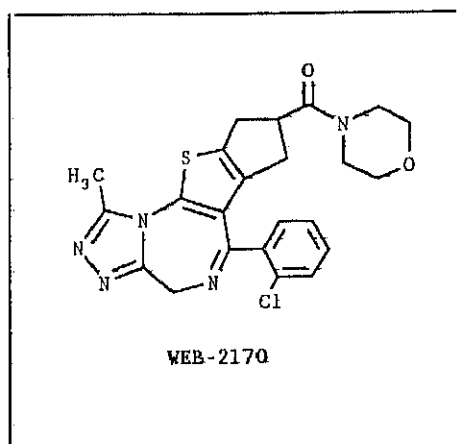
- **BROTIZOLAM**. Como los anteriores, presenta un nitrógeno incluido en el anillo diazepínico y dos anillos (triazolo y tieno) fusionados a él. Utilizado clínicamente como hipnótico, inhibe la agregación de plaquetas y neutrófilos en humanos (Hosford y Braquet, 1990). Administrado por vía oral o intravenosa,

inhibe de manera dosis-dependiente la broncoconstricción producida por el PAF en cobayas y la hipotensión observada en ratas (Koltai y cols, 1991).

- Por modificaciones en la molécula del brotizolam, se sintetizaron una serie de compuestos carentes de actividad central, ya que por su marcada hidrosolubilidad son incapaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Estos fármacos no se unen al receptor benzodiazepínico y, sin embargo, tienen una alta afinidad por el del PAF. El primero de esta serie fue el **WEB-2806** (Casals-Stenzel y cols, 1987) que inhibe la agregación de plaquetas y neutrófilos inducida por PAF en humanos, la trombocitopenia y neutropenia en el cobaya y la hipotensión en la rata. Inhibe la vasoconstricción y vasodilatación coronaria inducida por el PAF sin interferir en los efectos producidos por LTB_4 , LTC_4 y LTD_4 , así como los efectos inotrópicos negativos inducidos por el PAF, por lo que se le considera como un antagonista selectivo del receptor de PAF (Felix y cols, 1990; Vleeming y cols, 1992). Previene las alteraciones cardiovasculares y respiratorias producidas por la anafilaxia y el shock endotóxico, al igual que los cambios producidos por la endotoxina y el TNF_α sobre la mortalidad y la velocidad del tránsito intestinal (Koltai y cols, 1991) y el daño gástrico causado por el PAF (Sánchez-Crespo y Fernández-Gallardo, 1991). También inhibe el edema cutáneo producido por el PAF en conejos (Hellewell y Williams, 1989).



- La formación de un anillo ciclopentano entre el C_α y el C₇ da lugar al compuesto **WEB-2170** y a su análogo **STY 2108**. Ambos inhiben la broncoconstricción e hipotensión inducida por el PAF en cobayas y ratas, respectivamente (Hosford y Braquet, 1990). El **WEB-2170** inhibe de forma dosis-dependiente la respuesta inflamatoria inducida por el PAF en la pata de rata (Koltai y cols, 1991) y acelera el proceso curativo en la colitis crónica de la rata (Wallace, 1990). Además, prolonga la supervivencia del alotransplante cardíaco en ratas tratadas con dosis bajas de ciclosporina, debido a su acción sobre la adherencia celular (Da Costa y cols, 1990).



2.2.4.2. Bloqueantes de los canales de Calcio

Se ha comprobado que ciertos agentes bloqueantes de los canales de Ca^{2+} tipo L, como GALOPAMILO y DILTIAZEM inhiben las acciones del PAF (Tuffin y Wade, 1985). Producen una inhibición competitiva de la agregación plaquetaria en conejos y humanos, lo que sugiere la existencia de una posible relación entre el receptor de PAF y el canal de Ca^{2+} en la membrana de las plaquetas (Valone, 1987). Sin embargo, productos pertenecientes a la familia de las 1,4-Dihidropiridinas son débiles antagonistas de PAF.

3. CANALES DE CALCIO Y PAF.

El Ca^{2+} juega un papel fundamental en múltiples procesos celulares y se le considera como un mensajero en la transmisión de señales a través de las membranas biológicas y a nivel intracelular. Así, a nivel cardiovascular, el Ca^{2+} está implicado en la regulación del acoplamiento excitación-contracción de la musculatura lisa y cardíaca, en el acoplamiento excitación-secreción de neurotransmisores y hormonas, en la excitabilidad y velocidad de conducción de las células de los nodos sinusal y A-V, en la duración del potencial de acción cardíaco y de ciertas formas de automatismo anómalo que aparecen en fibras cardíacas parcialmente despolarizadas. A nivel más general, el Ca^{2+} también regula la activación de diversas enzimas, la coagulación, agregación plaquetaria, diferenciación y proliferación celular y adhesión e integridad celular (Godfraind y cols, 1986; Meldolesi y Pozzan, 1987; Nayler, 1988).

Las células mantienen una distribución iónica asimétrica a ambos lados de la membrana celular, como consecuencia de diferencias en la permeabilidad de dichas membranas y de la existencia de bombas, cuya función permite mantener el gradiente electroquímico. Así, en las células musculares cardíacas y lisas vasculares en reposo, la concentración de Ca^{2+} intracelular libre es de 10.000 veces menor que la concentración de Ca^{2+} extracelular (10^{-7}M vs 10^{-3}M). Por otro lado, el interior de la célula es electronegati-

vo (entre -85 y -55 mv), es decir, que existe un gradiente electroquímico que tendería a facilitar la entrada de Ca^{2+} extracelular hacia el interior de la célula. Sin embargo, y aunque en una célula en reposo la membrana celular es muy poco permeable al Ca^{2+} , durante la activación celular la concentración de Ca^{2+} intracelular aumenta hasta 100 veces. Este aumento es debido a la entrada de Ca^{2+} extracelular y/o a la liberación del Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplásmico. La entrada de Ca^{2+} extracelular a favor de su gradiente electroquímico se realiza a través de los canales específicos para el Ca^{2+} o a través del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Este movimiento del Ca^{2+} a través de sus canales puede medirse como una corriente iónica y actúa como mensajero celular (Triggle y cols, 1989).

Los canales iónicos pueden ser regulados mediante señales químicas o eléctricas, de ahí que los canales de Ca^{2+} se dividan en dos clases:

3.1. CANALES DE Ca^{2+} ACTIVADOS POR RECEPTORES.

Los canales iónicos sujetos a modulación química pueden ser activados:

- a) Directamente, tras la unión del agonista a su receptor (Hille, 1984; Triggle y cols, 1989).
- b) Indirectamente, a través de segundos mensajeros que se activan tras la activación del receptor (Hockberger y Swandulla, 1987; Hofmann y cols, 1987).

El receptor y el canal iónico pueden estar en la misma proteína o formando un complejo oligomérico, comunicados ambos directa o indirectamente mediante segundos mensajeros como el AMPc, GMPc, DAG, PKC e IP_3 . Adicionalmente, los canales pueden estar modulados por receptores unidos a nucleótidos de guanina acoplados a la proteína G (Brown y Birnbaumer, 1988; Triggle y cols, 1989).

Los canales de Ca^{2+} acoplados a receptores pueden ser activados por el IP_3 , IP_4 (metabolito del anterior), la PLC y el ATP (Von Tschärner y cols, 1986; Kuno y Gardner, 1987; Penner y cols, 1988; Triggle y cols, 1989). El IP_3 e IP_4 producen la liberación de Ca^{2+} intracelular procedente del retículo sarcoplásmico y vacían el Ca^{2+} almacenado a este nivel; el vaciamiento de los depósitos intracelulares, activa los canales de Ca^{2+} de la membrana, lo que permite la entrada de Ca^{2+} y rellena los depósitos. De esta forma, la activación del receptor se acopla a la entrada de Ca^{2+} extracelular (Luckhoff y Clapham, 1992).

Se ha demostrado que el PAF induce un rápido incremento de Ca^{2+} intracelular en plaquetas de conejo y humanas (Avdonin y cols, 1987), en neutrófilos de conejo y humanos (Molski y cols, 1989), en PMNs humanos (Ng y Wong, 1989a), en células neuronales (Kornecki y Ehrlich, 1988) y en células

endoteliales humanas a través de la unión a su receptor (Hirafuji y cols, 1988). El aumento de Ca^{2+} intracelular inducido por PAF es un proceso mediado a través de la estimulación de receptores específicos, ya que los antagonistas del PAF suprimen este aumento de forma dosis-dependiente (Ng y Wong, 1989b). Estudios sobre la cinética de los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular en plaquetas humanas han revelado que el tiempo que transcurre entre la unión del ligando a su receptor y la aparición del incremento de Ca^{2+} en el interior de la célula es de 200-400 ms (Sage y Rink, 1987). La unión del PAF a su receptor activa la PLC e hidroliza los fosfolípidos de la membrana, produciendo fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato que a su vez, produce dos moléculas que actúan como segundos mensajeros: IP_3 y DAG. El IP_3 induce movilización de Ca^{2+} de sus depósitos internos y el DAG, por otro lado, activa la PKC y fosforila diversas proteínas específicas, que también estarían implicadas en la movilización de Ca^{2+} intracelular (Braquet y Godfroid, 1986). Además, el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y la disminución de Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplásmico podrían activar los canales de Ca^{2+} activados por receptor situados en las membranas celulares, favoreciendo la entrada de Ca^{2+} extracelular a su través (Hwang, 1990; Berridge, 1990). Estudios recientes han mostrado que las plaquetas humanas poseen canales de Ca^{2+} activados por receptor que no parecen acoplarse a segundos mensajeros (Mahaut-Smith y cols, 1990; Sage y cols, 1992), lo que explicaría por qué el PAF, a la concentración de 10^{-12}M , estimula la entrada de Ca^{2+} sin aumentar o aumentando poco el contenido de IP_3 (James-Kracker y cols, 1994).

3.2. CANALES DE Ca^{2+} ACTIVADOS POR CAMBIO DE VOLTAJE.

A partir de estudios electrofisiológicos y farmacológicos se ha podido establecer diferentes tipos de canales de Ca^{2+} activados por cambio de voltaje:

3.2.1. CANALES TIPO-L.

Se activan a -30/-20 mV (fase 2 del potencial de acción), alcanzando su máxima activación entre 0 mV y +20 mV y presentan un potencial de inversión de +60 mV y una conductancia de 18-24 pS en presencia de 110 mM de Ba^{2+} (Hosey y Lazdunski, 1988; Bean, 1989; Tsien y cols, 1991). Su inactivación ($\tau > 200$ ms) es voltaje y Ca^{2+} -dependiente (se acelera al aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_o$, cuando el Ca^{2+} se reemplaza por Sr^{2+} ó Ba^{2+} , cuando el Ca^{2+}_i se tampona con EGTA o se bloquea con Co^{2+}). La constante de tiempo de reactivación aumenta desde 100 ms a -80/-100 mV (30-50 ms y 25 ms a 37°C) hasta 240 ms a -40 mV. Se bloquea por cationes di/trivalentes (La^{3+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+}) y por fármacos (bloqueantes de los canales de Ca^{2+} , BCCa) y mediadores celulares (neuropéptido Y, somatostatina y AA). La Angiotensina II, CGRP, paratormona, vasopresina (V1), serotonina (5-HT₄), sustancia P y PGI_2 activan los canales tipo L. Estos canales L constituyen la principal vía de entrada de Ca^{2+} en las células musculares lisas vasculares y cardíacas y contribuyen a la liberación de neurotransmisores y hormonas en diversas células endocrinas.

El canal consta de 5 subunidades: α_1 subunit (212 kd y 175 kd), α_2 (145 kd), β (54 kd), γ (30 kd) y δ (27 kd) (Catterall, 1988; McKenna y cols, 1990; Tsien y cols, 1991). La subunidad α_1 actúa como canal voltaje-dependiente y contiene los puntos de unión para los BCCa. El RNAm que codifica esta subunidad se encuentra en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13.3) existiendo múltiples isoformas (8.5 kb) procedentes de distintos genes. La subunidad α_1 presenta cuatro dominios transmembrana (I-IV), cada uno de los cuales contiene 6 segmentos transmembrana (S1-S6). La subunidad β contiene puntos de fosforilación para la PKA dependiente del AMPc (Campbell y cols, 1988; Catterall, 1988). La coexpresión de subunidades α_2/δ y β aumenta la amplitud y desplaza a valores más negativos la activación de la corriente de Ca^{2+} . La coexpresión de las subunidades α_1/β (Lory y cols, 1993) aumenta el número de puntos de unión para DHPs y acelera la inactivación del canal.

3.2.2. CANALES TIPO-P.

Descritos inicialmente en células cerebelosas de Purkinje, presentan una conductancia de 9-18 pS en presencia de 80 mM Ba^{2+} (5-8 pS en 100 mM Ca^{2+}) (Llinas y cols, 1989a). Se activan a potenciales negativos a -50 mV y muestran una inactivación muy lenta ($\tau = 1$ s). Se distribuyen ampliamente por el sistema nervioso central, predominando en las fibras de Purkinje, oliva inferior, bulbo olfatorio e hipocampo (Hillman y cols, 1991). Son resistentes a DHPs y ω -conotoxina, pero se bloquean por Cd^{2+} , Co^{2+} y por el veneno de la araña *Agelenopsis aperta* (Ftx) (Llinas y cols, 1989b). Una de las fracciones purificadas, la agatoxina IVA, es un bloqueante competitivo de estos canales.

3.2.3. CANALES TIPO-N.

En las neuronas N del ganglio dorsal se activan a potenciales positivos a -50 mV, presentan una conductancia de 7-14 pS y su inactivación ($\tau = 50$ ms) es un proceso Ca^{2+} -dependiente (Fox y cols, 1987a y b). Son sensibles a DHPs y se bloquean de forma irreversible por la toxina ω -conotoxina GVIA, un veneno del caracol marino *Conus geographus*. También se bloquean de forma reversible por la ω -conotoxina MVIIC, extraída del caracol *Conus magus*. Los canales N se encuentran principalmente en neuronas simpáticas y sensoriales, localizándose en los terminales presinápticos correspondientes a las zonas activas que participan en la liberación del neurotransmisor (Miller, 1987; Smith y Augustine, 1988; Sher y cols, 1991; Bertolino y Llinas, 1992) y en tejidos endocrinos, pero no parecen existir en células musculares. Parecen estar implicados en el control de la transmisión sináptica en neuronas periféricas y en el control de la liberación hormonal en células endocrinas (Bertolino y Llinas, 1992).

3.2.4. CANALES TIPO-T.

Se activan ($\tau = 20$ ms) entre -60/-50 mV, alcanzan su conductancia máxima (5-9 pS) a -40/-10 mV y su potencial de inversión a +40/+50 mV. Su inactivación es voltaje-dependiente y se completa

a -40 mV; sin embargo, su inactivación ($\tau = 5-10$ ms) no se modifica tras adicionar EGTA a la pipeta, al aumentar la $[Ca^{2+}]_o$ o al cambiar Ca^{2+} por Ba^{2+} , lo que indica que no depende de la $[Ca^{2+}]_i$. Se bloquea por cationes (es más sensible al Ni^{2+} y menos al Cd^{2+}), Tetrametrina, AA, Amilorida, algunos alcoholes (octanol, decanol), Flunarizina y Difenilhidantoína; sin embargo, es insensible a Bay K8644 o a Isoproterenol. Por el contrario, Angiotensina II y Ouabafina facilitan la apertura de los canales tipo T. El rango de activación (-65 a -55 mV) de los canales T coincide con la parte final del potencial marcapaso y es 10 mV menos negativo que el de la corriente de entrada de Na^+ (I_{Na}). Por ello, podrían tener su papel en la actividad marcapaso y en la conducción de impulsos en tejidos en los que la I_{Na} está parcial/totalmente inactivada por la despolarización del potencial de membrana (E_m) (Bean, 1985; Carbone y cols, 1987; Bolton, 1988; Tseng y cols, 1989).

Los canales tipo-L y T condicionan dos tipos diferentes de corrientes de Ca^{2+} cuyas características diferenciadoras son las siguientes:

	L	T
Amplitud (pA)	0.4 - 2	0.48 - 2
Densidad (pA/pF)	0.4 - 1.2	0.13
Conductancia (pS)		
(110Ca/110 mM Ba)	8/25	6 - 8
Selectividad	$Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$	$Ca^{2+} = Ba^{2+}$
Umbral (mV)	-30	< 60
Inactivación	Ca^{2+} /Voltaje	Voltaje
Distribución	General	No general
Función	Contracción	Actividad Marcapaso

3.2.5. OTROS CANALES DE Ca.

Utilizando toxinas como herramientas de trabajo se han identificado los canales O, que se corresponden a un sitio de alta afinidad para la ω -conotoxina MVIIC y el canal Q, identificado en neuronas de hipocampo, que es insensible al bloqueo por DHPs, ω -conotoxina GVIA y agatoxina IVA, pero que es bloqueado por la ω -conotoxina-MVIIC. Existe un nuevo canal, el R, de rápida inactivación insensible a DHPs, ω -conotoxina GVIA, agatoxina IVA y ω -conotoxina MVIIC, pero que se bloquea por el Ni^{2+} .

3.3. MECANISMO DE ACCION DE LAS DIHIDROPIRIDINAS BLOQUEANTES DE LOS CANALES DE Ca^{2+} .

Estos fármacos se unen específicamente a receptores localizados en la subunidad α_1 del canal tipo-L de Ca^{2+} , estando su afinidad modulada por el estado (reposeo-R, activo-A, inactivo-I) del mismo. Atraviesan la superficie lipídica de la membrana y alcanzan su receptor por difusión lateral tras incorporarse a la membrana. El receptor es una región hidrofóbica cercana a la superficie externa del canal localizada en los segmentos S5-S6III (989-1022 y 1025-1040) y IVS6 (1349-1391).

Las DHPs exhiben mayor afinidad por el estado I, no conductor, que es el que predomina al despolarizar el potencial de membrana y en las células que generan potenciales de acción más prolongados. El potencial de reposo en las células musculares auriculares y ventriculares y de Purkinje es muy negativo (-80 a -90 mV), mientras que en los nodos SA y AV cardíacos y en las fibras musculares lisas vasculares es de unos -60 mV. Por otro lado, la duración del potencial de acción cardíaco oscila entre 175-350 ms, mientras que en las fibras musculares lisas vasculares se prolonga durante varios segundos. Ello explica por qué los BCCa presentan más afinidad por las fibras musculares vasculares que por las células nodales y musculares cardíacas y pueden producir vasodilatación a concentraciones a las que apenas sí modifican la contractilidad cardíaca, la frecuencia sinusal o la conducción AV (selectividad vascular).

Las DHPs no prolongan la reactivación del canal tipo-L, por lo que el número de canales que se encuentran en estado I no aumenta al incrementar la frecuencia cardíaca, es decir, que el bloqueo que producen no es frecuencia-dependiente. Este hecho, unido a la taquicardia refleja que por su acción vasodilatadora producen, explica por qué las DHPs carecen de propiedades antiarrítmicas.

Las 1,4-dihidropiridinas representan un grupo de fármacos muy importantes en la terapéutica cardiovascular. Están encuadradas dentro del heterogéneo grupo de compuestos denominado bloqueantes de los canales de Ca^{2+} , cuyas propiedades farmacológicas son consecuencia directa de su capacidad para inhibir el flujo de entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo-L de las células excitables (Speding y Paoletti, 1992).

Para que estos compuestos presenten actividad bloqueante de la entrada de Ca^{2+} han de reunir una serie de condiciones estructurales (Mannhold y cols, 1982; Janis y Triggle, 1983; Rampe y Triggle, 1989; Triggle y cols, 1989; Triggle, 1991a y b) :

- Es imprescindible la hidrogenación en la posición 1,4 del anillo de la piridina. La oxidación del anillo dihidropiridínico anula dicha actividad.
- La actividad antagonista aumenta con la presencia de sustituyentes en la posición 4 del

anillo dihidropiridínico. El orden de actividad para estos sustituyentes es: H < metilo < cicloalquilo < heterociclo < fenilo < fenilo sustituido.

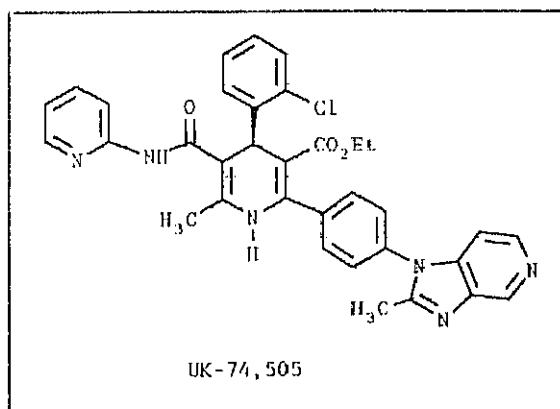
- La presencia de radicales en el anillo fenilo aumenta la actividad antagonista. Estos sustituyentes suelen ser aceptores de electrones, como el grupo NO₂, y el orden de actividad es: posición orto > meta > para.
- El radical en posición 2 suele ser un grupo alquílico pequeño (metilo). A veces, todo el grupo éster es sustituido por un grupo acetyl, ciano o cetona.
- El radical del C₃ suele ser un grupo alquílico.
- Es imprescindible la presencia de un H en el N para poder interaccionar con el receptor del canal.
- El C₅ puede ser un carbono asimétrico, presentando los enantiómeros del fármaco actividad agonista o antagonista.
- El radical del C₆ puede ser voluminoso (isobutil, etc.).

Se ha propuesto que el anillo dihidropiridínico ha de adoptar una conformación de bote y el radical fenilo en posición 1 estar en un plano distinto al del anillo de DHP, en posición pseudoaxial. De este modo, la libertad rotacional del radical fenilo sobre el enlace formado entre el C₁ y C₇ está estéricamente restringida y, por tanto, el plano del anillo fenilo está obligado a permanecer encerrado entre el plano de simetría vertical constituido por el N y el C₁ del anillo de DHP. Con respecto a los sustituyentes del radical fenilo, existe una preferencia hacia la conformación sinperiplanar (alejada del anillo de DHP), siendo ésta la que mejor encaja con el receptor. Las funciones éster de los C₂ y C₆ han de estar coplanares con el anillo de DHP. Por último, el enlace N-H es fundamental para la interacción con el receptor, ya que estabiliza la estructura al poseer un grupo donador de electrones para formar enlaces con la proteína del canal (Triggle y cols, 1989).

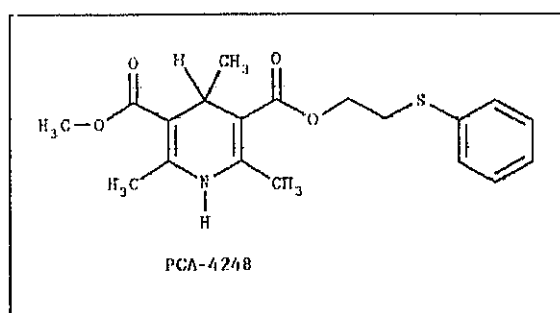
Ultimamente, se han sintetizado compuestos con estructura 1,4-DHP, carentes de actividad antagonista de Ca²⁺ pero sí con una potente actividad antagonista del PAF. Entre ellos están:

-**UK-74,505**. Es el compuesto más activo de una nueva serie de 2-(4-heterociclofenil)-1,4-DHPs. Presenta un grupo 2-metilimidazo[4,5-c]piridilfenilo en posición 5, un clorofenilo en posición 1 y un grupo 2-piridilcarbamoil en posición 2 (Cooper y cols, 1992). Posee una alta selectividad por el receptor de PAF,

mientras que la afinidad por el binding de [3 H]Nitrendipino es débil ($IC_{50} = 6.6 \mu M$). Inhibe la agregación plaquetaria inducida por el PAF ($IC_{50} = 25 \text{ nM}$), pero no la producida por Trombina, Colágeno, AA ó ADP. Administrado en perros por vía oral, el UK-74,505 inhibe la agregación plaquetaria producida por el PAF y este efecto persiste durante 24 horas. In vitro es 33 veces más potente que WEB-2086 y alrededor de 8 veces más potente en el test de letalidad del ratón inducido por PAF. Sin embargo, el fármaco per se, administrado por vía oral en perros conscientes, no produce cambios en la frecuencia cardíaca ni sobre la presión arterial. Este fármaco, que presenta una elevada potencia por vía oral, alta selectividad y larga duración de acción, se encuentra actualmente en fase II de investigación clínica (Cooper y cols, 1992).



-PCA-4248. En los últimos años, la principal línea de investigación seguida por los Laboratorios Alter ha sido la modulación del núcleo 1,4-dihidropiridínico, con el fin de obtener productos con diferentes actividades farmacológicas (antitrombóticos, Bloqueantes de los canales del Ca^{2+} , etc); entre ellos, algunos derivados dihidropiridínicos presentaban una potente actividad como antagonistas del receptor del PAF. Dentro de este último grupo, el PCA-4248 [2-(feniltio)etil-5-metoxicarbonil-2,4,6-trimetil-1,4-dihidropiridina-3-carboxilato] demostró ser el compuesto más activo.



El PCA-4248 inhibe de forma dosis-dependiente la agregación plaquetaria y la liberación de ATP y serotonina inducida por el PAF en plaquetas de conejo (Sunkel y cols, 1990), pero no inhibe la agregación plaquetaria inducida por ADP, trombina, colágena ó AA. También inhibe la agregación de plaquetas humanas de forma dosis-dependiente (Ortega y cols, 1990). Además, el PCA-4248 es un potente inhibidor de la unión del PAF a sus receptores en PMNs, incluso más potente que sobre el receptor plaquetario (Ortega y cols, 1990) y carece de efectos inhibitorios sobre la actividad de la PLA₂ (Preclinical study of the new PAF-antagonist PCA-4248, N° PRCL4248). Ensayos realizados sobre macrófagos estimulados por PAF y formil-metil-leucil-fenilalanina (fMLP) muestran que el PCA-4248 bloquea de manera dosis-dependiente la producción de anión superóxido inducida por ambos, siendo esta inhibición menos marcada en macrófagos estimulados por fMLP que por PAF (Preclinical study of the new PAF-antagonist PCA-4248, N° PRCL4248).

Con respecto a los estudios realizados in vivo, el PCA-4248 inhibe de forma dosis-dependiente la migración eosinofílica tras la inyección intraperitoneal de PAF en el cobaya (Preclinical study of the new PAF-antagonist PCA-4248, N° PRCL4248) y la exudación y acumulación de leucocitos y eosinófilos inducidas tras la administración de PAF en la cavidad pleural de ratas (Lima y cols, 1990). Además, inhibe la extravasación de plasma inducida por PAF (1 µg/Kg), inmunoagregados solubles (40 mg/Kg) y endotoxina (0.5 mg/Kg) i.v. (Fernández-Gallardo y cols, 1990); inhibe la leucopenia y trombocitopenia inducida por la endotoxina, reduce significativamente la extravasación de plasma rico en proteínas e inhibe de manera dosis-dependiente la hipotensión sistémica causadas por 2,4-dinitrofenil-BSA (DNP-BSA) (Fernández-Gallardo y cols, 1992). Sin embargo, no evita la formación de LTD₄ producido en respuesta al antígeno, lo que indica que actúa solamente a nivel del receptor de PAF. También reduce de forma dosis-dependiente la mortalidad producida por el PAF o la endotoxina en el ratón (Sunkel y cols, 1990).

La administración intradérmica de PAF produce un acúmulo de seroalbúmina bovina marcada (¹²⁵I-BSA) en el lugar de la inyección, que alcanza su máximo al cabo de 30 minutos. Este efecto es bloqueado cuando el animal se pretrata con PCA-4248 (1 mg/kg). La administración intradérmica de TNF_α (0.2 mg/kg) también produce un acúmulo de ¹²⁵I-BSA, que es igualmente bloqueado por el PCA-4248. Esta inhibición podría no estar relacionada con el receptor de PAF, lo que sugiere una cierta actividad anti-TNF del PCA-4248 (Fernández-Gallardo y cols, 1990).

El PCA-4248 (3-10 mg/Kg) antagoniza la broncoconstricción inducida en cobayas tras la administración por vía sistémica e intratraqueal de PAF y reduce el número de plaquetas y leucocitos circulantes de forma dosis-dependiente. Sin embargo, a esas mismas dosis, no antagoniza la broncoconstricción producida tras la administración intravenosa de histamina, serotonina o acetilcolina, lo que demuestra su selectividad. En pulmón aislado de cobaya, sensibilizado o no, inhibe la broncoconstricción inducida por 100 y 1000 ng de PAF, así como la formación de TXB₂ y de anión superóxido producidos por macrófagos alveolares estimulados por PAF y fMLP (Desquand y cols, 1990 y 1993).

La administración oral de PCA-4248 en ratas (2.5-25 mg/Kg) inhibe de manera dosis-dependiente la exudación pleural inducida por PAF (1 μ g/cavidad) y, en menor extensión, por serotonina (100 μ g/cavidad), pero no modifica la inducida por histamina (200 μ g/cavidad). Sin embargo, en modelos de pleuresía inducida por un alérgeno (ovoalbúmina) en ratas sensibilizadas activamente, el PCA-4248 inhibe parcialmente la exudación pleural por un mecanismo independiente del PAF, ya que antagonistas específicos del receptor de PAF como WEB-2086 y BN 52021 son inactivos, lo que sugiere un mecanismo relacionado posiblemente con la serotonina (Preclinical study of the new PAF-antagonist PCA-4248, N° PRCL4248).

En modelos de inflamación inducida por PAF y carragenina en la pata de ratón han mostrado que PCA-4248 produce una inhibición, dosis-dependiente, del edema de la pata, de la exudación pleural y de la migración celular inducida por ambos (Henriques y cols, 1990). La inhibición del edema producido por PAF en ratón sensibilizado con una dosis de antígeno es menor que en ratón no inmunizado e inmunizado sin dosis de recuerdo, ya que la cantidad de PAF endógeno liberado durante la reacción anafiláctica podría no ser muy elevada, lo que indicaría un antagonismo exclusivo del receptor de PAF (Amorim y cols, 1993).

En ratas a las que se inducen úlceras mediante la administración intravenosa de PAF (50 ng/Kg/min), seguida de la administración a través de una cánula esofágica de una solución que contiene un 5% de etanol y 100 mM de HCl, el PCA-4248 reduce el daño de la mucosa gástrica (hiperemia, vasocongestión y hemorragia) de manera dosis-dependiente; igualmente, disminuye el daño gástrico producido por la endotoxina de la *Salmonella typhosa* (75 mg/Kg) (Preclinical study of the new PAF-antagonist PCA-4248, N° PRCL4248).

En estudios realizados sobre la toxicidad renal producida por Ciclosporina A en el conejo, el PCA-4248 revierte la disminución de la filtración glomerular y aumenta la reabsorción de Na⁺, lo que sugiere una protección de la función tubular y confirma la posible implicación del PAF en la nefrotoxicidad producida por Ciclosporina A (Fonteles y cols, 1990).

En el trasplante cardíaco heterotrópico en ratas Lewis, el PCA-4248 (10 mg/kg/día) disminuye el infiltrado inflamatorio, la intensidad del edema y necrosis miocelular, así como las vasculitis, pero no modifica la supervivencia (Jiménez de la Puerta, 1993).

Finalmente, ensayos clínicos en fase I muestran que el PCA-4248 no produce cambios sobre la presión arterial, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, parámetros bioquímicos o hematológicos. A la dosis de 160 y 320 mg reduce de forma dosis-dependiente la agregación plaquetaria inducida por PAF (Preclinical study of the new PAF-antagonist PCA-4248, N° PRCL4248).

JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

JUSTIFICACION DE LA TESIS.

El Factor de Activación Plaquetaria o PAF es un potente mediador inflamatorio de carácter fosfolípídico que está implicado en una gran variedad de procesos fisiopatológicos. El desarrollo de potentes y selectivos antagonistas del receptor del PAF ha proporcionado la posibilidad de analizar la participación real del PAF en diferentes patologías y ha contribuido al tratamiento de enfermedades tales como asma, inflamación, isquemia y en diversos tipos de shock.

El grupo de investigación de los Laboratorios Alter, interesado en la modulación del núcleo 1,4-dihidropiridínico y en el estudio de la actividad asociada a este núcleo, llegó a la síntesis del compuesto PCA-4248, una 4-alkil-1,4-dihidropiridina. Dicho compuesto, que no presentó propiedades bloqueantes de canales de Ca^{2+} , mostró una potente actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria inducida por PAF, sin modificar la respuesta de las plaquetas a otros agentes agonistas.

Debido a que los resultados obtenidos con varios antagonistas de PAF en los ensayos clínicos de asma bronquial no han sido muy satisfactorios, en la actualidad el interés de estos compuestos se centra en su posible utilidad en el tratamiento del shock. Por tanto, el objetivo de esta tesis se ha centrado en :

- 1.- El estudio de los efectos cardiovasculares del PCA-4248 in vitro.
- 2.- El estudio de los efectos cardiovasculares del PCA-4248 in vivo.
- 3.- El posible efecto protector del PCA-4248 en varios modelos de shock experimental.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESTUDIOS REALIZADOS IN VITRO.

1.1. REGISTRO DE LA FUERZA CONTRACTIL EN LA AORTA AISLADA DE CONEJO.

La aorta aislada es la preparación de elección para evaluar sustancias potencialmente vasodilatadoras, cuyas propiedades farmacológicas están vinculadas a su capacidad para inhibir la entrada del Ca^{2+} en la célula a través de canales iónicos específicos, sensibles a cambios de voltaje.

Las aortas se colocaron en baños de órganos de 40 ml de volumen, de doble pared, a través de la cual circula líquido caliente procedente del sistema de calentamiento, lo que permite mantener el líquido nutritivo a temperatura constante ($37 \pm 0.1^\circ\text{C}$) durante todo el experimento. El baño del órgano tiene en su parte inferior un sistema de desagüe, conectado a una trompa de vacío.

El líquido nutritivo utilizado fue una solución Krebs-Henseleit bicarbonatado de la composición (mM): NaCl, 110; CaCl_2 , 2.5; KCl, 4.7; KH_2PO_4 , 1.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.2; NaHCO_3 , 25 y glucosa, 11. En algunos experimentos se utilizó Krebs libre de Ca^{2+} y con una concentración de KCl de 35 mM. La solución se oxigenó a través de un tubo de vidrio con una mezcla carbógena que contiene un 5% de CO_2 y un 95% de O_2 , manteniendo un burbujeo constante durante todo el experimento.

Las arterias se conectaron a un transductor isométrico PANLAB UF-1, registrándose la contractilidad aórtica en un registrador OMNISCRIBE D-500 (Bausch and Lomb).

1.1.1. MONTAJE DE LA PREPARACION.

Se utilizaron conejos albinos Neozelandeses machos de pesos comprendidos entre 2-2.5 Kg. Se sacrificó y desangró al animal por decapitación y a continuación se procedió a la apertura del tórax. Se retiraron el corazón y los pulmones para facilitar la extracción rápida de la aorta, utilizando la porción torácica inmediatamente después del cayado aórtico, que se colocó en una placa de Petri que contenía solución Krebs a temperatura ambiente. La aorta se limpió cuidadosamente de tejido conectivo y se cortó en tiras helicoidales de 2-3 mm de ancho por unos 15 mm de largo.

Los extremos de las tiras se ataron con hilo de seda 000; el extremo superior se fijó al transductor y el inferior a una varilla fijada en el baño de órganos. Las tiras fueron sometidas a una tensión inicial de 2.5 g y se estabilizaron durante al menos una hora en solución libre de Ca^{2+} . Pasado este tiempo, se sustituyó el Krebs libre de Ca^{2+} por Krebs libre de Ca^{2+} que contenía 35 mM de KCl, con el fin de despolarizar la membrana. Diez minutos después, se adicionaron 1.5 mM de CaCl_2 al medio de incubación, lo que provocó la contracción de la aorta. La adición de CaCl_2 fue repetida varias veces hasta obtener dos

contracciones iguales, a las que se les asignó el valor control (100%). A continuación, las aortas se incubaron en Krebs libre de Ca^{2+} que contenía 35 mM de KCl y se añadió la primera dosis del fármaco a ensayar; al cabo de 10 minutos se volvió a provocar la contracción con 1.5 mM de CaCl_2 .

En otro grupo de experimentos, las tiras de aorta se incubaron en Krebs-Henseleit y se indujo una respuesta contráctil tras la adición al baño de Noradrenalina (NA) 10^{-7} M. Esta operación fue repetida varias veces hasta obtener dos contracciones iguales, a las que se asignó el valor control.

1.2. REGISTRO DE LA FUERZA CONTRACTIL EN ARTERIA CORONARIA AISLADA DE CERDO.

1.2.1. MONTAJE DE LA PREPARACION.

Se utilizó la arteria coronaria descendente anterior izquierda procedente de corazones de cerdo obtenidos del matadero municipal. Tras la disección, las arterias se transportaron al laboratorio en un recipiente que contenía solución de Krebs a temperatura ambiente. La coronaria se limpió cuidadosamente de tejido conectivo y se cortó en tiras helicoidales de 2-3 mm de ancho por unos 12 mm de largo. Las tiras se fijaron al transductor y al baño de órganos y fueron sometidas a una tensión inicial de 2.5 g, estabilizándose durante al menos una hora.

1.3. REGISTRO DE LA FUERZA CONTRACTIL EN LA AURICULA AISLADA DE COBAYA.

Esta preparación permite conocer los efectos de un fármaco sobre el inotropismo auricular y el cronotropismo del nodo sinusal.

1.3.1. REGISTRO DE LA CONTRACTILIDAD AURICULAR.

Las aurículas se incubaron en baños de órganos que contenían solución de Tyrode mantenida a $33 \pm 0.1^\circ\text{C}$, oxigenada con mezcla carbógena. La composición del Tyrode fue (mM): NaCl, 137; KCl, 5.4; CaCl_2 , 1.8; MgCl_2 , 0.5; NaH_2PO_4 , 0.36; NaHCO_3 , 11.9; y glucosa, 5.5. En estas condiciones, las aurículas derechas laten espontáneamente, mientras que las izquierdas deben ser estimuladas eléctricamente.

La aurícula izquierda se montó en un electrodo de estimulación bipolar constituido por dos polos de platino con una separación de 1-1.5 cm. El polo inferior, donde se fijó la aurícula, es recto, mientras que el polo superior tiene forma de aro, de 0.8 mm de diámetro. Para la estimulación se utilizaron pulsos rectangulares de 0.5 ms de duración con un voltaje doble al umbral a la frecuencia de 3 Hz, generados en

un estimulador GRASS modelo 5D9B. La contractilidad auricular se realizó en un polígrafo GRASS 7C POLIGRAPH de 4 canales conectado a transductores fuerza-desplazamiento GRASS FTO3.

1.3.2. MONTAJE DE LA PREPARACION.

Se utilizaron cobayas machos de pesos comprendidos entre 350-450 g. Previa inyección intraperitoneal de 0.2 ml de heparina sódica al 5%, 10 minutos antes del experimento, con el fin de evitar la formación de trombos intraauriculares durante la extracción del corazón, se sacrificó al animal por decapitación. A continuación, se procedió a la apertura del tórax y se extrajo el corazón que se introdujo en un vaso de precipitado que contenía Tyrode oxigenado a temperatura ambiente, donde se disecaron ambas aurículas. Cada aurícula se fijó con hilo de seda en dos puntos: en su base y en la mitad del reborde extremo auricular. El nudo de la base fijó la aurícula, mientras que el hilo que fijaba el reborde auricular se conectó al transductor FTO3, aplicándose una tensión de 1 g utilizando un tornillo micrométrico.

1.3.3. PROTOCOLOS UTILIZADOS.

1.3.3.1. Estudios de inotropismo y cronotropismo auricular.

Tras el montaje de las preparaciones, se dejaron estabilizar durante un período de 30-45 minutos y se comenzó la administración acumulativa de PCA-4248, Nitrendipino o su vehículo (DMSO) a concentraciones comprendidas entre 10^{-10} M y 10^{-8} M (intervalo interdosis = 15-20 minutos).

1.3.3.2. Interacción con el Isoproterenol (ISP) en aurículas izquierdas.

Tras el montaje y estabilización de las preparaciones, se administró de forma acumulativa el ISP (10^{-11} M- 10^{-5} M) para obtener una curva concentración-respuesta. Posteriormente se lavó la preparación 3-4 veces a intervalos de 5 minutos. Este proceso se repitió hasta obtener dos curvas iguales. PCA-4248 y Propranolol (10^{-9} M- 10^{-6} M) fueron añadidos al baño 20 minutos antes de obtener una nueva curva concentración-respuesta al ISP.

1.4. REGISTRO DEL FLUJO DE 45 Ca.

Se utilizaron cobayas de 350-450 g. Tras sacrificar el animal, las aurículas fueron disecadas y seccionadas en sentido longitudinal. Las hemiaurículas fueron colocadas en baños de órganos y se incubaron con solución de Tyrode de la siguiente composición (mM): NaCl, 137; KCl, 5.4; CaCl_2 , 1.8; MgCl_2 , 1.05; NaH_2PO_4 , 0.42; NaHCO_2 , 11.9; y glucosa, 5.5. El Tyrode fue oxigenado con carbógeno y

mantenido a la temperatura de $34 \pm 0.1^\circ\text{C}$. En un grupo de experimentos se utilizó solución Tyrode con CaCl_2 3.6 mM. Tras ajustar la tensión a 1 g, las aurículas fueron estimuladas utilizando electrodos bipolares utilizando pulsos de 0.5 ms de duración, (voltaje doble al umbral) a la frecuencia de 1 y 3 Hz.

Tras el período de estabilización, a las hemiaurículas experimentales se les añadió PCA-4248, 10^{-7}M . Al cabo de otros 30 minutos, se adicionó $^{45}\text{CaCl}_2$ para obtener en el líquido nutricio una actividad específica de 37 kBq/ml (1 $\mu\text{Ci/ml}$). Las preparaciones permanecieron expuestas al ^{45}Ca durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, las hemiaurículas fueron desmontadas, lavadas, secadas en papel de filtro y pesadas. Finalmente, las preparaciones fueron introducidas en viales de borosilicato sódico, de bajo contenido en potasio, y la reactividad se determinó en un contador de centelleo en fase líquida (Intertechnique SL 3000), con un tiempo de contaje de 10 minutos. Los cálculos para la corrección de extinción, eficacia de contaje y captación de ^{45}Ca por las preparaciones experimentales y controles se realizó según lo descrito por Díez y cols (1985).

1.5. REGISTRO DE LA CONTRACTILIDAD VENTRICULAR, DEL ELECTROGRAMA DEL HAZ DE HIS Y DEL ELECTROCARDIOGRAMA PERIFÉRICO EN CORAZONES AISLADOS Y PERFUNDIDOS DE RATA.

La modificación de la técnica de LANGENDORFF para corazones de animal pequeño descrita por Ramón y cols. en 1979, permite registrar el ECG periférico, el electrograma de la unión A-V y del haz de His y de la contracción ventricular (Ramón y cols, 1979).

El sistema MARIOTTE de perfusión del corazón consta de dos sistemas de vasos comunicantes, uno que contiene el Tyrode normal y el otro que contiene solución de Tyrode en la que se ha disuelto el fármaco objeto de estudio. Con este sistema, la presión de perfusión viene dada por la altura de la columna del líquido nutricio desde el reservorio hasta la preparación, que resulta ser de 75 cm.

La oxigenación del Tyrode se realizó con carbógeno y fue calentado a $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ al circular a través de un serpentín conectado a un circuito externo de un aparato termostático SELECTA. Las dos salidas inferiores del serpentín convergen en otra final que se conectó a una cánula de Gaddum, a la que se fijó la cánula intraaórtica que permite la perfusión de las arterias coronarias. La parte superior de la cánula de Gaddum dispone de una pequeña cámara de aire, que evita que pequeñas burbujas existentes en el circuito pasen al corazón a través de la cánula intraaórtica y produzcan embolia coronaria.

El corazón se introdujo en un baño cilíndrico de 5 cm de diámetro por 8 cm de altura, de doble pared, entre las que circula líquido caliente procedente del circuito de termostatación. Se mantuvo así una

temperatura similar en el baño y en el líquido nutritivo, evitándose las diferencias de temperatura entre endocardio y epicardio. Las paredes del baño contienen 4 electrodos de platino de 2 mm de diámetro, situados a la misma altura y separados 90° entre sí. En la parte superior del baño hay un tubo de desagüe para el líquido nutritivo, ya que el baño no dispone de recirculación.

1.5.1. SISTEMAS DE ESTIMULACION Y REGISTRO.

Hemos utilizado dos tipos de electrodos:

a) Electrodos de estimulación: Se utilizaron electrodos bipolares, constituidos por dos alfileres de acero inoxidable con una separación entre las puntas de 1 mm, que se colocaron en la zona alta de la aurícula derecha. Los estímulos fueron pulsos rectangulares (0.5 ms de duración, voltaje doble del umbral) a una frecuencia superior a la espontánea del corazón (5-5.5 Hz) por un estimulado GRASS modelo SD9B.

b) Electrodos de registro: Se utilizaron de dos tipos, dependiendo de la señal eléctrica:

b.1) Electrodos periféricos, situados en la pared del baño para el registro del ECG. Son cuatro electrodos de platino de 2 mm de diámetro colocados a la misma altura, con una separación de 90° entre sí. Estos electrodos están en contacto con el líquido nutritivo en el que está bañado el órgano.

b.2) Electrodos intracavitarios. Se utilizaron electrocatéteres de fabricación manual, constituidos por cuatro electrodos con una separación de 1 mm. Los electrodos son de acero inoxidable. El electrograma del haz de His se obtuvo introduciendo el electrocatéter hasta la zona posterior del septo interauricular derecho.

Para el registro del ECG y electrograma del haz de His se utilizaron amplificadores modelo 7P5B, monitorizando las señales en un osciloscopio digital HP54501A. Los parámetros o intervalos en que se divide el electrograma de la unión aurículo-ventricular (A-V) fueron:

- Intervalo ST-A: medido desde el comienzo del estímulo (ST) hasta la primera deflexión rápida auricular (onda A). Representa el tiempo de conducción auricular.

- Intervalo A-H: medido desde la onda A hasta la deflexión hisiana (onda H). Representa la conducción a través del nodo A-V.

- Intervalo H-Q: medido desde la onda H hasta el comienzo de la activación ventricular. Representa el paso del estímulo por el sistema His-Purkinge.

- Intervalo Q-V: medido desde el comienzo de la onda QR hasta la primera deflexión intrínseca ventricular (onda V). Representa el tiempo de conducción a través del septo intraventricular.

La contractilidad ventricular se registró a través de un transductor fuerza-desplazamiento GRASS FTO3. El registro del ECG, electrograma del haz de His y de la contractilidad se realizó en un polígrafo GRASS 7B de 4 canales.

1.5.2. MONTAJE DE LA PREPARACION Y COLOCACION DE LOS ELECTRODOS.

Se utilizaron ratas Spraguer-Dawley machos, con un peso medio de 285 ± 12 g. Previa heparinización, se sacrificó al animal por decapitación. Tras la apertura del tórax, se extrajo el corazón que se colocó en una placa de Petri, que contenía Tyrode oxigenado a temperatura ambiente. Aquí, se procedió a liberar el corazón del pedículo vascular, restos de tráquea y del pericardio, dejando limpia la aorta ascendente. A continuación, se introdujo la cánula intraaórtica a través de la aorta y se anudó con un hilo de seda de 000. De este modo, el corazón quedó fijo y pendiendo de la cánula, a través de la cual le llega el líquido Tyrode caliente y oxigenado, a una presión de 75 cm de H₂O. Conviene seccionar la arteria pulmonar para evitar sobrecargas de volúmen en las cavidades derechas.

A continuación, se retiraron los restos de vena cava superior para que quede limpio el orificio de entrada a la aurícula derecha, a través del cual se introdujo el electrocatéter intracavitario, buscando la zona septal derecha que permite registrar el electrocardiograma del haz de His. El tiempo empleado en todo este proceso no debe ser superior a 2 minutos; cuando el tiempo se prolonga por encima de 3-4 minutos, se producen arritmias ventriculares repetitivas y bloqueos de conducción que hacen inutilizable la preparación. Esta operación requiere bastante cuidado, ya que se puede lesionar fácilmente el nodo A-V e inducir la aparición de trastornos de la conducción y bloqueos A-V que invalidan la preparación.

Se ha de comprobar que la posición final de la cánula es supra-avalvular y que no está introducida en la cámara de salida del ventrículo izquierdo, ya que si fuera así, se dificultaría la irrigación de las arterias coronarias y se producirían zonas de isquemia miocárdica con la consecuente producción de arritmias, que impedirían la utilización de la preparación. Por último, el ápex cardíaco se fijó al baño, mediante un hilo de seda de 000 del que pende una pesa de 2 g (precarga). También se fijó la cánula intraaórtica al transductor de desplazamiento (FTO3) y así, se registró la contractilidad cardíaca isotónica.

Tras un período de estabilización de 20-30 minutos se obtuvieron los valores control de los

parámetros estudiados y a continuación se inició la perfusión con PCA-4248, Nitrendipino o DMSO (vehículo) durante 45 minutos.

1.6. REGISTRO DE LOS POTENCIALES DE ACCION EN FIBRAS MUSCULARES AURICULARES Y VENTRICULARES DE COBAYA.

El registro de potenciales de acción auriculares y ventriculares permite estudiar las propiedades electrofisiológicas de un fármaco. En estos experimentos se utilizaron tiras de aurícula izquierda y músculos papilares del ventrículo izquierdo, que se colocaron en una cámara de lucita de 10 ml de capacidad y se perfundieron con Tyrode, a una velocidad de 7 ml/minuto. El Tyrode se mantuvo a $34 \pm 1^\circ\text{C}$, utilizando un termostato SELECTA y se oxigenó de forma continua con una mezcla carbógena.

El registro de los potenciales de acción se realizó utilizando microelectrodos de vidrio rellenos con KCl 3 M y con una resistencia de punta de 10-20 M Ω (Valenzuela y cols, 1987). Los microelectrodos se conectan a través de células Ag-AgCl a preamplificadores de capacitancia de entrada variable (WPI modelo 701) y a un osciloscopio de memoria Tektronix 5104N, registrándose las señales en cinta magnética Racal FM de 4 canales. La velocidad de despolarización de la fase 0 del potencial de acción (V_{max}) se determina empleando un diferenciador electrónico (Valenzuela y cols, 1987)

1.6.1. PROTOCOLOS UTILIZADOS.

1.6.1.1. Registro de potenciales de acción auriculares y ventriculares.

Tras 60 minutos de estabilización, se obtuvieron los valores control de los parámetros analizados y se comenzó la perfusión con PCA-4248 (10^{-8}M - 10^{-6}M), registrándose los efectos a los 30 minutos de comenzar la perfusión. En otra serie de experimentos, se incubó la preparación con PAF (10^{-10}M) y se registraron sus efectos en ausencia y en presencia de PCA-4248 (10^{-8}M , 10^{-7}M y 10^{-6}M).

De los registros fotográficos obtenidos se midieron los siguientes parámetros: potencial de reposo (PR, mV), amplitud del potencial de acción (mV), la velocidad máxima de despolarización de la fase 0 ó V_{max} (V/s), la duración del potencial de acción al 50% y al 90% de repolarización (DPA₅₀ y DPA₉₀, ms), el período refractario efectivo (PRE, ms), el cociente PRE/DPA y el tiempo de recuperación de la V_{max} (ms).

Para determinar el PRE, se estimularon las preparaciones a la frecuencia basal de 1 Hz (S_1) y a intervalos variables se interpoló un extraestímulo (S_2) de 1 ms de duración y con un voltaje doble a S_1 , a través del electrodo de estimulación. El extraestímulo S_2 se introdujo hacia la mitad de la fase 4 del

potencial de acción y se fue acercando progresivamente a la fase 3 del potencial de acción precedente hasta que no se obtuvo respuesta propagada. El tiempo de recuperación de la V_{max} se determinó introduciendo un extraestímulo S_2 , de la forma ya descrita, a intervalos de tiempo variables con respecto al estímulo basal S_1 hasta que la V_{max} recuperó totalmente su amplitud. El extraestímulo S_2 se introdujo siempre cada ocho pulsos básicos.

1.6.1.2. Registro de potenciales de acción lentos (Ca^{2+} -dependientes) ventriculares.

Se utilizaron músculos papilares procedentes de cobayos machos de pesos comprendidos entre 350-500 g. Las preparaciones se estabilizaron en solución de Tyrode y a continuación se perfundieron con una solución de Tyrode que contenía 27 mM de KCl. En estas condiciones, el potencial de membrana se depolarizó hasta -43 mV, nivel al que la corriente rápida de Na^+ se encuentra totalmente inactivada, por lo que la fase 0 de los potenciales lentos es debida exclusivamente a la corriente lenta de entrada de Ca^{2+} . La inactivación de la corriente de Na^+ hace a las preparaciones inexcitables; para recuperar la actividad electromecánica se añadió al Tyrode, ISP a la concentración de $10^{-6}M$ y los músculos se estimularon a la frecuencia de 0.12 Hz y con voltaje doble al umbral. Tras 30 minutos de estabilización, se comenzó la perfusión con PCA-4248 ($10^{-9}M$ - $10^{-5}M$), registrándose los efectos de cada concentración del fármaco al cabo de 30 minutos.

1.7. ESTUDIOS DE DESPLAZAMIENTO DEL BINDING DE $[^3H]$ -NITRENDIPINO EN ILEON Y MUSCULO CARDIACO DE COBAYA.

Se realizaron estudios de desplazamiento de la unión de $[^3H]$ -Nitrendipino al canal de calcio en músculo longitudinal de ileon de cobaya y en corazón aislado de cobaya, siguiendo la técnica descrita por Bolger y cols. (1982).

Se utilizaron cobayas machos, con un peso medio entre 300 ± 15 g. Tras decapitación del animal, se extrajo el ileon terminal a través de una laparotomía media y se introdujo en un vaso de precipitado con Tyrode oxigenado. Posteriormente, se seccionó suavemente el músculo longitudinal utilizando unos bastoncillos con algodón; el tejido se troceó con unas tijeras y se limpió con tampón Tris/HCl 50 mM (pH=7.4, a $25^{\circ}C$) que contenía PMSF (Fenilmetilfluorofosfato) 0.1 mM y se homogeneizó en 15 volúmenes/g de peso de tejido húmedo mediante un Potter de teflón (Potter-Elvehjem). El homogeneizado obtenido se centrifugó a $1100 \times g$ durante 20 minutos a $4^{\circ}C$ (Minifuge T, Heraeus). El sobrenadante fue recentrifugado a $10000 \times g$ durante 10 minutos y el sobrenadante se volvió a centrifugar a $45000 \times g$ durante 45 minutos a $4^{\circ}C$ en una ultracentrífuga Beckman L8-60M. El sobrenadante resultante se desechó

Y el pellet se resuspendió en frío en tampón Tris (50 mM) y se recentrifugó a 45000 x g/45 min/4°C. El pellet se resuspendió de nuevo en tampón Tris. La concentración media de proteína obtenida fue de 5-10 mg/ml.

El proceso de preparación del homogeneizado y obtención del pellet del músculo cardíaco fue similar al descrito para león.

Los ensayos de binding se realizaron a temperatura ambiente en presencia de 0.5 mM de CaCl_2 y 0.8 nM de [^3H]-Nitrendipino (Amersham NET-741, 78 mCi/nmol). Después de 5 minutos de preincubación de los microsomas con Nitrendipino o PCA-4248, se añadió el isótopo y se incubaron durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo, se ultrafiltró 1 ml de muestra en un Cell Harvester (Brandel M-24R) y los valores de radioactividad asociados a los filtros se cuantificaron por espectrofotometría de centelleo líquido (Beckman LS 3801). La unión inespecífica del compuesto marcado se valoró por la radioactividad incorporada en presencia de Nitrendipino no marcado (10^{-6}M). Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de desplazamiento del receptor. El contenido de proteínas de cada preparación fue determinado por el método de Lowry y cols. (1951). Los microsomas fueron congelados y conservados a -70°C .

2. ESTUDIOS REALIZADOS IN VIVO.

2.1. MEDIDA DE LA PRESION ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA EN RATA ANESTESIADA.

Esta preparación permite determinar los efectos producidos por los fármacos sobre la Presión Arterial Sistólica (PAS), Presión Arterial Diastólica (PAD), Presión Arterial Media (PAM) y Frecuencia Cardíaca (FC).

2.1.1. APARATO Y SISTEMA DE REGISTRO UTILIZADOS.

Para el registro de la presión arterial y frecuencia cardíaca se utilizó un fisiopoliógrafo HEWLETT-PACKARD 7758B de ocho canales que dispone de cuatro amplificadores (8805B, 8805C y 8805D) para el registro de presión arterial, cada uno conectado a un transductor de presión HEWLETT-PACKARD 1290A. El fisiopoliógrafo se conectó a un sistema informatizado de medida SCROLL MONITOR (BUXCO), que permitía obtener una medida de cada parámetro estudiado a intervalos de 20 segundos.

2.1.2. MONTAJE DE LA PREPARACION.

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos, con un peso medio de 300 ± 15 g y ratas

espontáneamente hipertensas (SHR) machos con un peso de 260 ± 11 g. Se anestesió el animal con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico, 70 mg/Kg (Kirsch Pharma). Antes de empezar el experimento se comprobó el plano de anestesia mediante exploración del reflejo corneal (ausencia de parpadeo) y provocación de estímulos en extremidades (presión en la cara plantar de una extremidad). A continuación, se colocó el animal en decúbito supino, sujetando las extremidades a los puntos de apoyo de una mesa quirúrgica, la cual dispone de un sistema de termostatación con sonda rectal, manteniendo la temperatura del animal durante todo el experimento a $37.5 \pm 0.05^\circ\text{C}$.

Tras realizar un corte longitudinal en el centro del cuello, se fueron separando los distintos planos hasta visualizar la tráquea, que se liberó del tejido adyacente y se canuló. Después, se procedió a canular la arteria femoral izquierda introduciendo en su interior un catéter de polietileno tipo PE 50 (0.5 mm de diámetro interno y 0.8 mm de diámetro externo) que se conectó al transductor de presión correspondiente. Por último, se canuló la vena femoral derecha para la administración de fármacos o del vehículo. Todos los catéteres contenían solución salina fisiológica y el catéter para el registro de presión arterial una solución de heparina sódica (10 UI/ml) en NaCl (0.9%).

Una vez montada la preparación, se dejó estabilizar al animal durante 15-30 minutos, registrándose entonces de los valores control de los parámetros estudiados a los que se asignó el valor de 100%. Posteriormente, se administró por vía intravenosa los productos a estudiar, registrándose sus efectos a los 5, 15 y 30 minutos postadministración.

2.2. HIPOTENSION INDUCIDA POR PAF EN RATA ANESTESIADA.

2.2.1. MONTAJE DE LA PREPARACION.

Se utilizaron ratas Spraguer-Dawley, con un peso medio de 250 ± 13 g. La canulación de la arteria y vena femoral, tráquea, tipos de catéteres, anestesia y procedimiento de registro de la presión arterial fueron similares a los descritos en el apartado anterior.

Tras un período de estabilización se obtuvieron los valores control. Seguidamente se administró, por vía intravenosa, vehículo (PEG-400, 0.1 ml/Kg), PCA-4248 (0.3 y 1 mg/Kg) o Nitrendipino (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Al cabo de 5 minutos, se administró PAF (0.33 ó 0.66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.), evaluando sus efectos sobre la presión arterial al cabo de 1, 3, 5, 15 y 30 minutos (efecto protector).

En la segunda serie de experimentos se administró PAF (0.33 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) y cuando se obtuvo el efecto máximo (aproximadamente al cabo de 3 minutos), se administró el vehículo o PCA-4248 (1 mg/Kg),

registrándose el efecto sobre la presión arterial a los mismos tiempos que en el protocolo anterior (efecto de reversión).

2.3. MODELOS DE SHOCK.

2.3.1. HIPOTENSION INDUCIDA POR INMUNOAGREGADOS DE INMUNOGLOBULINA G (IgG) EN RATA ANESTESIADA.

Los inmunoagregados de Inmunoglobulina G fueron preparados por el equipo del Dr Sánchez-Crespo (Departamento de Fisiología, Universidad de Valladolid) a partir de una fracción de gammaglobulina humana.

Se utilizaron ratas Spraguer-Dawley, con un peso medio de 250 ± 13 g. La canulación de la arteria y vena femoral, tráquea, tipos de catéteres, anestesia y procedimiento experimental para el registro de presión arterial fueron similares a los descritos en el apartado 2.1.1. El protocolo seguido en los ensayos de protección y reversión fue el mismo que el utilizado en el apartado 2.2.1. y los agregados de IgG fueron administrados a la dosis de 9 mg/Kg i.v. y el PCA-4248 a la dosis de 1 mg/Kg.

2.3.2. SHOCK ENDOTOXICO INDUCIDO POR LIPOPOLISACARIDOS DE SALMONELLA TYPHOSA.

Se utilizaron ratas Spraguer-Dawley, con un peso medio de 335 ± 13 g. Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (Parke-Davis, 50 mg/ml)/valium (Roche, 10 mg/ml)/solución salina en proporción 2:0.5:2.5 ml. La canulación de la arteria y vena femoral, tráquea, tipos de catéteres y procedimiento experimental fueron similares a los descritos en el apartado 2.1.1. Tras un período de estabilización (15-20 minutos) se obtuvieron los valores control, a los que se asignó el valor de 100%. Posteriormente se administró solución salina (0.1 ml/Kg, i.v) o endotoxina de *Salmonella typhosa* (0.5 mg/Kg, i.v.). Tras 90 minutos postadministración y cuando la caída de los valores de la presión arterial fue máxima, se administró el vehículo (PEG-400, 0.1 ml/Kg, i.v) o el PCA-4248 (1 mg/Kg, i.v.), registrándose el efecto a los 5, 15, 30, 60, 90, 105 y 120 minutos.

2.3.3. SHOCK INDUCIDO POR ISQUEMIA-REPERFUSION INTESTINAL TRAS OCLUSION DE LA ARTERIA ESPLECNICA (SHOCK SAO).

Se utilizaron ratas Spraguer-Dawley, con un peso medio de 355 ± 15 g. Tras anestesiarse al animal con uretano (2 g/Kg, i.p.), se canuló la tráquea, la arteria y vena femoral (ver 2.1.1.). Posteriormente, se

realizó una laparatomía media y se exteriorizó el paquete intestinal. Seguidamente, se disecaron en la zona más proximal a la aorta la arteria mesentérica superior y el tronco celíaco. Durante este procedimiento, el intestino se mantuvo cubierto por una gasa humedecida con solución salina a 37°C .

Tras un período de estabilización de 30 minutos, se produjo el estado de shock SAO por oclusión de ambas arterias mediante clampaje con dos clips para vasos (0.15-0.20 N) durante 45 minutos. Al cabo de este período, los clips fueron retirados (reperusión) y el intestino introducido en la cavidad abdominal, cerrándose las paredes intestinales. Los animales control (Sham) fueron sometidos a todo el procedimiento quirúrgico, exceptuando la oclusión de las arterias. Las variaciones en los valores de presión arterial fueron normalizados con respecto a los valores control.

Cinco minutos antes de realizar la oclusión de las arterias, se administró por vía intravenosa el vehículo (PEG-400, 0.1 ml/Kg) o el PCA-4248 (1 mg/Kg), registrándose los efectos sobre la presión arterial cada 10 minutos durante los siguientes 240 minutos a la oclusión en los animales supervivientes.

3. FARMACOS UTILIZADOS.

En esta Tesis Doctoral se han utilizado los siguientes fármacos:

- PAF (Sigma, USA).
- Clorhidrato de fentolamina (Ciba Geigy).
- Clorhidrato de DL-isoproterenol (Sigma, USA).
- Clorhidrato de L-noradrenalina (Fluka, UK).
- Clorhidrato de ketamina (Parke-Davis).
- Clorhidrato de DL-propranolol (Sigma, USA).
- Dimetilsulfóxido (Merck, Alemania).
- Etanol (Merck, Alemania).
- Lipopolisacáridos de *Salmonella typhosa* (Sigma, USA).
- Nifedipino, Nitrendipino y PCA-4248 (sintetizado por Dr. C. Sunkel en Laboratorios Alter).
- Pentobarbital sódico (Kirsch Pharma, España).
- Polietilenglicol 400 (Merck, Alemania).
- Uretano (Fluka, UK).
- Valium (Roche, España).

Para los estudios realizados in vitro se prepararon diariamente soluciones madre (10^{-2} M ó 10^{-3} M) en agua destilada desionizada (Isoproterenol, Noradrenalina y Fentolamina) o en dimetilsulfóxido (Nifedipino,

Nitrendipino y PCA-4248), a partir de las cuales se prepararon las restantes concentraciones. Para los ensayos de binding se prepararon diariamente soluciones madre con una concentración de $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ en etanol y, a partir de la solución madre, se obtuvieron las soluciones diluyendo en tampón Tris 50 mM. A las soluciones madre de Isoproterenol y Noradrenalina se añadió ácido ascórbico 10^{-4}M para prevenir su oxidación. El ^{45}Ca (2.0 mCi/ml) y [^3H]Nitrendipino (78 mCi/nmol) se obtuvieron de ICN Biomedicals (California, USA).

Para los estudios realizados in vivo se prepararon diariamente las soluciones en PEG-400 (0.1%).

Dado que Nifedipino, Nitrendipino y PCA-4248 son fotosensibles, los experimentos se llevaron a cabo con iluminación con lámpara de sodio.

4. METODO ESTADISTICO.

En cada serie homogénea de experimentos los resultados se expresaron como media \pm el error estándar de la media (E.E.M.) para un determinado número (n) de experimentos. Para la comparación entre los grupos se utilizó el análisis de varianza. Para la obtención de las diferencias observadas, todos los resultados fueron sometidos al L.S.D. Test (Least Significant Difference), considerando las diferencias significativas cuando el valor de $p < 0.05$. Cuando las varianzas no fueron homogéneas se utilizó el Test de Mann Whitney y para las variables cualitativas la probabilidad exacta de Fisher.

Los cálculos se realizaron con la ayuda de un procesador Fujitsu Senda-16 y con el programa estadístico Tallarida-Murray.

RESULTADOS

1. ESTUDIOS REALIZADOS IN VITRO.

1.1. EFECTOS VASCULARES.

1.1.1. CONTRACCION INDUCIDA EN LA AORTA AISLADA DE CONEJO CON 35 mM DE KCl.

Los valores basales de la contracción de la aorta fueron: 2.47 ± 0.7 g, 2.41 ± 0.6 g, 2.6 ± 0.6 g y 2.5 ± 0.6 g para el grupo control, Nifedipino, PCA-4248 y Nitrendipino, respectivamente. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales de los diferentes grupos de tratamiento.

En aortas de conejo incubadas con 35 mM de KCl el PCA-4248, en un rango de concentraciones comprendido entre 3×10^{-10} M y 3×10^{-6} M, produjo una relajación concentración-dependiente que alcanzó valores estadísticamente significativos a concentraciones $\geq 10^{-6}$ M ($p < 0.01$). Nifedipino (3×10^{-10} M- 3×10^{-7} M) y Nitrendipino, (3×10^{-10} M- 3×10^{-8} M) produjeron una relajación, concentración-dependiente, que alcanzó ya valores significativos a concentraciones de 3×10^{-10} M ($p < 0.05$) y 3×10^{-9} M ($p < 0.01$), respectivamente (Tabla I, Figura 3). Estos resultados indican que, a todas las concentraciones ensayadas, el Nitrendipino fue el compuesto más activo ($p < 0.01$) (Figura 3). Los valores máximos de inhibición de la contracción vascular fueron de $95.5 \pm 1.5\%$ para Nitrendipino (3×10^{-8} M), de $94.2 \pm 0.4\%$ para Nifedipino (3×10^{-7} M) y de $89.9 \pm 1.5\%$ para PCA-4248 (3×10^{-6} M).

El solvente, DMSO a concentraciones de 1 μ g/ml, no produjo ningún efecto significativo sobre la contracción aórtica (Figura 3).

La Cl_{50} (concentración que produce el 50% de relajación), para cada uno de los compuestos, se muestran en la tabla II. Como se observa en dicha tabla, el orden de potencia para este efecto relajante fue: Nitrendipino > Nifedipino >> PCA-4248.

[FARMACO]	PCA-4248	NIFEDIPINO	NITRENDIPINO
3×10^{-10} M	-2.3 ± 0.7	-3.2 ± 1.4	$-13.6 \pm 3.9^*$
10^{-9} M	-1.8 ± 0.7	-5.7 ± 2.0	$-31.6 \pm 4.5^{**}$
3×10^{-9} M	-4.1 ± 0.9	$-17.6 \pm 2.3^{**}$	$-59.7 \pm 3.1^{**}$
10^{-8} M	-2.3 ± 1.0	$-39.6 \pm 1.7^{**}$	$-84.1 \pm 2.4^{**}$
3×10^{-8} M	-	$-67.4 \pm 1.5^{**}$	$-95.5 \pm 1.5^{**}$
10^{-7} M	-4.2 ± 1.2	$-87.5 \pm 1.3^{**}$	-
3×10^{-7} M	-3.5 ± 2.9	$-94.2 \pm 0.4^{**}$	-
10^{-6} M	$-17.5 \pm 2.5^{**}$	-	-
3×10^{-6} M	$-44.7 \pm 3.3^{**}$	-	-
10^{-5} M	$-69.6 \pm 2.4^{**}$	-	-
3×10^{-5} M	$-89.9 \pm 1.5^{**}$	-	-

Tabla 1.- Porcentaje de relajación de la aorta aislada de conejo contraída por 35 mM de KCl producida por PCA-4248, Nifedipino y Nitrendipino.

Media \pm E.E.M. n=8-10

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en comparación al valor basal.

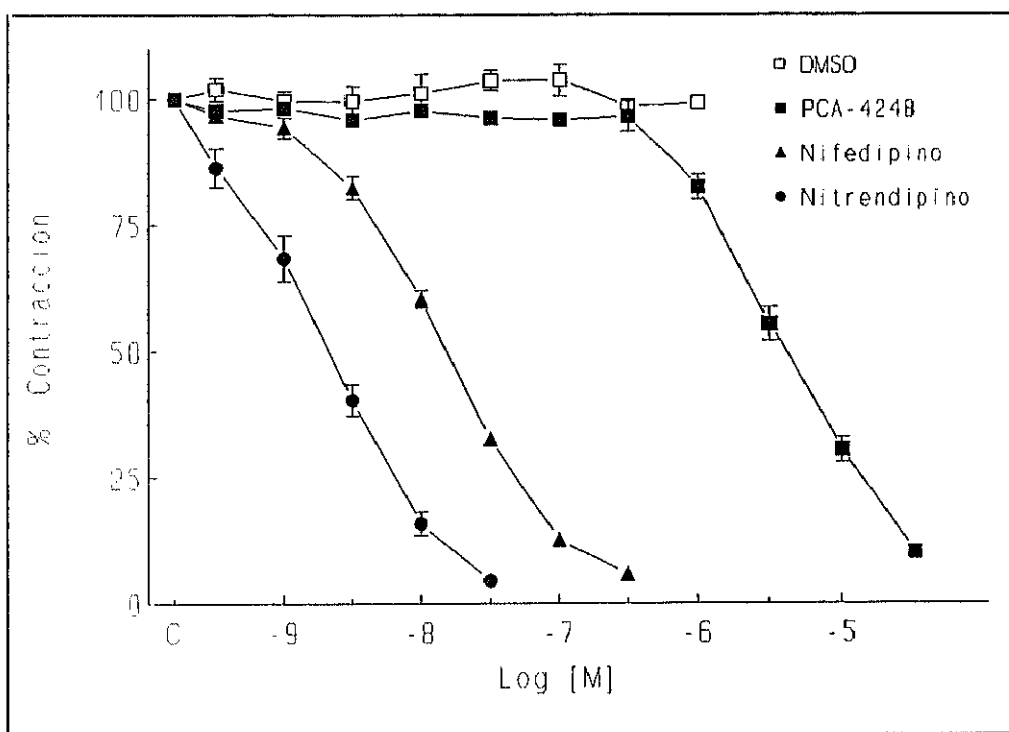


Figura 3.- Efectos de DMSO, PCA-4248, Nifedipino y Nitrendipino sobre la contracción inducida en la aorta aislada de conejo por 35 mM de KCl. En ordenadas se representa el porcentaje de contracción referido al valor control (100%). En abscisas, el logaritmo negativo de la concentración molar del fármaco.

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 8-10$.

	FARMACO		
	PCA-4248	Nifedipino	Nitrendipino
CI ₅₀ M	4.8x10 ⁻⁶ M ± 0.8	1.5x10 ⁻⁸ M ± 1.2	1.9x10 ⁻⁹ M ± 1.1

Tabla II. - Valores de la CI₅₀ de PCA-4248, Nifedipino y Nitrendipino para relajar las contracciones inducidas en la aorta aislada de conejo por 35 mM de KCl.

1.1.2. CONTRACCION INDUCIDA EN LA ARTERIA CORONARIA IZQUIERDA AISLADA DE CERDO CON 35 mM DE KCl.

Los valores basales de contracción de la arteria coronaria fueron: 3.30 ± 0.6 g, 3.21 ± 0.4 g y 3.29 ± 0.9 g en el grupo control, Nifedipino y PCA-4248, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales de cada uno de los grupos de tratamiento.

La incubación de la arteria coronaria aislada descendente anterior izquierda de cerdo con PCA-4248 (10⁻⁹M-10⁻⁶M) produjo una relajación concentración-dependiente y estadísticamente significativa a concentraciones ≥ 3x10⁻⁹M (p < 0.01). El Nifedipino (3x10⁻¹⁰M-10⁻⁷M) también produjo un efecto relajante concentración-dependiente que alcanzó valores estadísticamente significativos a concentraciones ≥ 10⁻⁹M (p < 0.01). Como se observa en la Tabla III y en la Figura 4, el Nifedipino fue más activo que PCA-4248 a todas las concentraciones ensayadas (p < 0.01). Sin embargo, ambos fármacos produjeron una relajación máxima similar (85.3 ± 2.1 vs 88.8 ± 0.8%, p > 0.05).

El DMSO, a concentraciones de 1 µg/ml, no produjo ningún efecto significativo sobre la contracción coronaria (Figura 4).

[FARMACO]	PCA-4248	NIFEDIPINO
3×10^{-10} M	-	-8.1 ± 2.1
10^{-9} M	-9.4 ± 2.3	$-18.6 \pm 2.2^{**}$
3×10^{-9} M	$-15.7 \pm 1.9^{**}$	$-37.8 \pm 2.8^{**}$
10^{-8} M	$-21.7 \pm 2.6^{**}$	$-61.5 \pm 2.6^{**}$
3×10^{-8} M	$-21.3 \pm 1.8^{**}$	$-77.8 \pm 1.6^{**}$
10^{-7} M	$-25.5 \pm 3.1^{**}$	$-88.8 \pm 0.8^{**}$
3×10^{-7} M	$-28.1 \pm 2.8^{**}$	-
10^{-6} M	$-47.0 \pm 2.7^{**}$	-
3×10^{-6} M	$-69.8 \pm 2.8^{**}$	-
10^{-5} M	$-85.3 \pm 2.1^{**}$	-

Tabla III.- Porcentaje de relajación de la arteria coronaria aislada de cerdo contraída por 35 mM de KCl producido por PCA-4248 y Nifedipino.

Media \pm E.E.M. n = 8-10.

** $p < 0.01$ en comparación al valor basal.

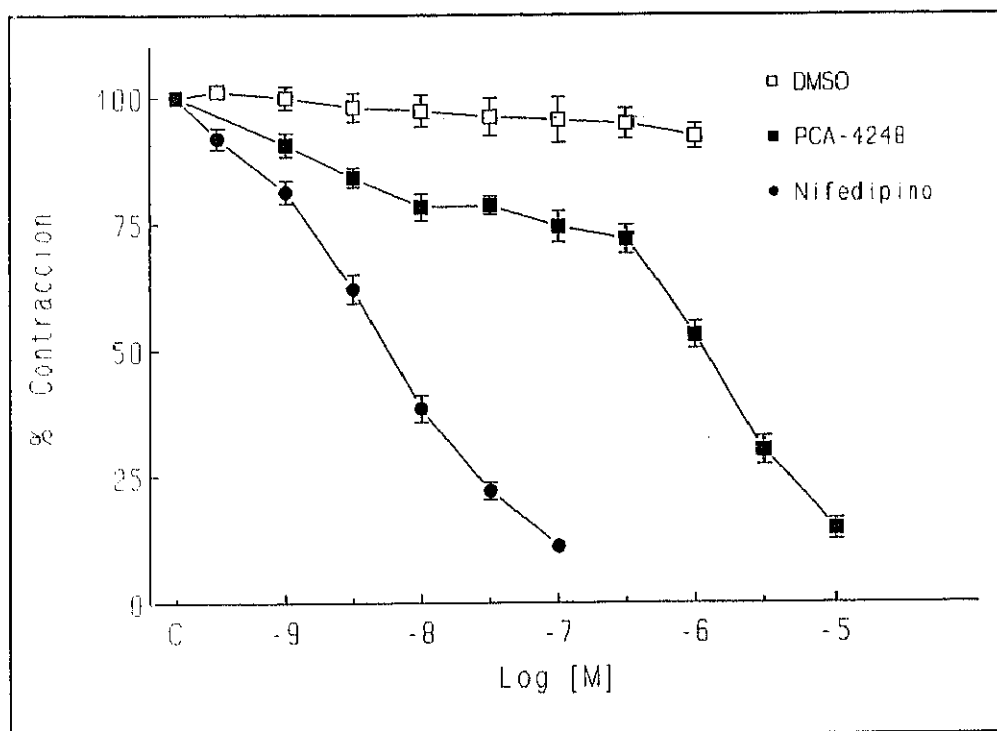


Figura 4.- Efectos de DMSO, PCA-4248 y Nifedipino sobre la contracción inducida en la arteria coronaria izquierda aislada de cerdo por 35 mM de KCl. En ordenadas se representa el porcentaje de contracción referido al valor control (100%). En abscisas, el logaritmo negativo de la concentración molar del fármaco.

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 8-10$.

Si se compara el efecto relajante del PCA-4248 sobre ambas arterias (aorta y coronaria) se observa que este compuesto, a todas las concentraciones ensayadas, produjo una mayor relajación coronaria versus aórtica, siendo esta diferencia estadísticamente significativa a partir de 10^{-9} M ($p < 0.01$) (Figura 5). La misma selectividad se observa con el Nifedipino (Figura 6).

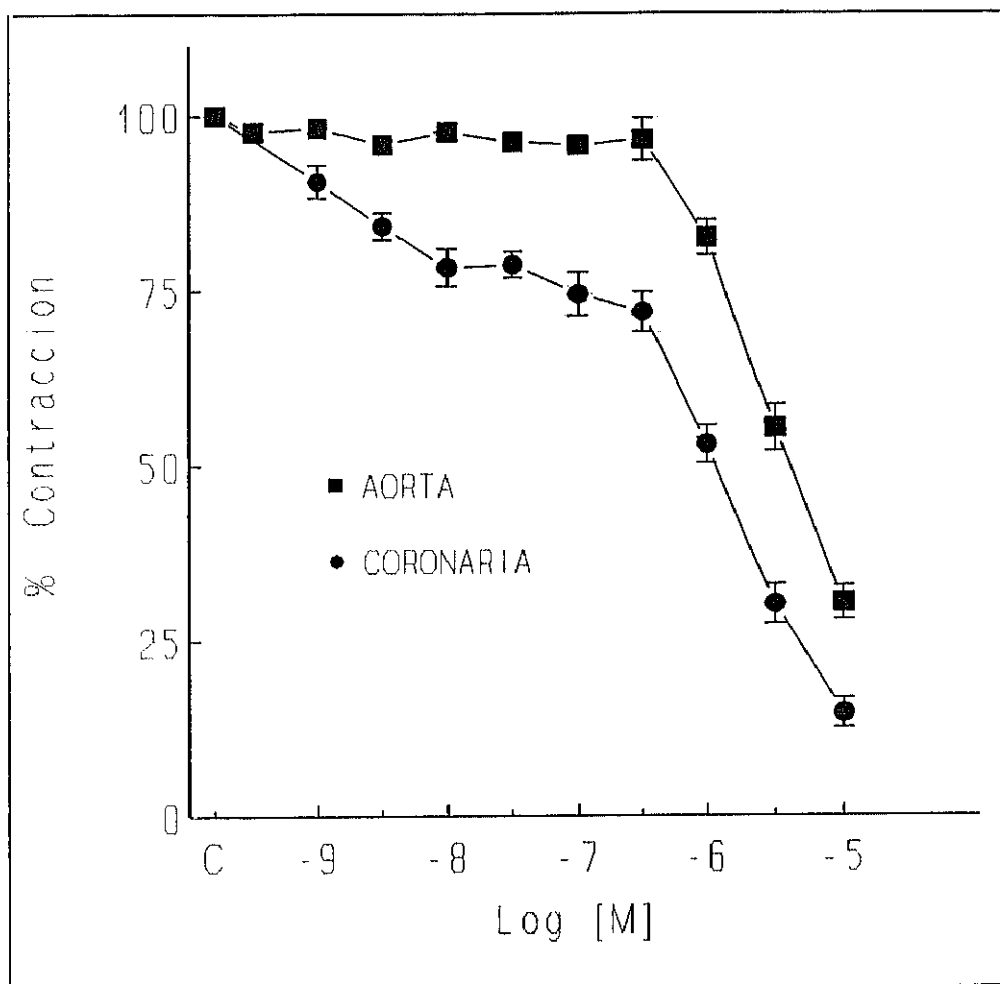


Figura 5.- Comparación de efectos del PCA-4248 sobre la contracción inducida por 35 mM de KCl en la aorta de conejo y en la arteria coronaria de cerdo. En ordenadas se representa el porcentaje de contracción referido al valor control (100%). En abscisas, el logaritmo negativo de la concentración molar del fármaco.

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 8-10$.

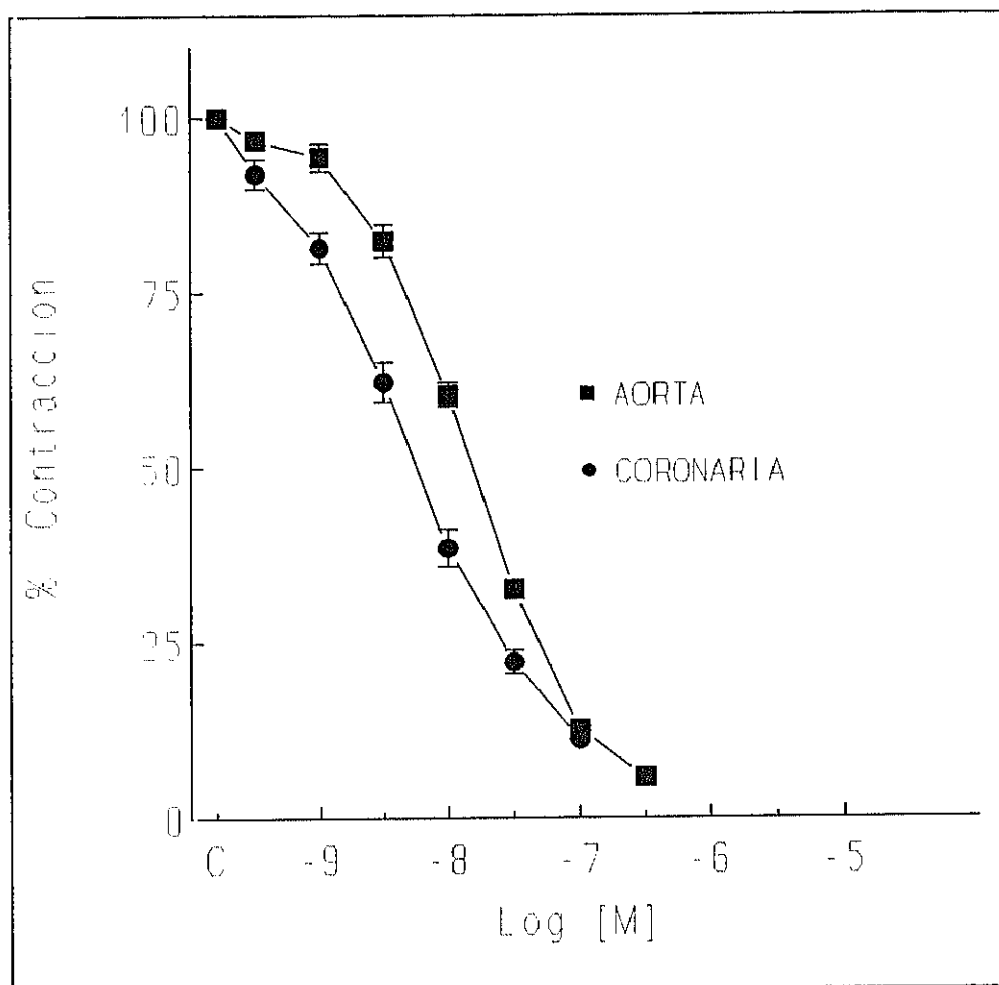


Figura 6.- Comparación de los efectos del Nifedipino sobre la contracción inducida por 35 mM de KCl en la aorta de conejo y en la arteria coronaria de cerdo. En ordenadas se representa el porcentaje de contracción referido al valor control (100%). En abscisas, el logaritmo negativo de la concentración molar del fármaco.

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 8-10$.

1.2. EFECTOS CARDIACOS.

1.2.1. EFECTOS INOTROPICOS Y CRONOTROPICOS EN LA AURICULA AISLADA DE COBAYA.

Los valores basales de contracción auricular y frecuencia sinusal se representan en la Tabla IV. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales de cada grupo de tratamiento.

	AURICULA IZDA/g	AURICULA DCHA/g	AURICULA DCHA/(l.p.m.)
SOLVENTE	1.26 ± 0.2	0.84 ± 0.2	194 ± 4.1
PCA-4248	1.30 ± 0.3	0.84 ± 0.2	192 ± 5.1
NITRENDIPINO	1.20 ± 0.4	0.80 ± 0.3	198 ± 3.9

Tabla IV.- Valores basales de contracción auricular y frecuencia sinusal para cada grupo de tratamiento Media ± E.E.M. n = 10-12. l.p.m. = latidos por minuto.

Los efectos de PCA-4248 y Nitrendipino sobre la fuerza contráctil auricular se representan en las Tablas V y VI. En aurículas izquierdas estimuladas eléctricamente a la frecuencia basal de 3 Hz, el PCA-4248 (10^{-10} M- 10^{-5} M) produjo una disminución de la fuerza contráctil, concentración-dependiente y estadísticamente significativa a partir de 10^{-9} M ($p < 0.05$). Nitrendipino, a las mismas concentraciones, produjo una disminución de la fuerza contráctil, concentración-dependiente y estadísticamente significativa a partir de 10^{-10} M ($p < 0.01$) (Tabla V), siendo más activo que el PCA-4248 a partir de 10^{-7} M ($p < 0.05$). El solvente, DMSO, a la concentración de $1 \mu\text{g/ml}$, no produjo ningún efecto sobre el inotropismo auricular izquierdo.

En aurícula derecha el PCA-4248, a las concentraciones anteriormente indicadas, produjo un efecto inotrópico negativo dependiente de la concentración y estadísticamente significativo a partir de 10^{-9} M ($p < 0.01$). Nitrendipino, a las mismas concentraciones, produjo un efecto inotrópico negativo más acusado, concentración-dependiente y estadísticamente significativo a partir de 10^{-10} M ($p < 0.01$) (Tabla VI). Las diferencias entre Nitrendipino y PCA-4248 fueron significativas a concentraciones $\geq 10^{-9}$ M ($p < 0.01$) (Tabla VI).

[FARMACO]	SOLVENTE	PCA-4248	NITRENDIPINO
10 ⁻¹⁰ M	98.7 ± 0.8	95.5 ± 0.7	92.8 ± 1.5**
10 ⁻⁹ M	97.3 ± 0.9	92.3 ± 1.3*	89.9 ± 1.5**
10 ⁻⁸ M	95.5 ± 1.6	88.9 ± 1.6**	87.4 ± 1.7**
10 ⁻⁷ M	94.7 ± 1.2	85.6 ± 1.6**	79.6 ± 1.2** +
10 ⁻⁶ M	92.0 ± 1.5	75.3 ± 2.1**	54.0 ± 1.32** ++
10 ⁻⁵ M	90.3 ± 1.9	50.0 ± 3.6**	26.9 ± 1.6** ++

Tabla V.- Efectos de DMSO, PCA-4248 y Nitrendipino sobre la fuerza contráctil registrada en aurículas izquierdas de cobaya estimuladas a la frecuencia basal de 3 Hz. Los valores se expresan como porcentaje de cambio con respecto al basal.

Media ± E.E.M. n = 10-12.

* p < 0.05, ** p < 0.01 en relación al valor basal.

+ p < 0.05, ++ p < 0.01 en relación al valor obtenido con el PCA-4248.

[FARMACO]	SOLVENTE	PCA-4248	NITRENDIPINO
10^{-10} M	101.1 ± 0.8	97.1 ± 1.9	92.8 ± 1.3**
10^{-9} M	104.1 ± 1.1	95.5 ± 2.3**	89.8 ± 2.4** +
10^{-8} M	104.5 ± 1.0	92.3 ± 2.1**	86.4 ± 3.5** +
10^{-7} M	101.8 ± 0.3	89.2 ± 2.4*	74.3 ± 5.7** + +
10^{-6} M	98.9 ± 0.8	76.0 ± 3.3**	55.5 ± 11.2** + +
10^{-5} M	96.1 ± 1.2	46.6 ± 6.5**	-

Tabla VI.- Efectos de DMSO, PCA-4248 y Nitrendipino sobre la fuerza contráctil registrada en aurículas derechas aisladas de cobaya. Los valores se expresan como porcentaje de cambio con respecto al basal.

Media ± E.E.M. n = 8-10.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en relación al valor basal.

+ $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ en relación al valor obtenido con el PCA-4248.

Los efectos cronotrópicos negativos producidos en la aurícula derecha aislada por PCA-4248 y Nitrendipino se muestran en la Tabla VII. El PCA-4248, incluso a la concentración de 10^{-5} M, produjo una ligera disminución no significativa de la frecuencia sinusal. Sin embargo, el Nitrendipino ya a las dosis de 10^{-7} M y 10^{-6} M, produjo una disminución estadísticamente significativa de la frecuencia sinusal ($p < 0.01$). A los 5 minutos de incubar la aurícula con 10^{-6} M, el Nitrendipino produjo bloqueos sinusales en el 50% de los experimentos. El solvente, DMSO no produjo ningún cambio apreciable sobre la frecuencia cardíaca.

[FARMACO]	SOLVENTE	PCA-4248	NITRENDIPINO
10^{-10} M	98.8 ± 1.2	99.3 ± 0.3	99.3 ± 0.8
10^{-9} M	96.4 ± 1.4	98.8 ± 0.9	99.2 ± 1.4
10^{-8} M	97.5 ± 1.5	98.4 ± 1.2	97.3 ± 1.8
10^{-7} M	93.9 ± 1.8	98.6 ± 1.2	$83.5 \pm 4.6^{*} + +$
10^{-6} M	93.9 ± 1.8	96.7 ± 4.4	$67.8 \pm 9.0^{**} + +$
10^{-5} M	93.9 ± 1.8	87.9 ± 12.1	-

Tabla VII.- Efectos de DMSO, PCA-4248 y Nitrendipino sobre la frecuencia sinusal en aurículas derechas aisladas de cobaya. Los datos representan el porcentaje de cambio en relación al valor basal.

Media \pm E.E.M. n = 8-10.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en relación al valor basal.

+ + $p < 0.01$ en relación al valor obtenido con el PCA-4248.

1.2.2. EFECTOS SOBRE LA CAPTACION DE ^{45}Ca EN AURICULAS AISLADAS DE COBAYA.

Los efectos del PCA-4248, 10^{-7}M , sobre la captación de ^{45}Ca en aurículas aisladas estimuladas a las frecuencias basales de 1 y 3 Hz e incubadas en solución de Tyrode que contenía 1.8 ó 3.6 mM de CaCl_2 se representan en la Tabla VIII. Puede observarse que la captación basal de ^{45}Ca aumentó al incrementar la concentración de Ca^{2+} extracelular de 1.8 mM a 3.6 mM ($p < 0.05$). Para cualquier concentración de Ca^{2+} extracelular, la captación de ^{45}Ca dependía de la frecuencia de estimulación, siendo mayor cuando la frecuencia de estimulación aumentó a 3 Hz (desde 1050.9 ± 79.3 hasta 1484.6 ± 146.4 nmol Ca/g aurícula en 1.8 mM de CaCl_2 , $p < 0.01$; desde 1671.1 ± 224.4 hasta 2247.0 ± 218.5 nmol Ca/g aurícula a 3 Hz, $p < 0.05$). El PCA-4248 (10^{-7}M) no modificó la captación de ^{45}Ca en hemiaurículas estimuladas a 1 Hz a ninguna de las concentraciones de Ca^{2+} estudiadas. Sin embargo, en hemiaurículas estimuladas a la frecuencia de 3 Hz, el PCA-4248 redujo significativamente la captación de ^{45}Ca , tanto aurículas incubadas en un medio con 1.8 mM (desde 1484.6 ± 146.4 a 1187.3 ± 100.9 nmol Ca/g aurícula, $p < 0.05$) como en 3.6 mM de Ca (desde 2247.0 ± 218.5 a 1618.0 ± 112.7 nmol Ca/g, $p < 0.05$). Estos

resultados sugieren que la inhibición de la entrada de ^{45}Ca producida por el PCA-4248 depende de la frecuencia de estimulación.

	1.8 mM Ca^{2+}		3.6 mM Ca^{2+}	
	1 Hz	3 Hz	1 Hz	3 Hz
CONTROL	1050.9 ± 79.3	1484.6 ± 146.4*	1671.1 ± 224.4	2247.0 ± 218.5*
PCA-4248	1062.9 ± 116.8	1187.3 ± 100.9+	1682.7 ± 226.1	1618.0 ± 112.7+

Tabla VIII.- Efectos del PCA-4248, 10^{-7}M , sobre la captación de ^{45}Ca en aurículas aisladas de cobaya estimuladas a 1 ó 3 Hz e incubadas en Tyrode normal (1.8 mM Ca^{2+}) o que contiene 3.6 mM Ca^{2+} . Media ± E.E.M. n = 8.

* $p < 0.05$ en relación a los valores obtenidos a 1 Hz.

+ $p < 0.05$ en relación a los valores obtenidos a 3 Hz.

1.2.3. EFECTOS ELECTROMECAÑICOS EN EL CORAZON AISLADO Y PERFUNDIDO DE RATA.

Los valores basales de contracción ventricular fueron $1,26 \pm 0.2$ g para el grupo solvente; 1.38 ± 0.2 g para el grupo tratado con PCA-4248 y 1.32 ± 0.3 g para el grupo tratado con Nitrendipino, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre dichos valores basales para cada uno de los grupos de tratamiento.

La perfusión del corazón aislado de rata con PCA-4248 produjo una disminución de la fuerza contráctil dependiente de la concentración y del tiempo (Figura 7). A 10^{-8}M , el PCA-4248 no produjo cambios significativos sobre la fuerza contráctil (Figura 7); sin embargo, a concentraciones de 10^{-7}M y 10^{-6}M , produjo un efecto inotrópico negativo que ya fue estadísticamente significativo tras 15 minutos de perfusión ($p < 0.05$) y que alcanzó su efecto máximo al cabo de 30 minutos ($p < 0.01$).

Nitrendipino, 10^{-8}M - 10^{-6}M , produjo una mayor reducción de la fuerza contráctil ventricular, que alcanzó valores estadísticamente significativos a partir de 10^{-8}M ($p < 0.05$), siendo este compuesto más activo que el PCA-4248 a todas las concentraciones ensayadas (Figura 7). Al igual que el PCA-4248, el efecto máximo del Nitrendipino se registró tras 30 minutos de perfusión (Figura 7).

La perfusión del corazón aislado con DMSO (solvente) a concentraciones de 100 μ l/l produjo un ligero efecto inotrópico negativo a los 30 minutos de perfusión, que no fue estadísticamente significativo (Figura 7).

Las curvas concentración-respuesta del PCA-4248 y Nitrendipino, después de 30 minutos de perfusión (efecto máximo), se muestran en la Figura 8. El efecto inotrópico negativo de Nitrendipino fue mucho más acusado que el obtenido con el PCA-4248, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas, entre ambas curvas, a partir de 10^{-7} M ($p < 0.01$) (Figura 8).

La Tabla IX muestra el efecto máximo observado después de 30 minutos de perfusión con PCA-4248 y Nitrendipino sobre la conducción intraauricular (intervalo St-A), intraventricular (intervalos H-Q y Q-V) y a través del nodo aurículo-ventricular (intervalo A-H) en corazones aislados y perfundidos de rata. PCA-4248, a concentraciones de 10^{-8} M, 10^{-7} M y 10^{-6} M, y DMSO (100 μ l/l) no produjeron ningún cambio significativo de la conducción intracardíaca. El Nitrendipino no modificó los intervalos St-A, H-Q y Q-V, pero produjo un alargamiento del intervalo A-H, concentración-dependiente y estadísticamente significativo a las concentraciones de 10^{-7} M y 10^{-6} M ($p < 0.01$).

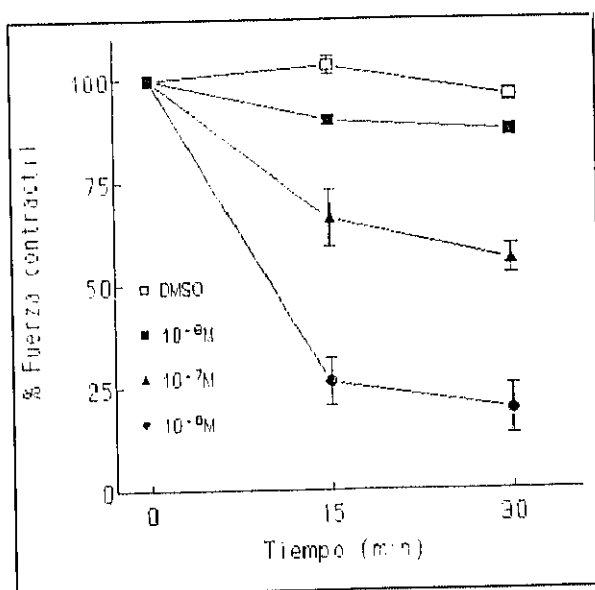
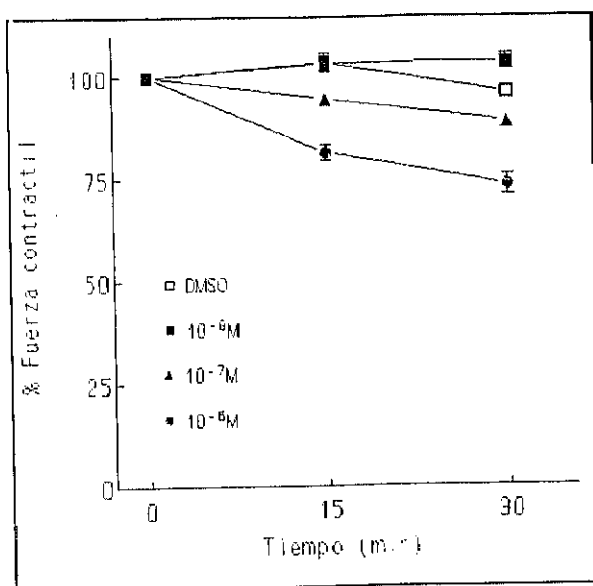


Figura 7.- Efectos de DMSO, PCA-4248 (panel superior) y Nitrendipino (panel inferior) sobre la fuerza contráctil en corazones aislados y perfundidos de rata. En ordenadas se representan los cambios de la fuerza contráctil expresados como porcentaje de cambio con respecto al valor control (100%). En abscisas, el tiempo (minutos). Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

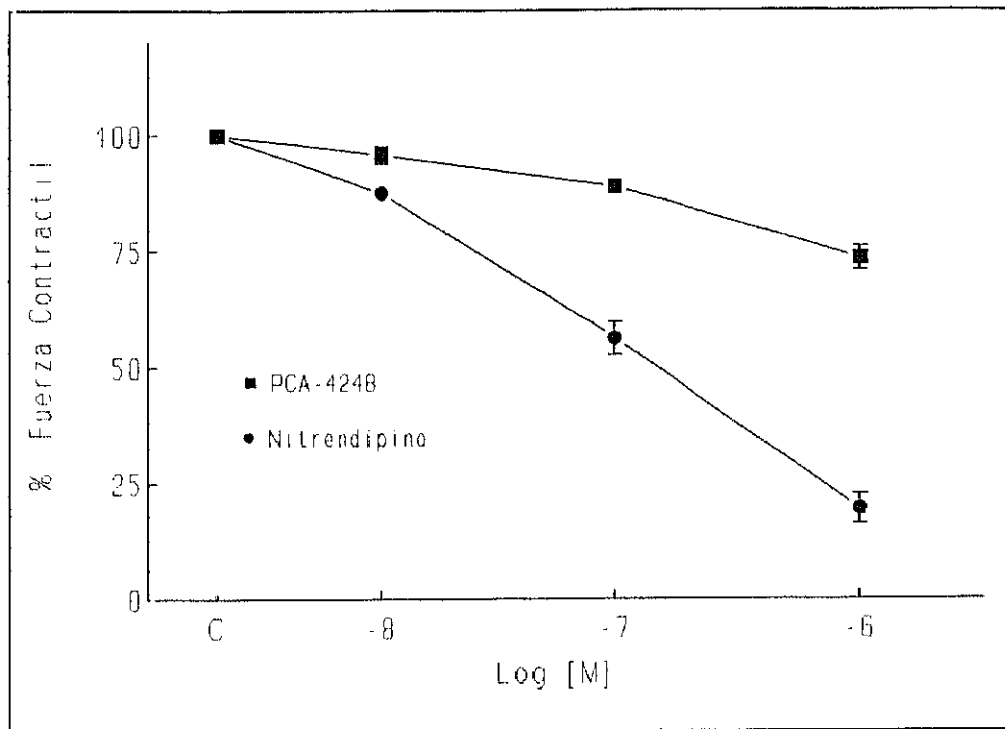


Figura 8.- Relación concentración-respuesta de PCA-4248 y Nitrendipino sobre la fuerza cardíaca tras 30 minutos de perfusión (efecto máximo). En ordenadas se representa el porcentaje de contracción referido al valor control (100%). En abscisas, el logaritmo negativo de la concentración molar del fármaco.

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

[FARMACO]	St-A (ms)	A-H (ms)	H-Q (ms)	Q-V (ms)
SOLVENTE	5.7 ± 0.5	27.8 ± 0.4	11.4 ± 0.7	6.2 ± 0.8
NITRENDIPINO 10 ⁻⁸ M	5.6 ± 1.2	28.4 ± 0.3	11.6 ± 0.2	5.7 ± 0.2
NITRENDIPINO 10 ⁻⁷ M	5.5 ± 0.2	31.7 ± 0.3*	11.7 ± 0.2	5.4 ± 0.1
NITRENDIPINO 10 ⁻⁶ M	5.8 ± 0.1	35.5 ± 0.6*	12.7 ± 0.2	6.6 ± 0.2
PCA-4248 10 ⁻⁸ M	5.8 ± 0.1	28.1 ± 0.2	11.8 ± 0.2	6.1 ± 0.1
PCA-4248 10 ⁻⁷ M	6.1 ± 0.2	27.8 ± 0.2	11.9 ± 0.2	6.3 ± 0.2
PCA-4248 10 ⁻⁶ M	6.0 ± 0.2	28.0 ± 0.2	11.6 ± 0.2	5.8 ± 0.2

Tabla IX.- Efectos del Solvente, PCA-4248 y Nitrendipino sobre la conducción intracardíaca en corazones aislados y perfundidos de rata después de 30 minutos de perfusión (efecto máximo).

Media ± E.E.M. n = 6.

* $p < 0.01$ en relación al valor obtenido con el Solvente y PCA-4248.

1.2.4. EFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS DEL PCA-4248 EN MUSCULOS AURICULARES Y VENTRICULARES DE COBAYA.

1.2.4.1. Potenciales de acción auriculares.

Los efectos de PCA-4248 sobre los potenciales de acción registrados en fibras musculares auriculares de cobaya, estimuladas a la frecuencia basal de 1 Hz se representan en las Tablas X y XI.

El PCA-4248, a concentraciones entre 10^{-8} M- 10^{-5} M, no modificó las características de la fase 0 del potencial de acción auricular (amplitud-APA, V_{max}) ni el potencial de reposo (PR), lo que indica que el PCA-4248 no inhibió, respectivamente, ni la corriente rápida de entrada de Na (I_{Na}) ni la corriente tiempo-independiente de salida de K (I_{K1}). Así mismo, el PCA-4248 tampoco modificó la duración del potencial de acción medida tanto al 50% (DPA_{50}) como al 90% de repolarización, (DPA_{90}) (Tabla X). Tampoco se observaron diferencias en la duración del período refractario efectivo (PRE) o en el cociente PRE/DPA (Tabla XI).

[PCA4248]	PR(mV)	APA(mV)	V_{max} (V/s)	DPA_{50} (ms)	DPA_{90} (ms)
0	78.4 ± 1.3	115.4 ± 1.3	240.5 ± 1.3	46.5 ± 3.2	102.5 ± 4.8
10^{-8} M	80.3 ± 1.0	115.5 ± 1.2	238.7 ± 7.2	48.7 ± 1.6	105.6 ± 7.2
10^{-7} M	81.2 ± 0.6	115.2 ± 1.3	233.5 ± 9.5	48.0 ± 3.3	99.5 ± 7.5
10^{-6} M	78.8 ± 2.0	115.4 ± 1.3	233.5 ± 9.7	48.5 ± 3.5	101.5 ± 6.8
10^{-5} M	77.0 ± 1.8	115.6 ± 1.5	231.5 ± 9.5	48.0 ± 2.1	104.0 ± 4.7

Tabla X.- Efectos electrofisiológicos del PCA-4248 en fibras musculares auriculares de cobaya estimuladas a la frecuencia basal de 1 Hz.

Media ± E.E.M. n = 12.

[PCA-4248]	PRE (ms)	PRE/DPA
0	105.6 ± 3.9	1.02 ± 0.02
10 ⁻⁸ M	108.1 ± 4.2	1.02 ± 0.02
10 ⁻⁷ M	102.4 ± 4.3	1.03 ± 0.01
10 ⁻⁶ M	107.9 ± 4.1	1.03 ± 0.02
10 ⁻⁵ M	109.7 ± 3.9	1.04 ± 0.03

Tabla XI.- Efectos del PCA-4248 sobre el período refractario efectivo (PRE) y el cociente PRE/DPA en fibras musculares auriculares de cobaya estimuladas a la frecuencia basal de 1 Hz.

Media ± E.E.M. n = 12.

1.2.4.2. Potenciales de acción ventriculares.

Los efectos del PCA-4248 sobre los potenciales de acción registrados en los músculos papilares de cobaya estimulados a la frecuencia basal de 1 Hz se representan en las Tablas XII y XIII.

Al igual que en los potenciales de acción auriculares el PCA-4248, a concentraciones entre 10⁻⁸M y 10⁻⁵M, no modificó ninguno de los parámetros que definen las características del potencial de acción ventricular, aunque produjo un ligero aumento, no significativo, en la DPA medida al 50% y 90% de repolarización (Tabla XII). Los cambios en la DPA fueron acompañados de cambios similares en la duración del período refractario efectivo ventricular (PRE), por lo que el PCA-4248 no modificó tampoco el cociente PRE/DPA (Tabla XIII). Tampoco se observaron cambios significativos en la duración del tiempo de recuperación (TR) de la velocidad máxima de despolarización (V_{max}).

[PCA4248]	PR(mV)	APA(mV)	V_{max} (V/s)	DPA ₅₀ (ms)	DPA ₉₀ (ms)
0	81.8 ± 1.1	120.8 ± 0.9	211.2 ± 5.5	149.6 ± 4.8	179.6 ± 6.2
10 ⁻⁸ M	81.4 ± 1.0	119.5 ± 0.3	213.0 ± 4.9	158.0 ± 9.2	188.0 ± 9.4
10 ⁻⁷ M	82.1 ± 1.2	120.6 ± 0.7	211.6 ± 5.2	166.0 ± 9.0	194.1 ± 9.8
10 ⁻⁶ M	82.2 ± 1.2	120.3 ± 0.9	214.2 ± 4.1	165.4 ± 9.2	195.4 ± 9.1
10 ⁻⁵ M	83.6 ± 1.0	121.1 ± 1.1	216.6 ± 4.5	152.5 ± 7.7	185.4 ± 6.4

Tabla XII.- Efectos electrofisiológicos del PCA-4248 en fibras musculares ventriculares de cobaya estimuladas a la frecuencia basal de 1 Hz. Media ± E.E.M. n= 12.

[PCA-4248]	PRE (ms)	PRE/DPA	TR (ms)
0	185.4 ± 8.2	1.02 ± 0.02	237.6 ± 14.2
10 ⁻⁸ M	194.5 ± 5.9	1.03 ± 0.02	247.7 ± 12.1
10 ⁻⁷ M	198.7 ± 10.9	1.03 ± 0.03	253.2 ± 10.3
10 ⁻⁶ M	203.2 ± 10.6	1.04 ± 0.02	258.0 ± 13.6
10 ⁻⁵ M	194.5 ± 6.7	1.05 ± 0.01	250.8 ± 12.3

Tabla XIII.- Efectos del PCA-4248 sobre el período refractario efectivo (PRE) ventricular, el cociente PRE/DPA y el tiempo de recuperación (TR) en fibras musculares ventriculares de cobaya estimuladas a la frecuencia basal de 1 Hz. Media ± E.E.M. n= 12.

1.2.4.3. Efectos del PAF sobre los potenciales de acción ventriculares: Interacción con PCA-4248.

En fibras musculares ventriculares de cobaya, el PAF produce un marcado acortamiento de la DPA (Tamargo y cols, 1985). Con el fin de comprobar si el PCA-4248 era capaz de antagonizar el acortamiento de la DPA ventricular producida por el PAF, se realizaron una serie de experimentos en músculos papilares de cobaya estimulados a la frecuencia basal de 1 Hz e incubados con PAF (10^{-10} M), en ausencia y en presencia de PCA-4248 (10^{-8} M, 10^{-7} M y 10^{-6} M).

El PAF, a la concentración ensayada, no modificó las características de la fase 0 del potencial de acción ventricular (amplitud-APA, V_{max}) ni el potencial de reposo (PR), pero acortó de forma significativa ($p < 0.05$) la duración del potencial de acción medido tanto al 50% como al 90% de repolarización (Tabla XIV). En estas condiciones, el PCA-4248 no modificó, de forma significativa, la amplitud o la V_{max} del potencial de acción ni el potencial de reposo; sin embargo, bloqueó el acortamiento de la DPA producido por el PAF.

[FARMACO]	PR(mV)	APA(mV)	V_{max} (V/s)	DPA ₅₀ (ms)	DPA ₉₀ (ms)
0	80.7 ± 1.2	119.5 ± 0.9	204.7 ± 9.5	152.8 ± 9.4	185.0 ± 9.0
PAF 10 ⁻¹⁰ M	81.4 ± 1.1	119.2 ± 0.8	203.2 ± 9.4	125.0 ± 9.5 *	147.5 ± 9.7 *
PAF + PCA-4248					
10 ⁻⁸ M	82.3 ± 1.7	119.6 ± 1.1	209.5 ± 9.3	151.8 ± 9.6	182.1 ± 9.7
10 ⁻⁷ M	82.0 ± 1.7	118.7 ± 1.1	214.0 ± 9.0	141.8 ± 9.7	174.7 ± 9.0
10 ⁻⁶ M	81.7 ± 1.9	120.2 ± 0.8	208.0 ± 9.3	145.8 ± 9.0	177.5 ± 9.6

Tabla XIV.- Efectos electrofisiológicos del PAF en ausencia y en presencia de PCA-4248 en fibras musculares ventriculares de cobaya estimuladas a la frecuencia basal de 1 Hz.

Media ± E.E.M. n = 12. * $p < 0.05$ en relación al valor basal.

1.2.4.4. Potenciales de acción lentos (Ca-dependientes) en músculos papilares de cobaya.

Para comprobar el efecto del PCA-4248 sobre la corriente lenta de entrada de Ca^{2+} (I_{Ca}) a través de los canales de tipo L de la membrana de células cardíacas, analizamos sus efectos en músculos papilares perfundidos con Tyrode con 27 mM de KCl y estimulados a la frecuencia basal de 0.12 Hz en los que se indujo la aparición de potenciales de acción lentos, Ca^{2+} -dependientes, adicionando al líquido de perfusión Isoproterenol (10^{-6}M).

Los resultados obtenidos en la Tabla XV muestran que el PCA-4248, a concentraciones entre 10^{-9}M y 10^{-5}M , no fue capaz de inducir la aparición de potenciales de acción lentos y, además, no modificó a ninguna de las concentraciones ensayadas los parámetros que definen las características de los potenciales de acción lentos cardíacos, lo que indica que este compuesto carece de propiedades bloqueantes de los canales de Ca^{2+} .

[PCA4248]	PR(mV)	APA(mV)	V_{max} (V/s)	DPA ₅₀ (ms)	DPA ₉₀ (ms)
0	43.8 ± 1.7	83.8 ± 1.7	15.5 ± 0.7	232.5 ± 9.9	262.0 ± 9.1
10^{-8}M	45.0 ± 3.1	83.0 ± 1.7	16.3 ± 1.4	246.2 ± 9.1	264.3 ± 9.8
10^{-7}M	42.0 ± 0.8	83.2 ± 1.6	15.5 ± 1.3	242.0 ± 9.3	265.5 ± 9.3
10^{-6}M	43.0 ± 1.9	82.2 ± 1.3	15.4 ± 1.5	241.5 ± 9.8	261.0 ± 9.8
10^{-5}M	43.0 ± 1.6	83.4 ± 2.3	16.4 ± 1.9	226.5 ± 9.1	246.5 ± 9.4

Tabla XV.- Efectos electrofisiológicos del PCA-4248 sobre los potenciales de acción lentos inducidos por el Isoproterenol (10^{-6}M) en fibras musculares ventriculares de cobaya perfundidas con Tyrode con 27 mM de KCl estimuladas a la frecuencia basal de 0.12 Hz.

Media ± E.E.M. n = 12.

1.3. ACTIVIDAD SOBRE OTROS RECEPTORES.

1.3.1. ACTIVIDAD SOBRE EL RECEPTOR α -ADRENERGICO.

Los valores basales de la contracción de la aorta, inducida por NA, fueron: 4.36 ± 0.5 g y 4.48 ± 0.3 g para el grupo del PCA-4248 y Fentolamina, respectivamente. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales de los diferentes grupos de tratamiento.

PCA-4248, a concentraciones comprendidas entre 10^{-8} M y 10^{-6} M, no modificó las contracciones inducidas por la Noradrenalina (10^{-7} M) en la aorta de conejo, pero a la concentración de 10^{-5} M inhibió la contracción aórtica en un 15.1% (Figura 9). Ello indica que el PCA-4248 no exhibe propiedades bloqueantes α -adrenérgicas.

Fentolamina, a concentraciones entre 10^{-8} M y 10^{-6} M, produjo una inhibición de la contracción aórtica que alcanzó valores estadísticamente significativos a concentraciones superiores a 3×10^{-8} M ($p < 0.01$)(Figura 9).

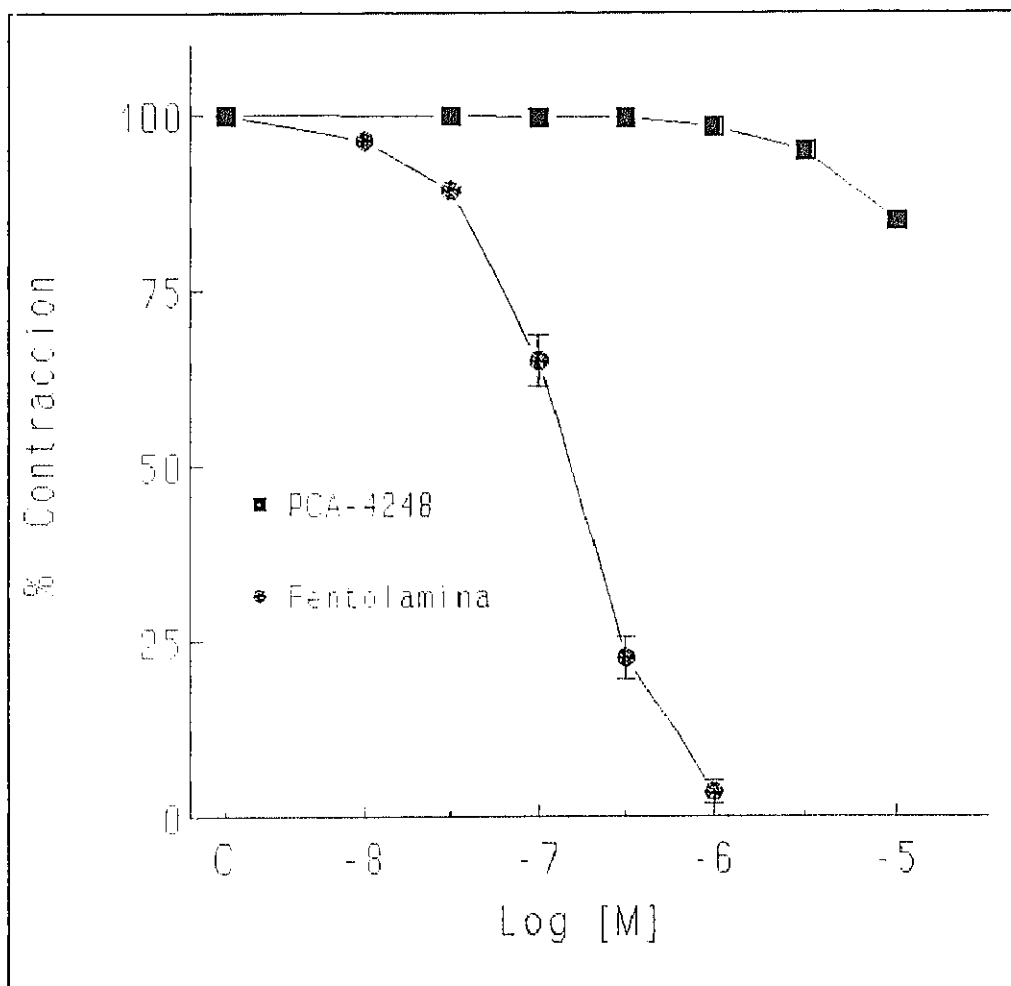


Figura 9.- Efecto relajante de PCA-4248 y Fentolamina sobre las contracciones inducidas por la Noradrenalina en la aorta aislada de conejo. En ordenadas se representa el porcentaje de contracción referido al valor basal (100%). En abscisas, el logaritmo negativo de la concentración molar del fármaco.

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

1.3.2. ACTIVIDAD SOBRE EL RECEPTOR β -ADRENERGICO.

Con el fin de comprobar si el efecto inotrópico negativo del PCA-4248 es debido a su capacidad antagonista del receptor β -adrenérgico cardíaco, se realizaron curvas concentración-respuesta al Isoproterenol (10^{-11} M- 10^{-5} M) en ausencia y en presencia de PCA-4248 (10^{-7} M y 10^{-6} M) y Propranolol (10^{-8} M, 10^{-7} M y 10^{-6} M) (Figura 10).

Como se observa en la Figura 10, el Propranolol produjo un desplazamiento concentración-dependiente a la derecha de la curva del Isoproterenol, como es de esperar para un antagonista competitivo del receptor β -adrenérgico. Por el contrario, el PCA-4248 no modificó la curva del Isoproterenol a ninguna de las concentraciones ensayadas, por lo que este compuesto carece de efectos antagonistas del receptor β -adrenérgico cardíaco.

En la Tabla XVI se muestran los valores basales de la contracción auricular para cada grupo de tratamiento.

	AURICULA IZQUIERDA Contracción (g)
SOLVENTE	1.27 \pm 0.2
PCA-4248	
10^{-7} M	1.30 \pm 0.3
10^{-6} M	1.29 \pm 0.2
PROPRANOLOL	
10^{-8} M	1.20 \pm 0.4
10^{-7} M	1.25 \pm 0.3
10^{-6} M	1.28 \pm 0.2

Tabla XVI.- Valores basales de contracción auricular y frecuencia sinusal para cada grupo de tratamiento Media \pm E.E.M. n = 10-12.

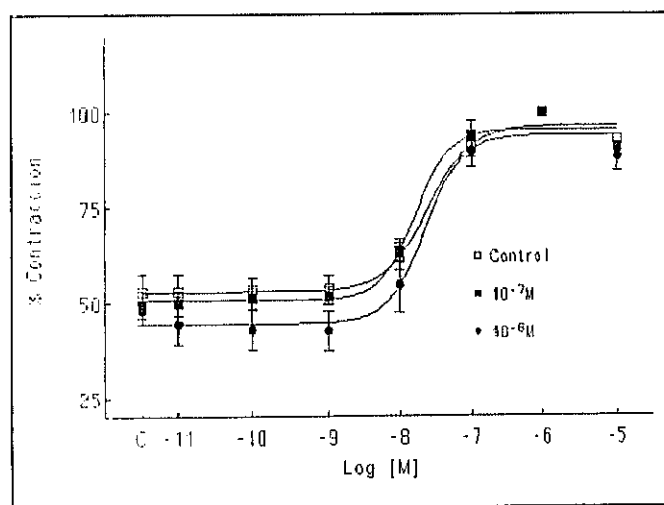
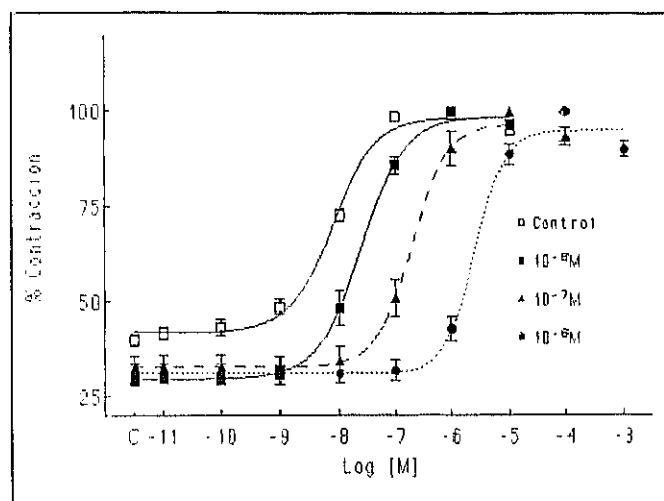


Figura 10.- Curvas concentración-respuesta al Isoproterenol en presencia de Propranolol (panel superior) y PCA-4248 (panel inferior) en aurículas izquierdas de cobaya estimuladas a la frecuencia basal de 3 Hz. En ordenadas se representa el porcentaje de contracción referido al valor basal (100%). En abscisas, el logaritmo negativo de la concentración molar de Isoproterenol. Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

1.3.3. ACTIVIDAD SOBRE CANALES DE Ca^{2+} .

Los resultados obtenidos con el PCA-4248 en preparaciones vasculares y cardíacas aisladas sugieren que podría exhibir propiedades antagonistas del Ca^{2+} a concentraciones elevadas (10^{-7}M - 10^{-6}M). Con el fin de confirmarlo, se realizaron estudios de desplazamiento de la fijación de [^3H]-Nitrendipino en músculo liso (íleon de cobaya) y cardíaco (corazón aislado de cobaya).

En íleon aislado, el Nitrendipino desplazó la unión de [^3H]-Nitrendipino a su receptor de forma concentración-dependiente y estadísticamente significativo a partir de 10^{-10}M ($p < 0.05$) (Figura 11). Por el contrario, PCA-4248 sólo modificó de forma significativa la unión de [^3H]-Nitrendipino a su receptor a la concentración de 10^{-6}M (Figura 11).

En los estudios de desplazamiento realizados en corazón aislado, el Nitrendipino desplazó la unión de [^3H]-Nitrendipino a su receptor de forma concentración-dependiente y estadísticamente significativo a partir de $3 \times 10^{-9}\text{M}$ ($p < 0.05$) (Figura 12). Por el contrario, el PCA-4248 tampoco modificó la unión de [^3H]-Nitrendipino a su receptor hasta alcanzar la concentración de 10^{-8}M (Figura 12).

Si se comparan los efectos de Nitrendipino en íleon y corazón aislado se observa que este compuesto desplazó de una manera algo más acusada la fijación de [^3H]-Nitrendipino en músculo liso que en el músculo cardíaco, aunque no existieron diferencias significativas en el desplazamiento de [^3H]-Nitrendipino entre ambos tejidos. El PCA-4248 desplazó de forma similar la fijación de [^3H]-Nitrendipino en músculo liso y cardíaco.

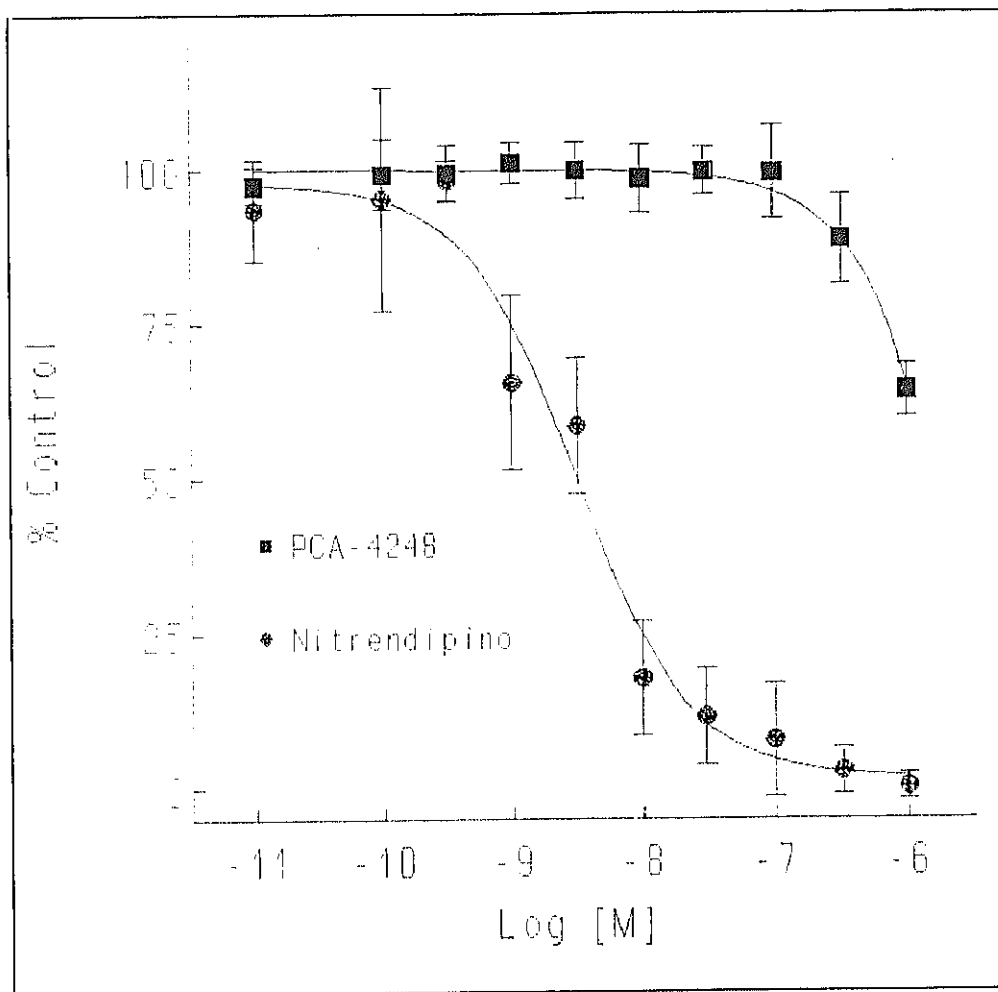


Figura 11.- Curva concentración-respuesta de PCA-4248 y Nitrendipino sobre el desplazamiento de la fijación de ^3H -Nitrendipino en ileon aislado de cobaya. En ordenadas se representa el porcentaje de fijación referido al valor basal (100%). En abscisas, el logaritmo negativo de la concentración molar del fármaco.

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

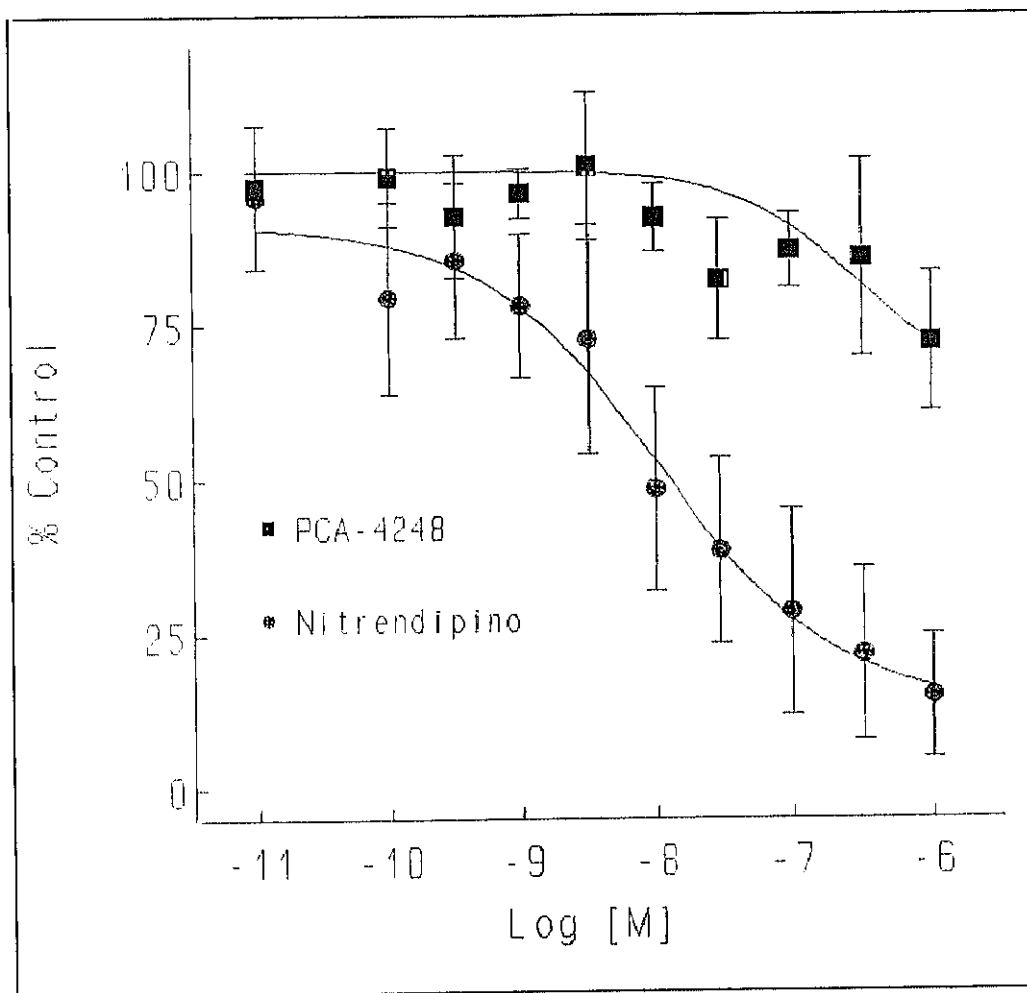


Figura 12.- Curva concentración-respuesta de PCA-4248 y Nitrendipino sobre el desplazamiento de la fijación de [³H]-Nitrendipino en corazones de cobaya. En ordenadas se representa el porcentaje de fijación referido al valor basal (100%). En abscisas, el logaritmo negativo de la concentración molar del fármaco.

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

2. ESTUDIOS REALIZADOS IN VIVO.

2.1. EFECTOS HEMODINAMICOS EN RATAS.

2.1.1. RATAS NORMOTENSAS.

Los valores basales de PAS, PAD, PAM y FC correspondientes a los grupos tratados con solvente (PEG-400), PCA-4248 y Nitrendipino se muestran en la Tabla XVII. Puede observarse que no existen diferencias estadísticamente significativas en los valores basales entre los distintos grupos de tratamiento.

	P.A.S. (mmHg)	P.A.D. (mmHg)	P.A.M. (mmHg)	F.C. (l.p.m.)
SOLVENTE	152 ± 1.0	128 ± 1.0	136 ± 1.0	385 ± 7.3
PCA-4248				
0.3 mg/Kg	148 ± 1.0	126 ± 0.8	133 ± 0.7	351 ± 8.1
1 mg/Kg	146 ± 2.6	126 ± 1.8	132 ± 1.9	393 ± 11.5
NITRENDIPINO				
0.3 mg/Kg	152 ± 1.0	128 ± 1.6	136 ± 1.4	358 ± 11.1
1 mg/Kg	149 ± 2.4	124 ± 2.4	132 ± 2.3	368 ± 10.4

Tabla XVII.- Valores basales de P.A.S., P.A.D., P.A.M. y F.C. en ratas normotensas.
Media ± E.E.M. n = 6. l.p.m. = latidos por minuto.

Como se puede observar en las Figuras 13 y 14, la administración intravenosa de PCA-4248 a la dosis de 0.3 mg/Kg no produjo ningún cambio significativo sobre la PAS y PAD, mientras que a la dosis de 1 mg/Kg produjo una pequeña disminución no significativa de la PAS ($-5.6 \pm 2.6\%$) y PAD ($-4.9 \pm 2.7\%$) en el primer minuto postadministración, pero se alcanzaron los valores control a los 3 minutos de su administración (Figuras 13 y 14). Por el contrario, a las mismas dosis, el Nitrendipino produjo una disminución de la PAS y PAD estadísticamente significativa con respecto al control y a los cambios producidos por el PCA-4248 ($p < 0.01$) (Figuras 13 y 14). El solvente, a dosis de 0.1 ml/Kg, no modificó la presión arterial (Figuras 13 y 14).

Con el Nitrendipino la máxima caída de PAS ($-41.5 \pm 1.9\%$ a la dosis de 0.3 mg/Kg y $-41.1 \pm 3.6\%$ a la dosis de 1 mg/Kg) y PAD ($-59.0 \pm 1.6\%$ a la dosis de 0.3 mg/Kg y $-53.5 \pm 2.5\%$ a la dosis de 1 mg/Kg) se obtuvo en el primer minuto postadministración, no existiendo diferencias significativas entre ambas dosis. Este efecto hipotensor se mantuvo con ambas dosis durante los 30 minutos que duró el experimento, aunque al cabo de este tiempo parecía ser más marcado y de mayor duración a la dosis de 1 mg/Kg (Figuras 13 y 14).

PCA-4248, a la dosis de 0.3 mg/Kg, no modificó la FC, mientras que a la dosis de 1 mg/Kg produjo una ligera disminución no significativa de la FC en el primer minuto postadministración ($-4.9 \pm 0.9\%$), recuperándose el valor control a los 5 minutos postadministración. Sin embargo, el Nitrendipino, a las mismas dosis, produjo una reducción de la FC dosis-dependiente y estadísticamente significativa con respecto al control y al PCA-4248 ($p < 0.01$) (Figura 15). El vehículo no modificó este parámetro.

La máxima disminución de FC se obtuvo en el primer minuto tras la administración de Nitrendipino a la dosis de 1 mg/Kg ($-17.8 \pm 1.9\%$); a esta dosis la disminución de la FC persistió después de 30 minutos postadministración, mientras que a dosis de 0.3 mg/Kg se alcanzó el valor control de la FC a los 20-25 minutos de la administración del fármaco (Figura 15).

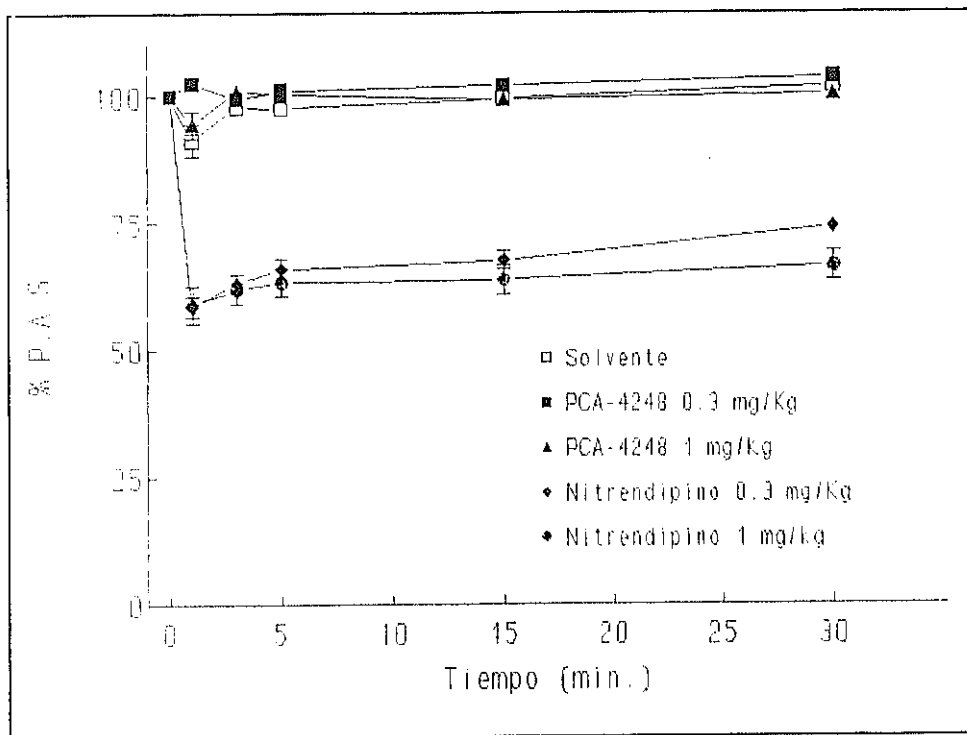


Figura 13.- Efectos del Solvente, PCA-4248 y Nitrendipino sobre la P.A.S. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abcisas, el tiempo (minutos). Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

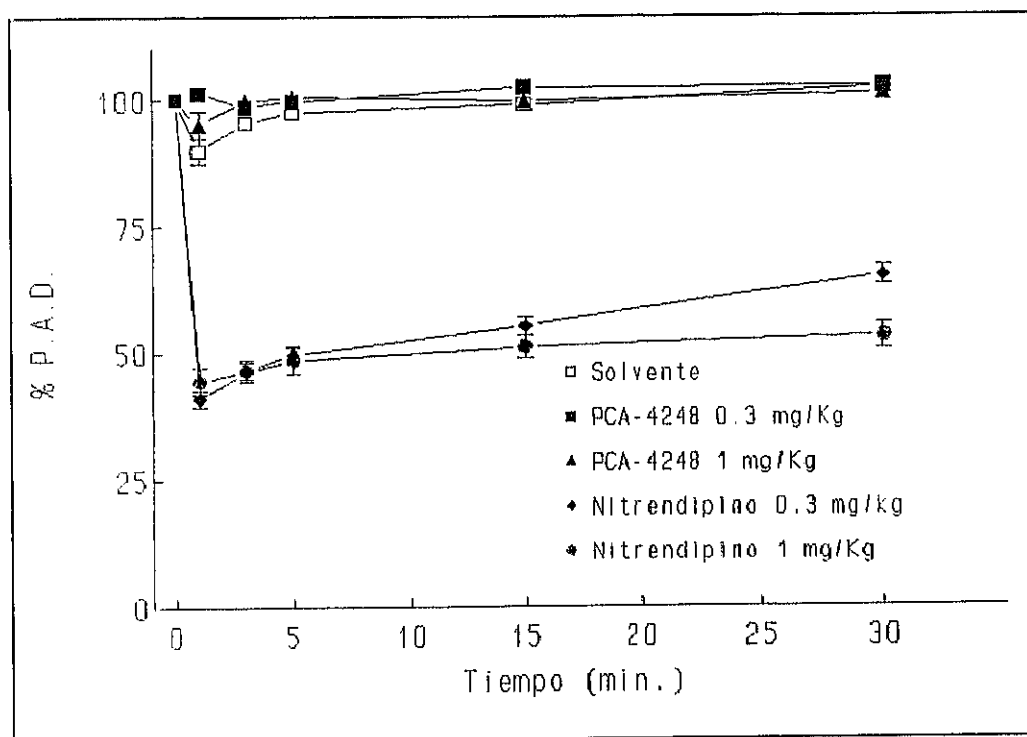


Figura 14.- Efectos del Solvente, PCA-4248 y Nitrendipino sobre la PAD. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos). Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

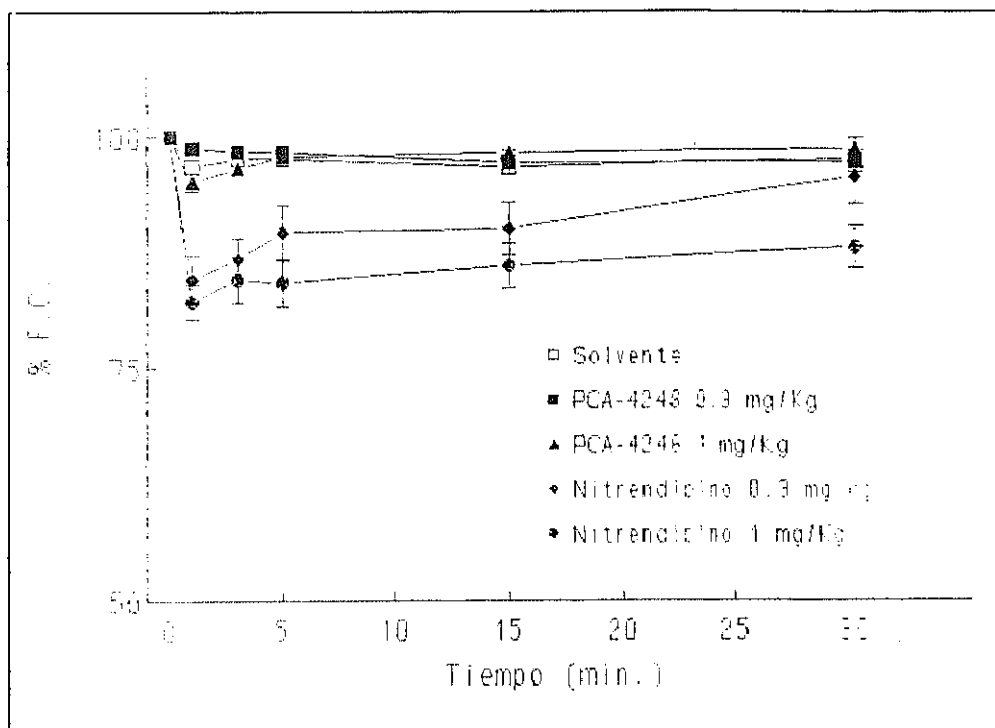


Figura 15.- Efectos del Solvente, PCA-4248 y Nitrendipino sobre la FC. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

2.1.2. RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS (SHR).

Los valores basales de PAS, PAD, PAM y FC correspondientes al grupo del solvente (PEG-400), de PCA-4248 y de Nitrendipino se muestran en la Tabla XVIII. Puede verse que no existen diferencias significativas entre los valores basales de cada uno de los grupos experimentales.

	P.A.S. (mmHg)	P.A.D. (mmHg)	P.A.M. (mmHg)	F.C. (l.p.m.)
SOLVENTE	224 ± 5.9	166 ± 7.2	183 ± 5.3	395 ± 10.8
PCA-4248				
0.3 mg/Kg	212 ± 10.3	147 ± 6.1	169 ± 7.4	447 ± 11.2
1 mg/Kg	215 ± 5.6	156 ± 5.6	176 ± 4.6	430 ± 11.2
NITRENDIPINO				
0.1 mg/Kg	207 ± 7.6	145 ± 5.8	166 ± 6.3	401 ± 7.9
0.3 mg/Kg	199 ± 11.1	139 ± 8.4	159 ± 9.3	395 ± 5.8

Tabla XVIII.- Valores basales de P.A.S., P.A.D., P.A.M. y F.C. en ratas SHR.

Media ± E.E.M. n = 6. l.p.m. = latidos por minuto.

Los efectos de la administración i.v. de PCA-4248 (0.3 y 1 mg/Kg) y Nitrendipino (0.1 y 0.3 mg/Kg) en ratas espontáneamente hipertensas se muestran en las Figuras 16, 17 y 18. En esta serie de experimentos, las dosis utilizadas de Nitrendipino fueron menores que las utilizadas en ratas normotensas, ya que Nitrendipino, a la dosis de 1 mg/Kg (dosis máxima en ratas normotensas), produjo en SHR una importante caída de la presión arterial acompañada de bloqueos sinoauriculares.

Como se puede observar en las Figuras 16 y 17, la administración intravenosa de PCA-4248 (0.3 mg/Kg) no produjo ningún cambio significativo sobre la PAS y PAD, mientras que a 1 mg/Kg produjo una ligera caída en la PAS ($-5.9 \pm 1.6\%$) y PAD ($-6.8 \pm 1.6\%$), estadísticamente significativa con respecto al control en el primer minuto postadministración ($p < 0.05$), que persistió durante los 30 minutos del experimento (Figuras 16 y 17). Sin embargo, el Nitrendipino a dosis de 0.1 y 0.3 mg/Kg, produjo una disminución de la presión arterial, dosis-dependiente y estadísticamente significativa con respecto al control y al PCA-4248 ($p < 0.01$) (Figuras 16 y 17). El vehículo, PEG-400, a dosis de 0.1 ml/Kg, no modificó ninguna de las presiones.

La máxima caída de PAS ($-47.9 \pm 3.6\%$ para la dosis de 0.1 mg/Kg y $-49.6 \pm 2.5\%$ para la dosis de 0.3 mg/Kg) y PAD ($-60.1 \pm 2.9\%$ para la dosis de 0.1 mg/Kg y $-60.7 \pm 3.4\%$ para la dosis de 0.3 mg/Kg) se obtuvo en el primer minuto tras la administración de Nitrendipino, no existiendo diferencias

significativas entre ambas dosis. Este efecto hipotensor fue mantenido con ambas dosis durante los 30 minutos que duró el experimento, siendo más pronunciado y de mayor duración a la dosis de 0.3 mg/Kg, mientras que a la dosis de 0.1 mg/Kg, hubo una paulatina recuperación de ambas presiones aunque sin llegar a alcanzar el valor control (Figuras 16 y 17).

PCA-4248, a dosis de 0.3 y 1 mg/Kg, produjo una ligera disminución no significativa de la FC mientras que Nitrendipino, a dosis de 0.1 y 0.3 mg/Kg, disminuyó la FC de forma dosis-dependiente y estadísticamente significativa con respecto al control y al PCA-4248 ($p < 0.01$) (Figura 18). La máxima disminución de FC se obtuvo con Nitrendipino a dosis de 0.3 mg/Kg ($-12.8 \pm 5.9\%$) en el primer minuto postadministración. Con ambas dosis, este efecto fue revirtiendo a lo largo del tiempo hasta alcanzar el valor control, siendo más rápida la reversión con la dosis más baja (0.1 mg/Kg) (Figura 18). El vehículo no modificó este parámetro.

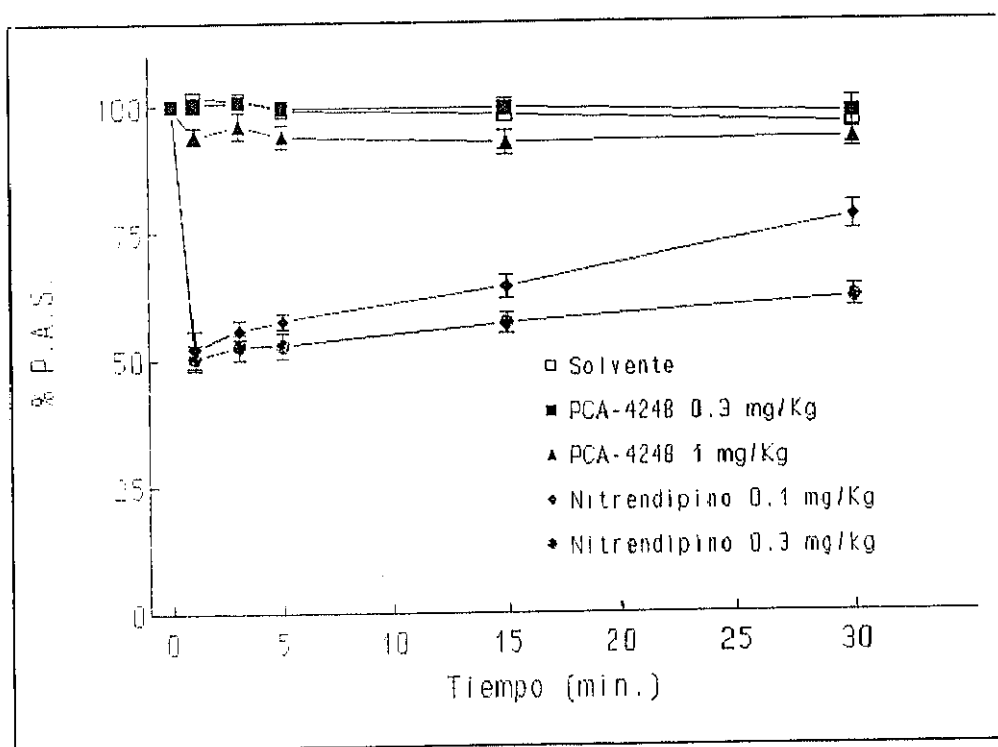


Figura 16.- Efectos del Solvente, PCA-4248 y Nitrendipino sobre la PAS en ratas SHR. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

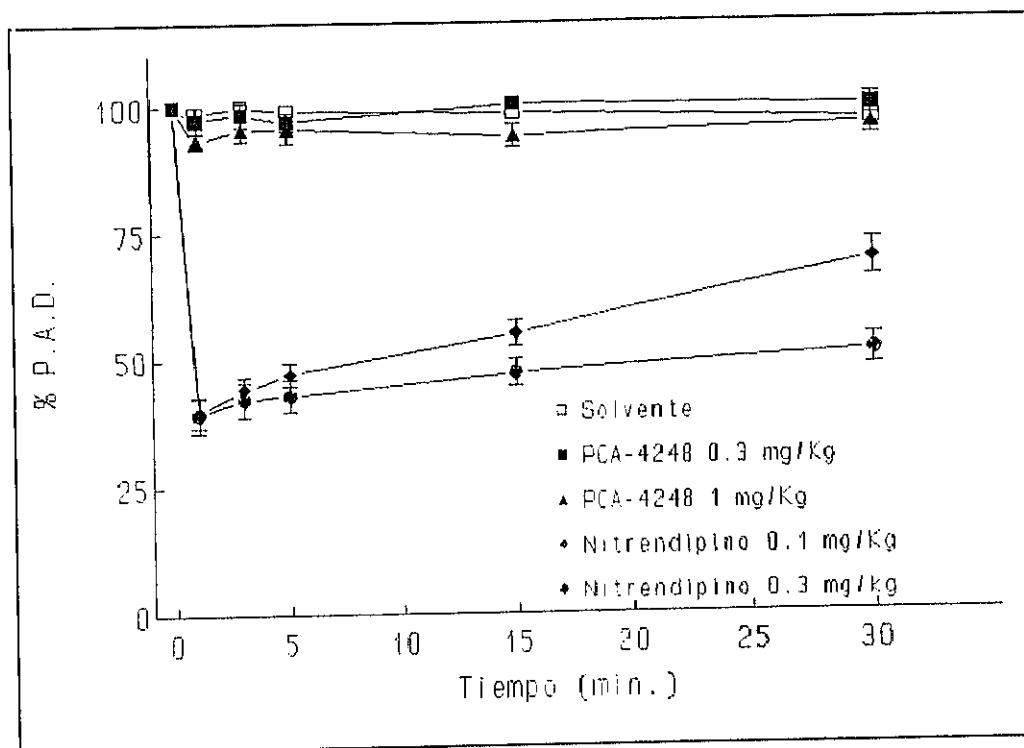


Figura 17.- Efectos del Solvente, PCA-4248 y Nitrendipino sobre la PAD en ratas SHR. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

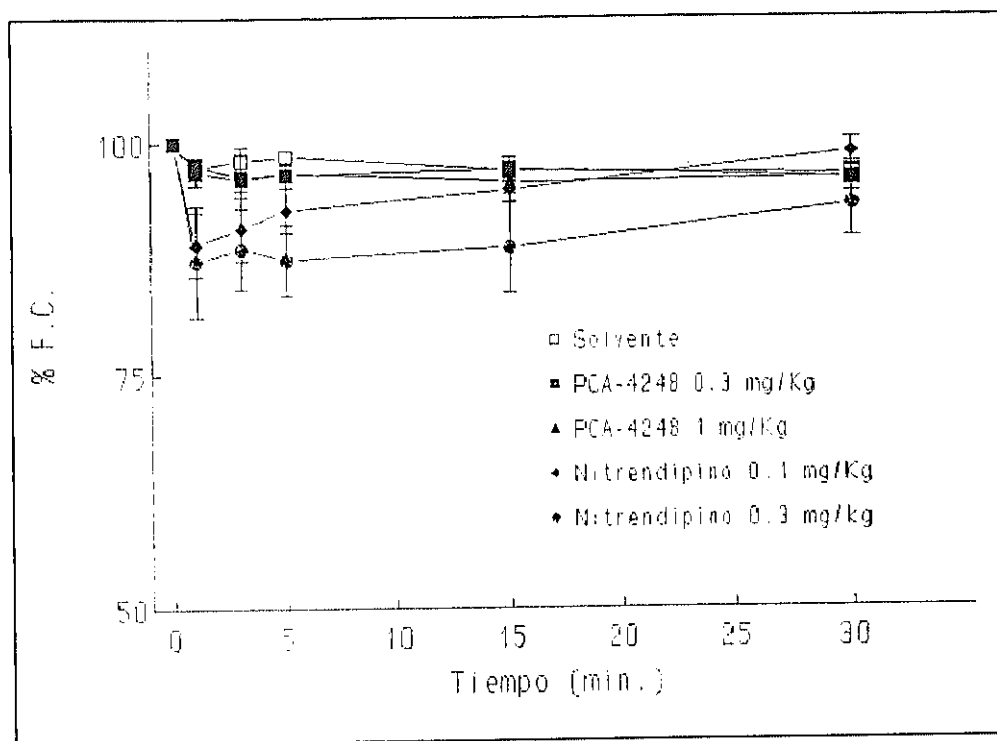


Figura 18.- Efectos del Solvente, PCA-4248 y Nitrendipino sobre la FC en ratas SHR. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abcisas, el tiempo (minutos). Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

Si se compara el efecto del PCA-4248 sobre la PAS y PAD entre ratas normotensas y SHR se observa que, a dosis de 1 mg/Kg, este compuesto produce una ligera disminución de la presión arterial en ratas SHR, estadísticamente significativa con respecto a los valores obtenidos en ratas normotensas ($p < 0.05$) (Figura 19).

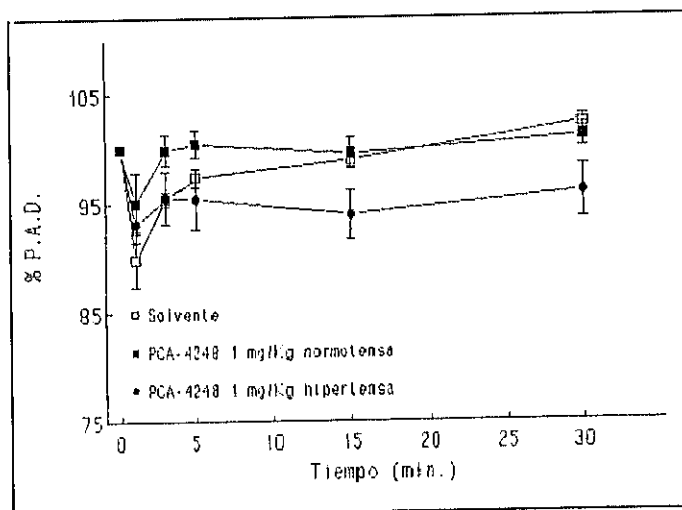
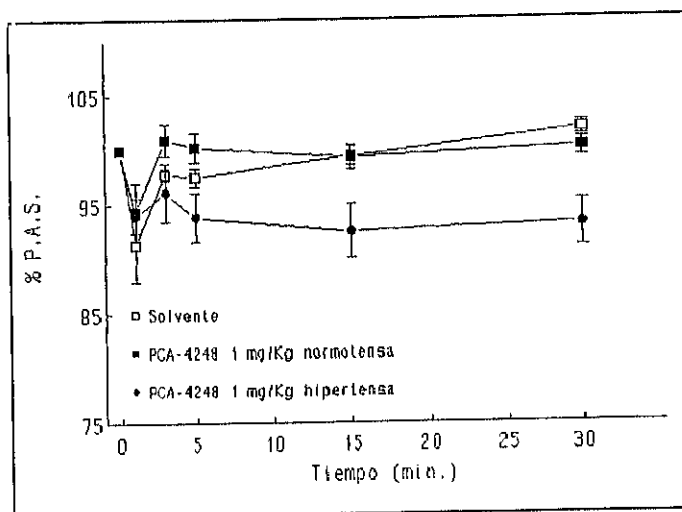


Figura 19.- Comparación del efecto de PCA-4248 sobre la PAS y PAD en ratas normotensas y SHR. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

2.2. HIPOTENSION INDUCIDA POR PAF EN RATAS ANESTESIADAS.

2.2.1. PROTECCION DE LA HIPOTENSION INDUCIDA POR PAF.

Se estudiaron los efectos de PCA-4248 (0.3 y 1 mg/Kg) y Nitrendipino (10 μ g/Kg) sobre la hipotensión inducida tras la administración i.v. de PAF-acéther a las dosis de 0.33 y 0.66 μ g/Kg en ratas anestesiadas. Los valores basales de PAS, PAD, PAM y FC para cada uno de los grupos de tratamiento se muestran en la Tabla XIX. Puede observarse que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales para cada uno de los grupos de tratamiento.

	P.A.S. (mmHg)	P.A.D. (mmHg)	P.A.M. (mmHg)	F.C. (l.p.m.)
VEHICULO				
0.33 μ g/Kg PAF	155 \pm 5.7	108 \pm 5.2	123 \pm 5.1	417 \pm 20.1
0.66 μ g/Kg PAF	145 \pm 3.8	101 \pm 6.9	115 \pm 3.5	396 \pm 15.9
PCA-4248 0.3 mg/Kg				
0.33 μ g/Kg PAF	144 \pm 3.7	98 \pm 3.6	113 \pm 3.6	395 \pm 5.9
0.66 μ g/Kg PAF	146 \pm 3.4	95 \pm 3.3	112 \pm 3.3	418 \pm 6.2
PCA-4248 1 mg/Kg				
0.33 μ g/Kg PAF	154 \pm 3.1	104 \pm 5.1	120 \pm 4.2	417 \pm 7.4
0.66 μ g/Kg PAF	140 \pm 6.3	101 \pm 6.9	114 \pm 6.7	407 \pm 10.5
NITRENDIPINO 10 μ g/Kg				
0.33 μ g/Kg PAF	144 \pm 5.3	98 \pm 4.4	114 \pm 4.2	399 \pm 11.2
0.66 μ g/Kg PAF	136 \pm 3.5	93 \pm 4.3	107 \pm 3.7	411 \pm 6.5

Tabla XIX.- Valores basales de P.A.S., P.A.D., P.A.M. y F.C. para cada uno de los grupos de tratamiento.

Media \pm E.E.M. n = 6. l.p.m. = latidos por minuto.

El posible efecto protector de PCA-4248 y Nitrendipino se estudió administrando ambos fármacos por vía i.v. 5 minutos antes de la infusión de PAF-acéther. La administración previa del vehículo o de PCA-4248 no produjo ningún cambio significativo sobre la presión arterial, mientras que Nitrendipino produjo una disminución significativa de la PAS (-8.8 ± 1.4 mmHg. $p < 0.01$) y PAD (-10.5 ± 1.6 . $p < 0.01$) (Figuras 20, 21, 23 y 24).

La administración intravenosa de PAF (0.33 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) produjo una caída máxima de la PAS y PAD de -77.1 ± 3.2 y -59.5 ± 4.2 mmHg, respectivamente, al minuto de su administración; a partir de este tiempo, el efecto hipotensor fue revirtiendo lentamente pero sin llegar a alcanzar el valor control después de 30 minutos de experimento (Tabla XX, Figuras 20 y 21). La administración del solvente (PEG-400) a dosis de 0.1 ml/Kg, no produjo ningún efecto sobre la hipotensión inducida por PAF (Tabla XX).

	0 min	1 min	5 min	15 min	30 min
PAF 0.33 $\mu\text{g}/\text{Kg}$					
F.C.	100 \pm 0.1	101.3 \pm 0.4	108.4 \pm 2.5	104.7 \pm 1.79	99.8 \pm 1.0
P.A.S.	+0.5 \pm 0.1	-77.1 \pm 3.2	-36.6 \pm 3.8	-7.9 \pm 4.7	-1.6 \pm 4.7
P.A.D.	+0.5 \pm 0.2	-59.5 \pm 4.2	-25.7 \pm 2.0	-5.9 \pm 4.5	-5.2 \pm 1.6
P.A.M.	+0.5 \pm 0.1	-64.6 \pm 4.2	-29.1 \pm 2.7	-6.1 \pm 4.4	-4.0 \pm 4.2
SOLVENTE					
F.C.	100.4 \pm 1.2	100.5 \pm 1.3	106.7 \pm 1.9	104.1 \pm 2.1	97.6 \pm 3.4
P.A.S.	+0.3 \pm 0.7	-80.8 \pm 6.7	-35.2 \pm 5.5	-9.4 \pm 5.1	-4.2 \pm 5.5
P.A.D.	+0.6 \pm 0.8	-61.1 \pm 5.6	-25.5 \pm 3.9	-7.8 \pm 5.1	-5.9 \pm 5.7
P.A.M.	+0.4 \pm 0.8	-67.7 \pm 5.8	-28.6 \pm 4.4	-8.4 \pm 5.1	-4.9 \pm 5.5

Tabla XX.- Efectos del Solvente sobre los cambios inducidos por el PAF (0.33 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) sobre la PAS, PAD, PAM (mmHg) y FC (expresado como porcentaje de cambio normalizado al valor 100%).
Media \pm E.E.M. n = 6.

La administración del PCA-4248 (0.3 mg/Kg) produjo una leve inhibición en la respuesta hipotensora de PAF (-69.9 ± 5.8 mmHg para la PAS y -48.5 ± 3.8 mmHg para la PAD), no siendo este efecto estadísticamente significativo; sin embargo, a la dosis de 1 mg/Kg, el PCA-4248 produjo una mayor inhibición en la respuesta hipotensora de PAF (-52.6 ± 4.2 mmHg para la PAS y -43.3 ± 3.9 mmHg para la PAD), siendo este efecto estadísticamente significativo para la PAS ($p < 0.01$) y PAD ($p < 0.05$) (Figuras 20 y 21). Nitrendipino, a dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, también disminuyó la hipotensión inducida por PAF (-59.1 ± 1.9 mmHg para la PAS y -40.0 ± 2.9 mmHg para la PAD), siendo este efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) (Figuras 20 y 21).

La reversión de la hipotensión inducida por PAF fue más rápida en los animales tratados previamente con PCA-4248 (1 mg/Kg) y Nitrendipino que con el vehículo y con el PCA-4248 (0.3 mg/Kg), alcanzando el valor control el grupo tratado con PCA-4248 (1 mg/Kg) a los 10 minutos de la administración de PAF y, a los 15 minutos, el grupo tratado con Nitrendipino. El PCA-4248 (0.3 mg/Kg) alcanzó el valor

control a los 30 minutos de su administración.

Sobre la FC, se observó una taquicardia tras la administración de PAF en todos los grupos tratados, siendo menos acusada en el grupo tratado con PCA-4248 a la dosis de 0.3 mg/Kg (Figura 22).

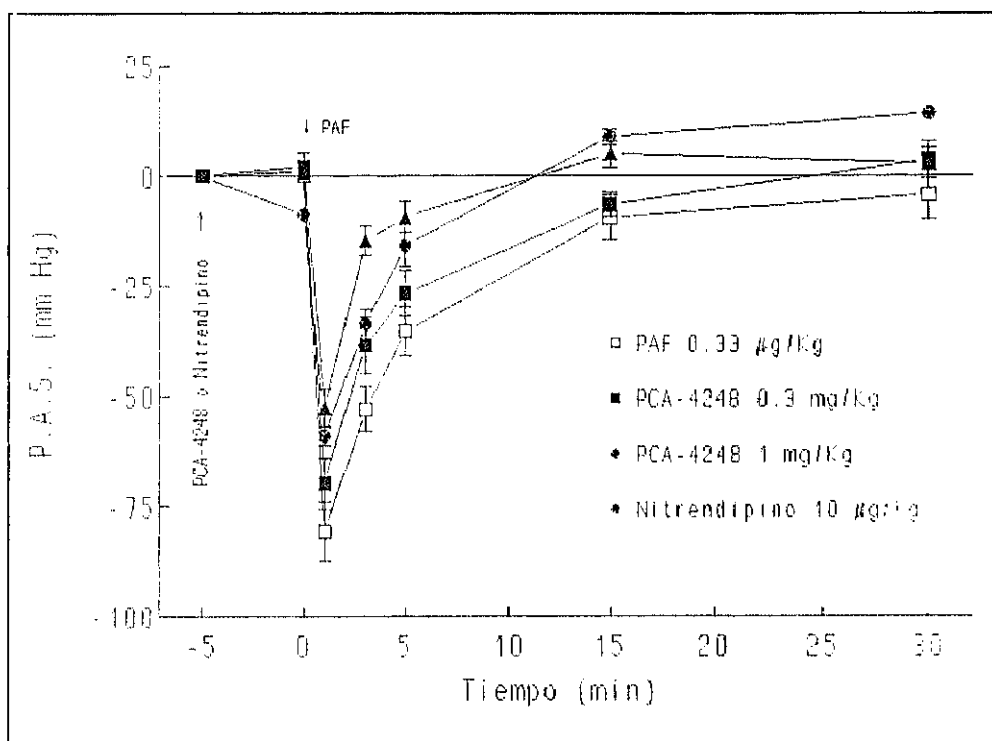


Figura 20.- Efectos del PCA-4248 y Nitrendipino sobre la reducción de la PAS inducida por el PAF (0.33 µg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa la caída de PAS en mmHg. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

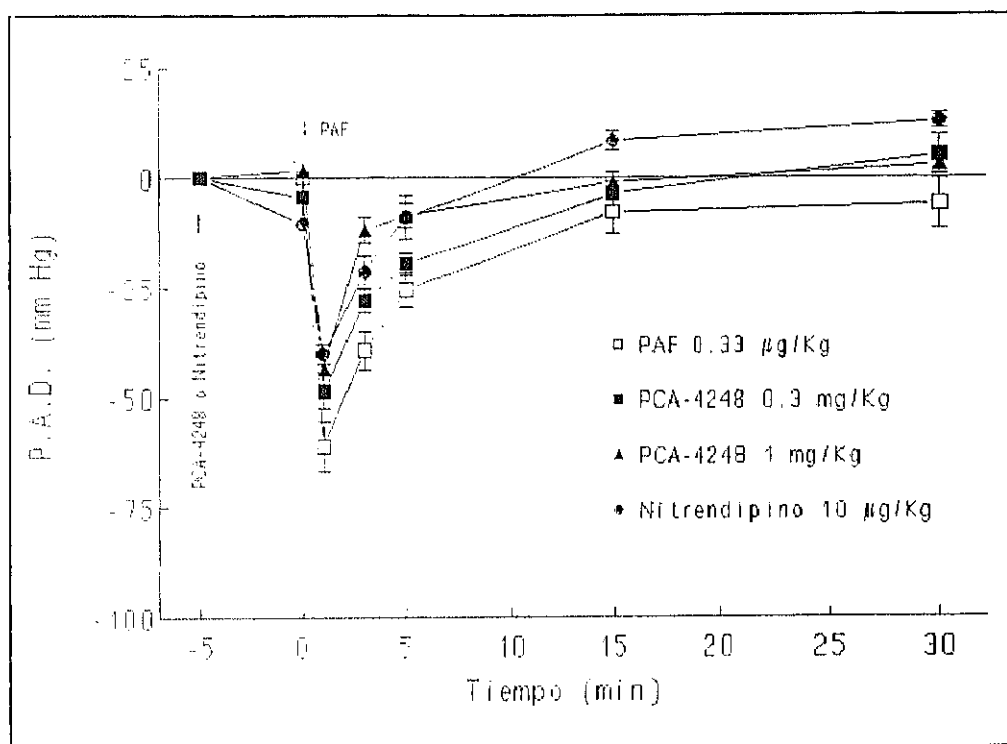


Figura 21.- Efectos del PCA-4248 y Nitrendipino sobre la reducción de la PAD inducida por el PAF (0.33 µg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa la caída de PAD en mmHg. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. n = 6.

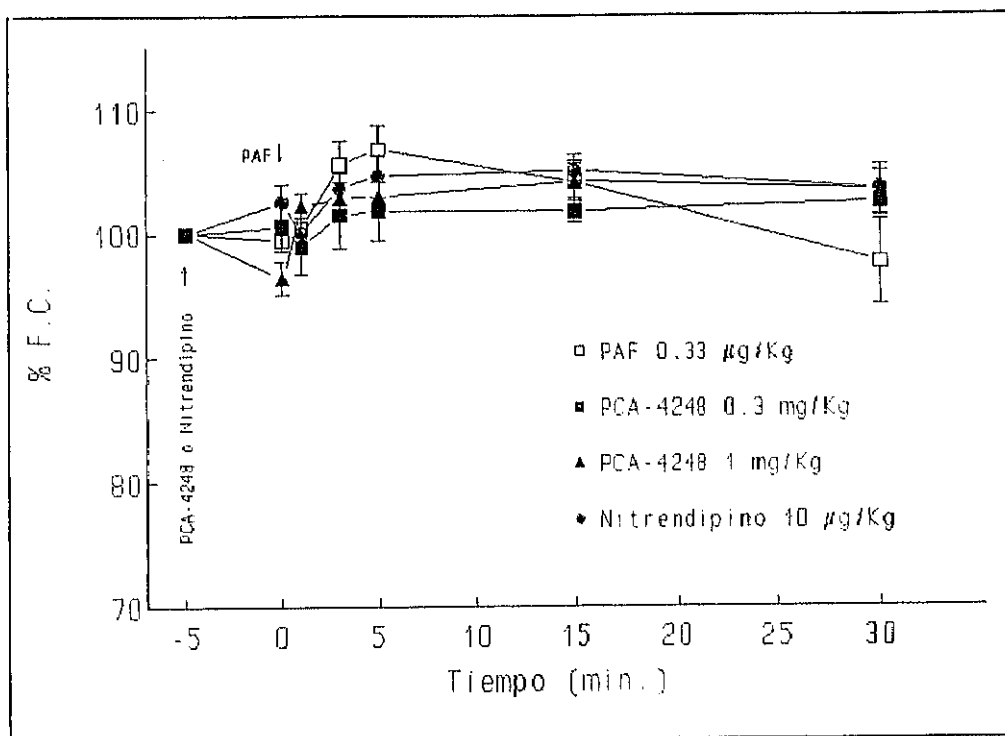


Figura 22.- Efectos del PCA-4248 y Nitrendipino sobre los cambios de la FC inducidos por el PAF(0.33 µg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

Cuando se administraron dosis superiores de PAF (0.66 µg/Kg) se produjo una mayor caída de la PAS y PAD (-76.9 ± 4.8 y -56.6 ± 4.3 mmHg, respectivamente) que fue máxima al minuto de su inyección; este efecto hipotensor revirtió más lentamente que con la dosis de 0.33 µg/Kg, sin llegar a alcanzar el valor control tras 30 minutos de experimento (Tabla XXI, Figuras 23 y 24). El solvente, PEG-400, administrado intravenosamente, no produjo ningún efecto sobre la hipotensión inducida por el PAF (Tabla XXI).

	0 min	1 min	5 min	15 min	30 min
PAF 0.66 $\mu\text{g}/\text{Kg}$					
F.C.	100 \pm 0.1	99.3 \pm 1.6	106.3 \pm 0.9	110.8 \pm 1.7	103.4 \pm 2.1
P.A.S.	+0.5 \pm 0.1	-76.9 \pm 4.8	-56.8 \pm 4.7	-18.0 \pm 3.0	-4.6 \pm 4.7
P.A.D.	+0.5 \pm 0.2	-56.6 \pm 4.3	-38.2 \pm 3.2	-7.7 \pm 4.1	-4.2 \pm 3.8
P.A.M.	+0.5 \pm 0.1	-62.7 \pm 3.7	-44.2 \pm 3.7	-15.6 \pm 3.5	-4.2 \pm 2.0
SOLVENTE					
F.C.	99.8 \pm 1.4	97.8 \pm 1.4	105.4 \pm 1.9	107.1 \pm 2.5	103.2 \pm 2.1
P.A.S.	+0.3 \pm 0.7	-77.5 \pm 5.7	-55.9 \pm 5.1	-17.2 \pm 3.6	-4.7 \pm 4.5
P.A.D.	+0.6 \pm 0.8	-59.5 \pm 4.6	-38.8 \pm 4.4	-12.9 \pm 4.2	-3.1 \pm 4.3
P.A.M.	+0.4 \pm 0.8	-63.7 \pm 4.5	-44.4 \pm 4.6	-14.4 \pm 3.9	-4.2 \pm 4.4

Tabla XXI.- Efectos del Solvente sobre los cambios inducidos por el PAF (0.66 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) sobre la PAS, PAD, PAM (mmHg) y FC (expresado como porcentaje de cambio normalizado al valor 100%).
Media \pm E.E.M. n = 6.

El pretratamiento con PCA-4248 (0.3 mg/Kg i.v.) no protegió del efecto hipotensor (-80.6 \pm 2.3 mmHg para la PAS y -56.3 \pm 5.5 mmHg para la PAD)(Figuras 23 y 24); sin embargo, a la dosis de 1 mg/Kg, el PCA-4248 protegió del efecto hipotensor inducido por el PAF (-60.9 \pm 4.3 mmHg para la PAS y -52.3 \pm 5.8 mmHg para la PAD. $p < 0.05$). Nitrendipino (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) también inhibió la hipotensión inducida por PAF sobre la PAS y PAD (-64.6 \pm 3.2 mmHg y -40.9 \pm 3.2 mmHg, respectivamente), pero estos cambios no alcanzaron valores estadísticamente significativos (Figuras 23 y 24).

La reversión del efecto hipotensor inducido por PAF fue más rápida en el grupo tratado con PCA-4248 (1 mg/Kg) que en los grupos tratados con el vehículo, PCA-4248 (0.3 mg/Kg) o Nitrendipino (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), alcanzando el valor control a los 30 minutos de la administración de PAF los tres últimos grupos de tratamiento.

Tras la administración de PAF en los animales tratados con el vehículo y con ambas dosis de PCA-4248, se observó a los 3 minutos un aumento de la FC, mientras que en el grupo de Nitrendipino la taquicardia inducida por PAF no se observó hasta los 15 minutos de la administración de PAF, sin llegar a alcanzar valores estadísticamente significativos (Figura 25).

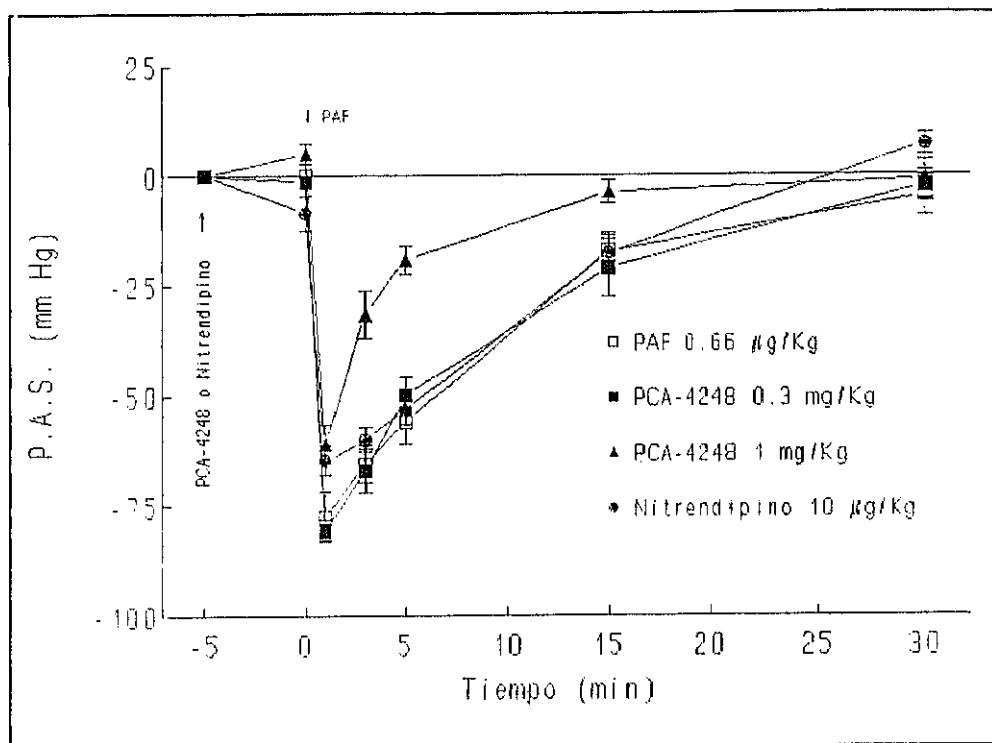


Figura 23.- Efectos del PCA-4248 y Nitrendipino sobre la reducción de la PAS inducida por el PAF (0.66 µg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa la caída de PAS en mmHg. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. n = 6.

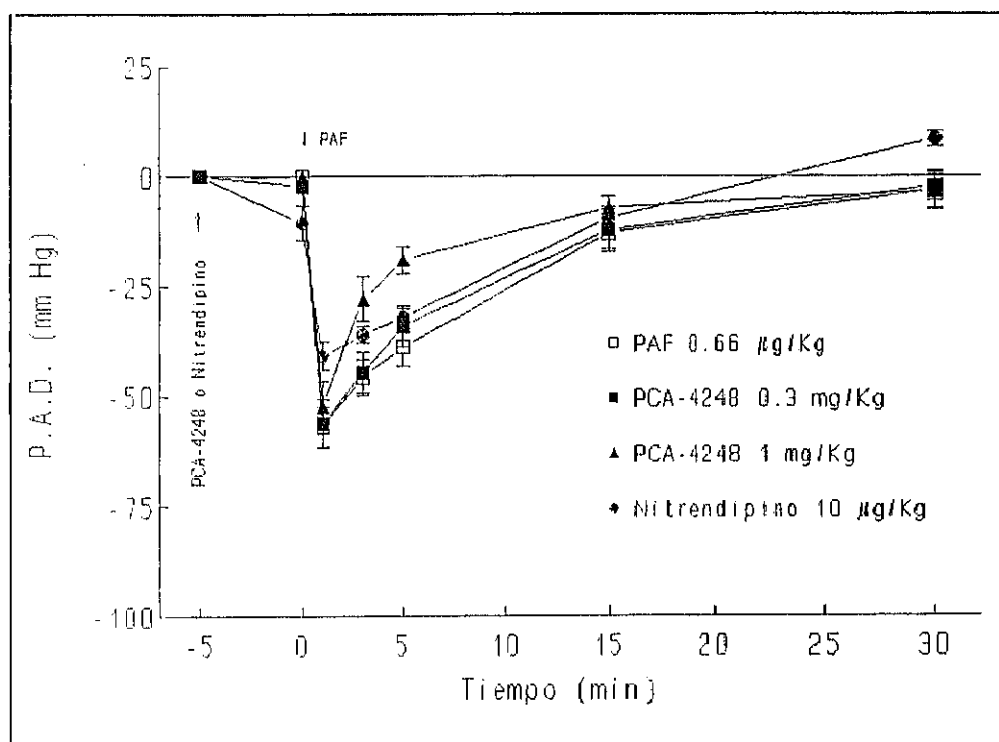


Figura 24.- Efectos del PCA-4248 y Nitrendipino sobre la reducción de la PAD inducida por el PAF (0.66 µg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa la caída de PAD en mmHg. En abscisas, el tiempo (minutos).
Cada punto representa la media \pm E.E.M. n = 6.

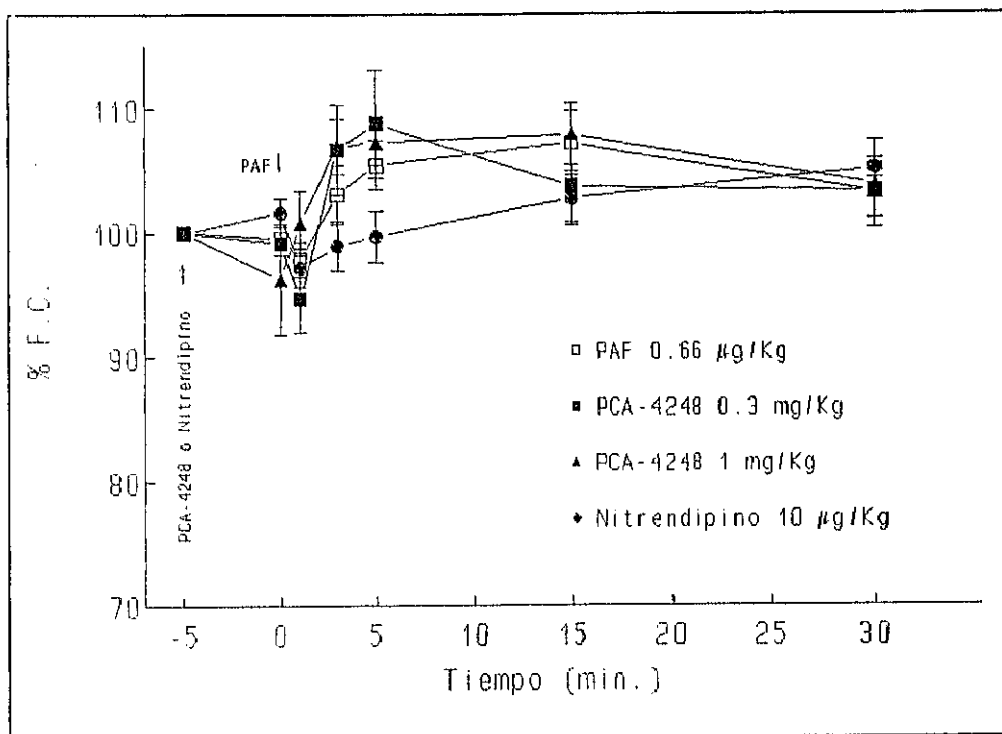


Figura 25.- Efectos del PCA-4248 y Nitrendipino sobre los cambios de la FC inducidos por el PAF (0.66 µg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. n = 6.

2.2.2. REVERSION DE LA HIPOTENSION INDUCIDA POR PAF.

Tras los resultados obtenidos en los experimentos de hipotensión inducida por PAF, se escogió la dosis de 0.33 µg/Kg para los experimentos de reversión, puesto que esta dosis de PAF produjo una disminución de la presión arterial semejante a la obtenida con la dosis de 0.66 µg/Kg y una reversión más rápida y la dosis de 1 mg/Kg de PCA-4248 para los experimentos posteriores, ya que fue la dosis más activa.

Los valores basales de PAS, PAD, PAM y FC correspondientes al grupo del solvente (PEG-400) y PCA-4248 (1 mg/Kg) se muestran en la Tabla XXII. De nuevo, no hubo diferencias entre los valores

basales de ambos grupos.

	P.A.S. (mmHg)	P.A.D. (mmHg)	P.A.M. (mmHg)	F.C. (l.p.m.)
SOLVENTE	155 ± 5.7	108 ± 5.1	123 ± 5.1	417 ± 20.1
PCA-4248	149 ± 4.6	94 ± 2.8	112 ± 2.9	406 ± 8.3

Tabla XXII.- Valores basales de P.A.S., P.A.D., P.A.M. y F.C en los grupos experimentales en los que se analizó la reversión de la hipotensión inducida por el PAF (0.33 µg/Kg, i.v.).

Media ± E.E.M. n = 6. l.p.m. = latidos por minuto.

Cuando la hipotensión inducida por PAF es máxima, la administración intravenosa de PCA-4248 revirtió la caída de la PAS de -72.3 ± 4.0 mmHg a -10.7 ± 5.6 mmHg ($p < 0.01$) y de la PAD de -47.9 ± 2.6 mmHg a -12.5 ± 6.9 mmHg ($p < 0.01$), alcanzándose el valor control de presión arterial a los 20 minutos de la administración de PAF (Figuras 26 y 27). El solvente (PEG-400) no modificó los parámetros antes mencionados.

Sobre la FC, se observó una taquicardia tras la administración de PAF en el grupo tratado con PAF sólo y con el solvente, mientras que el grupo tratado con PCA-4248 apenas modificó la FC (Figura 28).

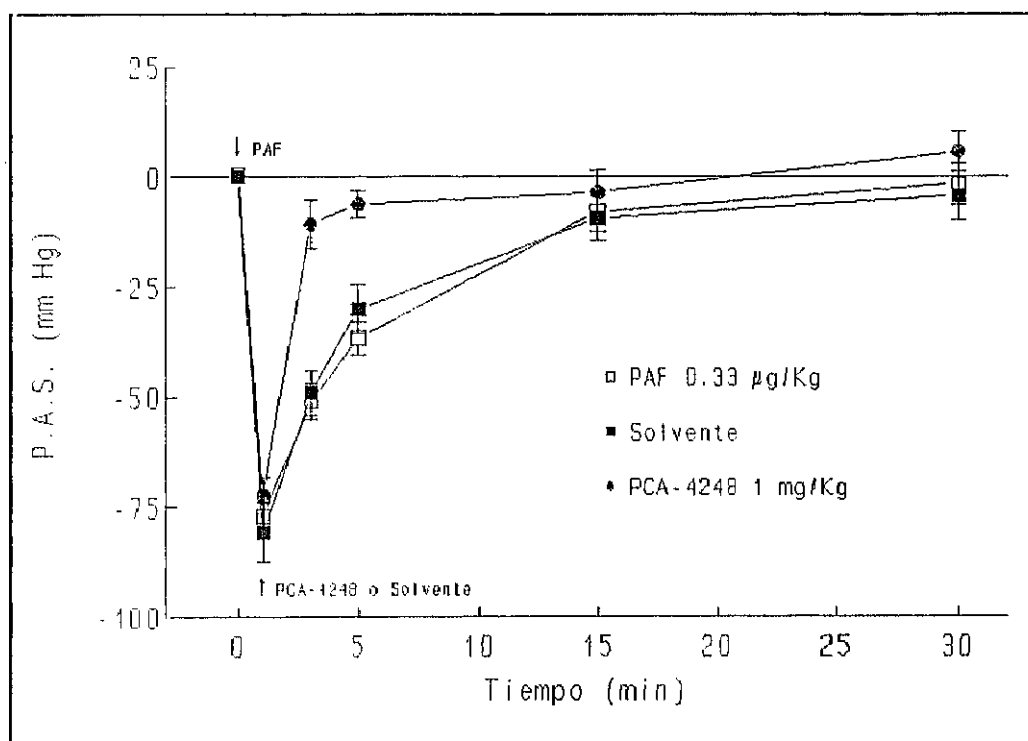


Figura 26.- Reversión de la reducción de la PAS inducida por el PAF (0.33 µg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas tras la administración del PCA-4248. En ordenadas se representa la caída de PAS en mmHg. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

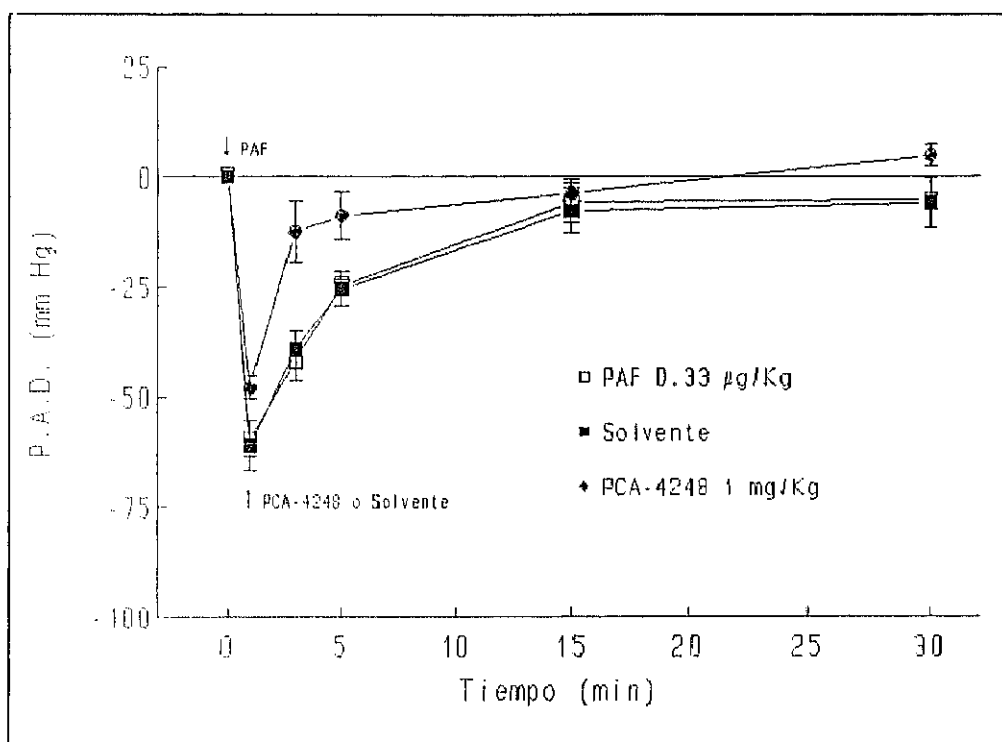


Figura 27.- Reversión de la reducción de la PAD inducida por el PAF (0.33 µg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas tras la administración del PCA-4248. En ordenadas se representa la caída de PAD en mmHg. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. n = 6.

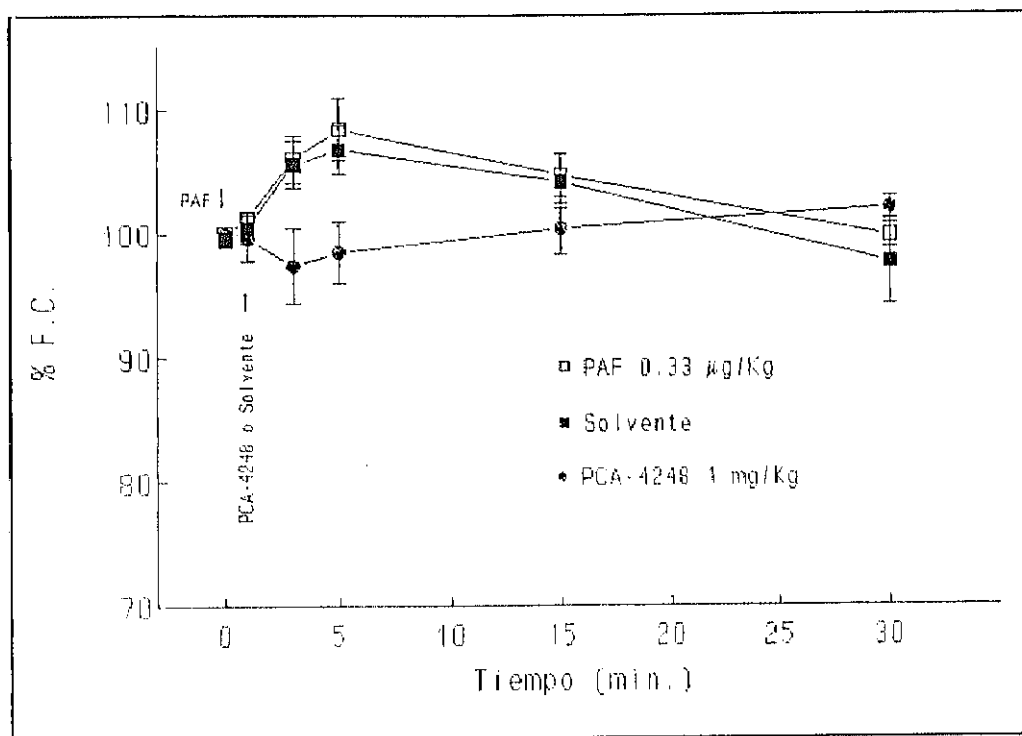


Figura 28.- Reversión de los cambios de la FC inducidos por el PAF (0.33 µg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas tras la administración del PCA-4248. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. n = 6.

2.3. MODELOS DE SHOCK.

2.3.1. PROTECCION DE LA HIPOTENSION INDUCIDA POR INMUNOAGREGADOS SOLUBLES DE IgG.

Se estudiaron los efectos de PCA-4248 (1 mg/Kg) y Nitrendipino (10 µg/Kg) sobre la hipotensión inducida tras la administración i.v. de inmunoagregados de IgG a la dosis de 9 mg/Kg en rata anestesiada. Los valores basales de PAS, PAD, PAM y FC para cada uno de los grupos de tratamiento se muestran en la Tabla XXIII, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales para cada uno de los grupos de tratamiento.

	P.A.S. (mmHg)	P.A.D. (mmHg)	P.A.M. (mmHg)	F.C. (l.p.m.)
SOLVENTE	149 ± 6.5	109 ± 5.1	122 ± 4.7	445 ± 14.5
PCA-4248	138 ± 4.6	103 ± 5.5	114 ± 5.1	454 ± 11.8
NITRENDIPINO	144 ± 3.3	105 ± 2.8	118 ± 2.7	385 ± 7.4

Tabla XXIII.- Valores basales de P.A.S., P.A.D., P.A.M. y F.C. para cada uno de los grupos de tratamiento.

Media ± E.E.M. n = 6. l.p.m. = latidos por minuto.

El posible efecto protector de PCA-4248 (1 mg/Kg) y Nitrendipino (10 µg/Kg) se estudió administrando ambos 5 minutos antes de la infusión de los inmunoagregados de IgG.

La administración previa del solvente o de PCA-4248 no produjo ningún cambio significativo sobre la presión arterial (Tabla XXIV), mientras que el Nitrendipino produjo una disminución de la PAS (-9.2 ± 4.2 mmHg) y PAD (-9.1 ± 3.9 mmHg) estadísticamente significativa con respecto al control y PCA-4248 ($p < 0.05$) (Figuras 29 y 30).

La administración intravenosa de inmunoagregados solubles de IgG, a dosis de 9 mg/Kg, produjo una caída máxima de la PAS y PAD de -72.5 ± 6.6 y -58.7 ± 4.2 mmHg, respectivamente a los 1-2 minutos de su administración; a partir de este tiempo, el efecto hipotensor fue revirtiendo paulatinamente pero no llegó a alcanzar el valor control después de 30 minutos de experimento (Tabla XXIV, Figuras 29 y 30). La administración del solvente (PEG-400) a dosis de 0.1 ml/Kg, no produjo ningún efecto sobre la hipotensión inducida por inmunoagregados de IgG (Tabla XXIV).

	0 min	3 min	5 min	15 min	30 min
IgG 9 mg/Kg					
F.C.	100 ± 0.1	96.5 ± 2.1	93.9 ± 3.5	96.4 ± 2.0	100.0 ± 0.2
P.A.S.	+0.5 ± 0.1	-72.5 ± 6.6	-68.7 ± 5.2	-30.0 ± 6.1	-7.5 ± 4.7
P.A.D.	+0.5 ± 0.2	-58.7 ± 4.2	-53.7 ± 2.3	-26.2 ± 5.1	-5.0 ± 3.6
P.A.M.	+0.5 ± 0.1	-63.3 ± 4.9	-58.6 ± 3.2	-27.4 ± 5.2	-5.2 ± 4.0
SOLVENTE					
F.C.	99.8 ± 1.4	96.3 ± 2.6	98.0 ± 3.4	97.7 ± 2.0	100.8 ± 2.7
P.A.S.	+0.3 ± 0.7	-74.2 ± 6.2	-68.3 ± 5.6	-32.1 ± 5.8	-12.5 ± 6.3
P.A.D.	+0.6 ± 0.8	-58.7 ± 4.4	-54.2 ± 3.0	-26.7 ± 3.8	-7.5 ± 4.3
P.A.M.	+0.4 ± 0.8	-62.7 ± 4.4	-57.7 ± 3.4	-28.8 ± 5.1	-8.3 ± 5.0

Tabla XXIV.- Efectos del Solvente sobre los cambios inducidos por inmunoagregados solubles de IgG (9 mg/Kg) sobre la PAS, PAD, PAM (mmHg) y FC (expresado como porcentaje de cambio normalizado al valor 100%).

Media ± E.E.M. n = 6.

El pretratamiento con Nitrendipino por vía intravenosa a dosis de 10 µg/Kg, redujo ligeramente la hipotensión inducida por inmunoagregados de IgG (-45.4 ± 3.8 mmHg para la PAS y -37.8 ± 3.5 mmHg para la PAD) ($p < 0.05$) (Figuras 29 y 30). PCA-4248, a la dosis de 1 mg/Kg, produjo una mayor protección frente a la hipotensión inducida por inmunoagregados de IgG (-23.7 ± 4.1 mmHg para la PAS y -19.6 ± 4.9 mmHg para la PAD), siendo estadísticamente significativa con respecto al control y a Nitrendipino ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente) (Figuras 29 y 30). Además, la reversión de la hipotensión inducida por inmunoagregados solubles de IgG fue más rápida en el grupo tratado con PCA-4248, alcanzándose el valor control a los 15 minutos postadministración.

Sobre la FC, se observó una taquicardia a los 3 minutos de la administración de los inmunoagregados de IgG en el grupo tratado con el PCA-4248, mientras que en los grupos tratados con el inmunoagregado y Nitrendipino se observó una disminución de la FC (Figura 31).

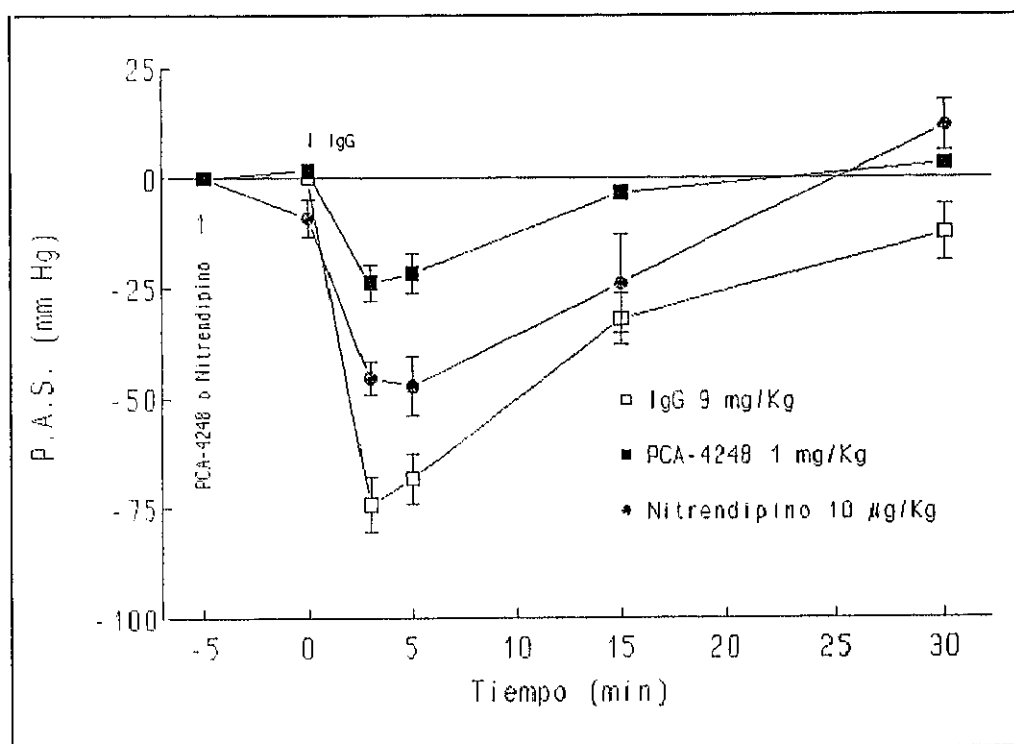


Figura 29.- Efectos del PCA-4248 y Nitrendipino sobre la reducción de la PAS inducida por inmunoagregados solubles de IgG (9 mg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa la caída de PAS en mmHg. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

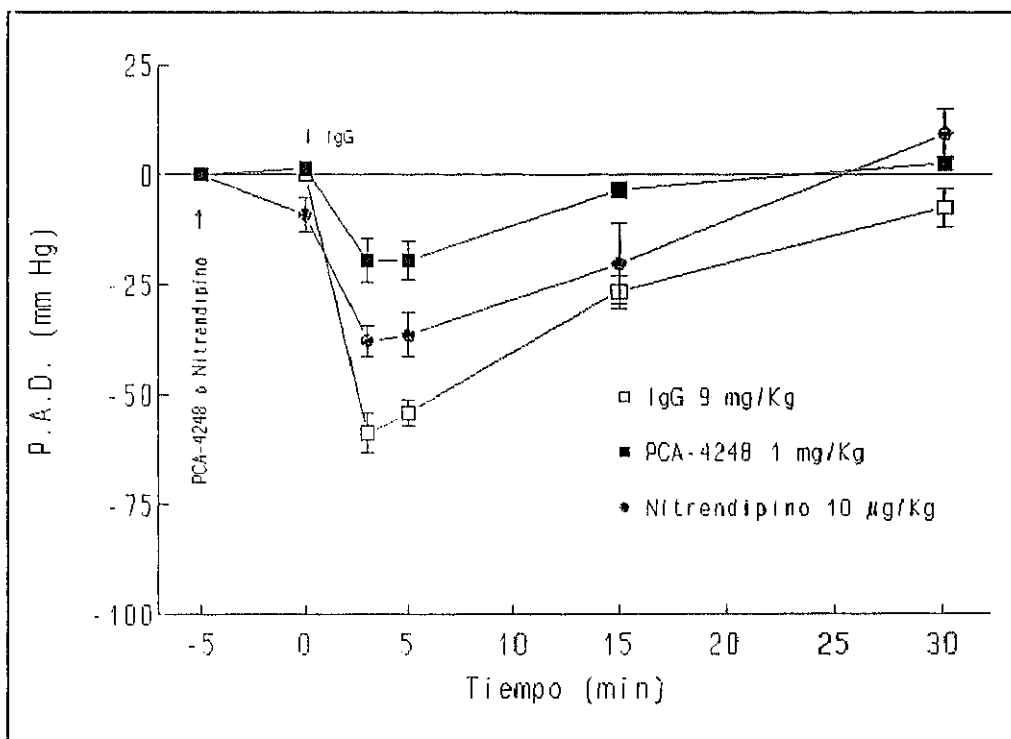


Figura 30.- Efectos del PCA-4248 y Nitrendipino sobre la reducción de la PAD inducida por inmunoagregados solubles de IgG (9 mg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa la caída de PAD en mmHg. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

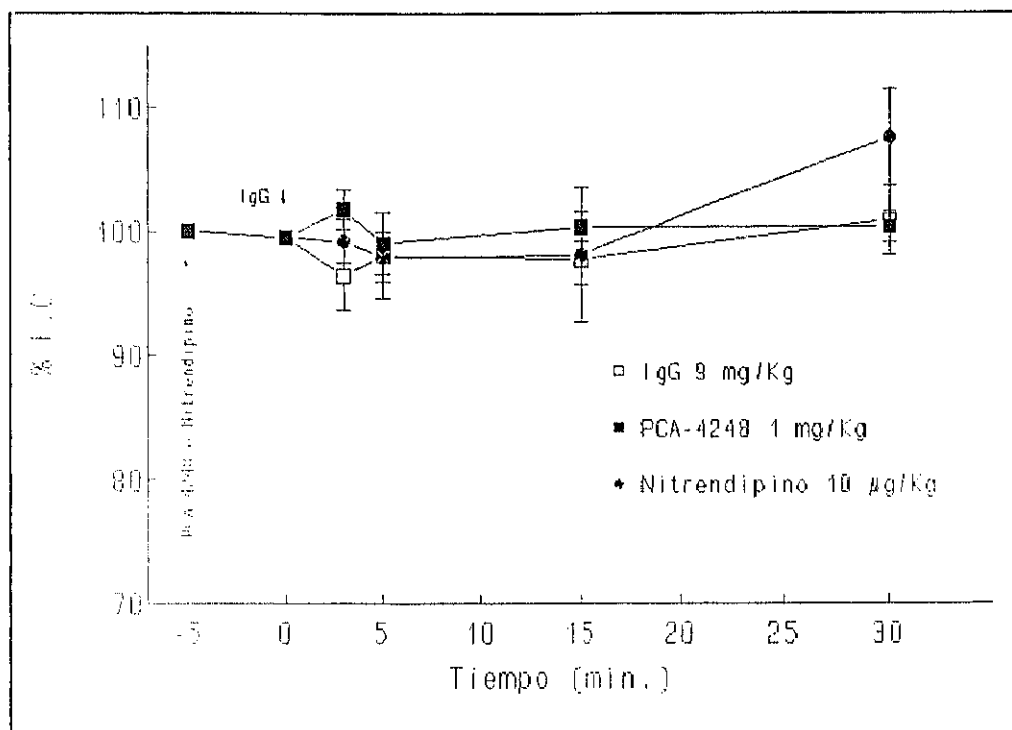


Figura 31.- Efectos del PCA-4248 y Nitrendipino sobre los cambios de la FC inducidos por inmunoagregados solubles de IgG (9 mg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abcisas, el tiempo (minutos). Cada punto representa la media \pm E.E.M. n = 6.

2.3.2. REVERSION DE LA HIPOTENSION INDUCIDA POR INMUNOAGREGADOS SOLUBLES DE IgG.

Los valores basales de PAS, PAD, PAM y FC obtenidos en rata anestesiada correspondientes al grupo del solvente (PEG-400) y PCA-4248 para dosis de 9 mg/Kg de inmunoagregados solubles de IgG se muestran en la Tabla XXV. Puede verse que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales para cada grupo de tratamiento.

	P.A.S. (mmHg)	P.A.D. (mmHg)	P.A.M. (mmHg)	F.C. (l.p.m.)
SOLVENTE	149 ± 6.5	109 ± 5.1	122 ± 4.7	445 ± 14.5
PCA-4248	153 ± 4.6	108 ± 4.3	123 ± 5.7	446 ± 11.8

Tabla XXV.- Valores basales de P.A.S., P.A.D., P.A.M. y F.C. para cada uno de los grupos experimentales en los que se analizó la reversión de la hipotensión inducida por inmunoagregados solubles de IgG (9 mg/Kg, i.v.).

Media ± E.E.M. n = 6. l.p.m. = latidos por minuto.

Cuando se obtuvo la máxima caída de presión arterial inducida por inmunoagregados solubles de IgG (al cabo de 1-2 minutos), la administración intravenosa de PCA-4248 (1 mg/Kg) revirtió la caída de la PAS de -74.2 ± 6.2 mmHg a -23.7 ± 4.5 mmHg ($p < 0.01$) y de la PAD de -58.7 ± 4.4 mmHg a -20.0 ± 3.4 mmHg ($p < 0.01$) (Figuras 32 y 33), recuperándose prácticamente el valor inicial de presión arterial a los 15 minutos de la administración del inmunoagregado de IgG. PCA-4248 no modificó la FC durante la reversión de la hipotensión (Figura 34) y el solvente (PEG-400) no modificó ninguno de los parámetros hemodinámicos antes señalados.

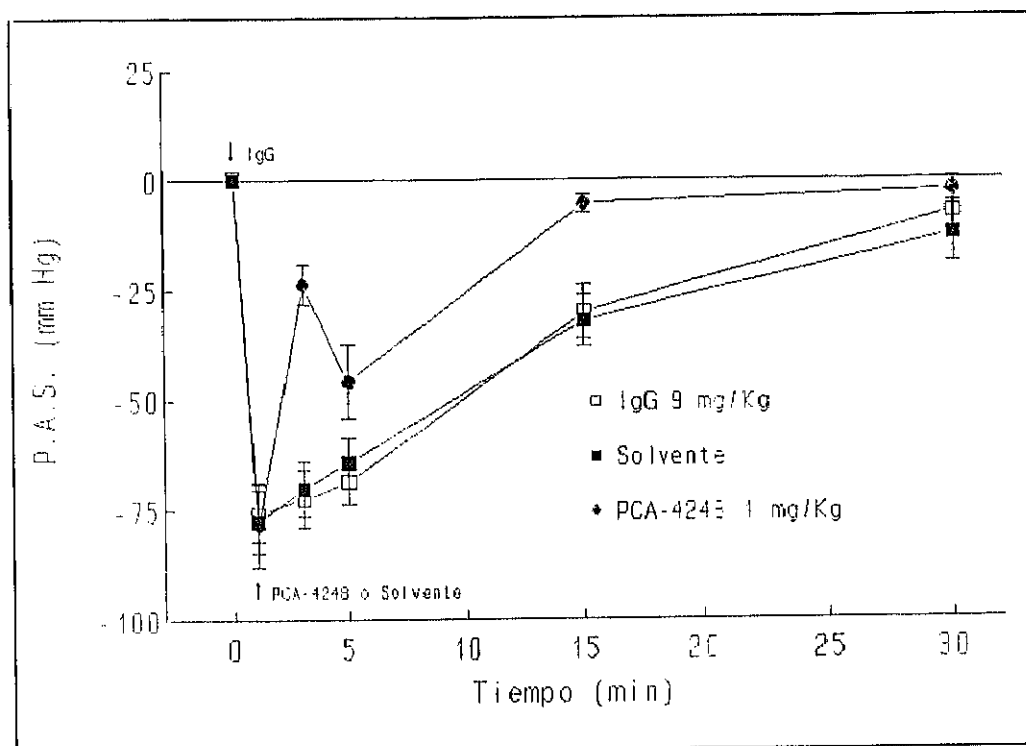


Figura 32.- Efectos del PCA-4248 sobre la reducción de la PAS inducida tras la administración de inmunoagregados solubles de IgG (9 mg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa la caída de PAS en mmHg. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

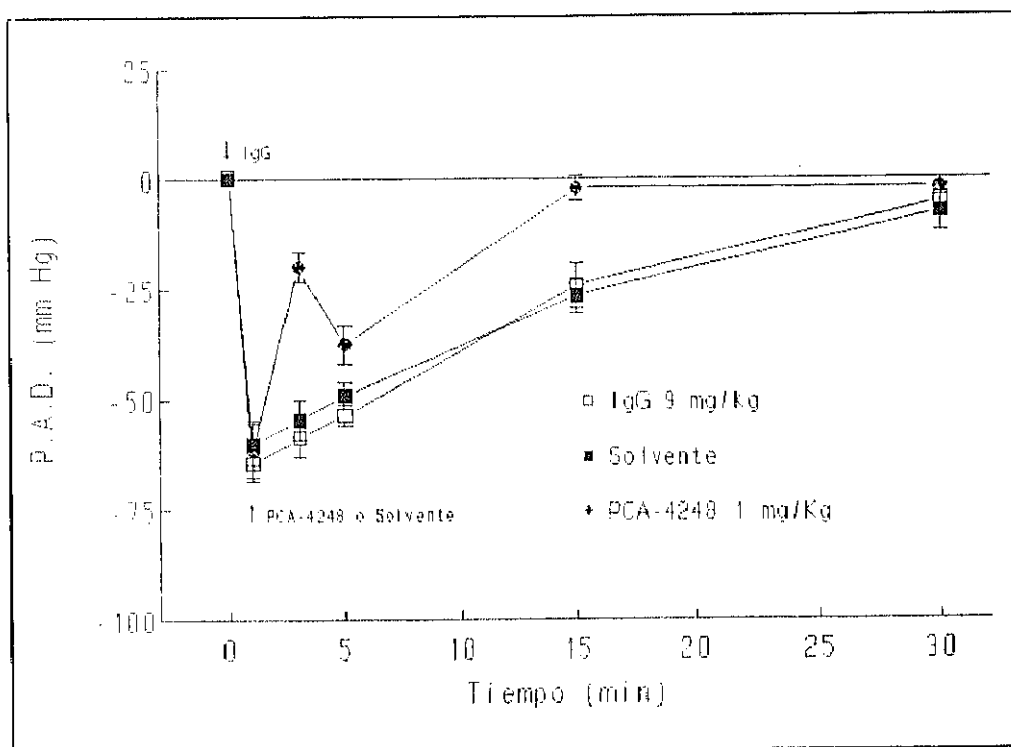


Figura 33.- Efectos del PCA-4248 sobre la reducción de la PAD inducida tras la administración de inmunoagregados solubles de IgG (9 mg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa la caída de PAD en mmHg. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n=6$.

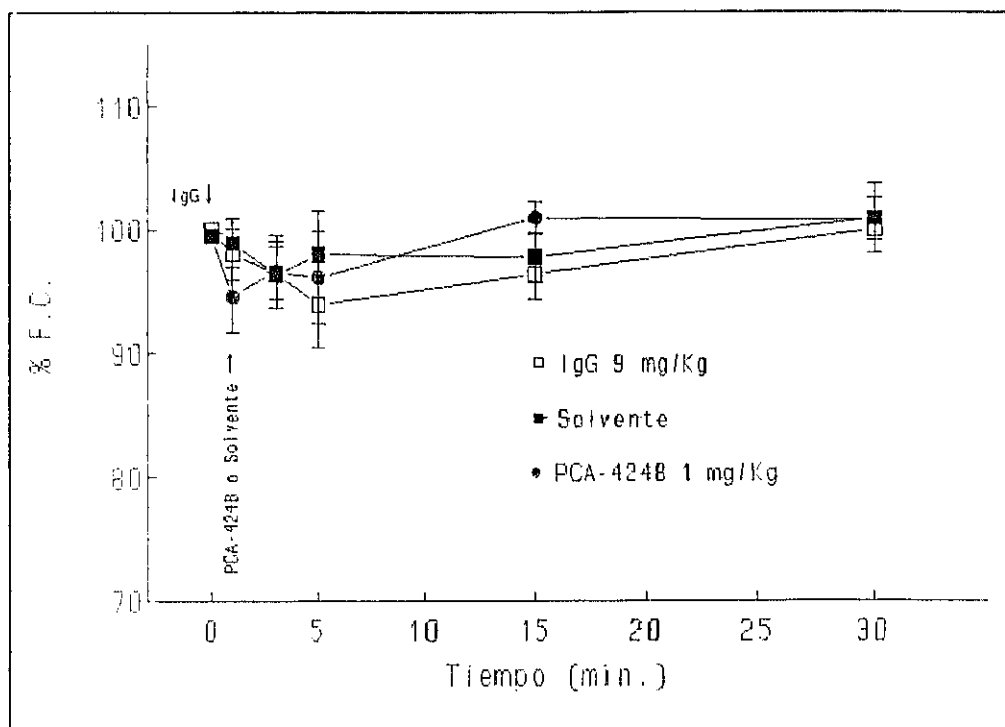


Figura 34.- Efectos del PCA-4248 sobre los cambios de la FC inducidos tras la administración de inmunoagregados solubles de IgG (9 mg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos). Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

2.3.3. SHOCK ENDOTOXICO INDUCIDO POR LIPOPOLISACARIDOS DE *Salmonella typhosa*.

Los valores basales de PAS, PAD, PAM y FC correspondientes al grupo de ratas Sham o tratadas con solvente (PEG-400) y PCA-4248 se muestran en la Tabla XXVI, no existiendo diferencias significativas entre los valores basales de cada uno de los grupos de tratamiento.

	P.A.S. (mmHg)	P.A.D. (mmHg)	P.A.M. (mmHg)	F.C. (l.p.m.)
SHAM	119 ± 4.6	74 ± 2.1	89 ± 1.3	403 ± 18.1
SOLVENTE	135 ± 3.9	81 ± 2.5	103 ± 3.9	415 ± 15.6
PCA-4248	124 ± 5.5	72 ± 2.4	89 ± 3.3	413 ± 8.8

Tabla XXVI.- Valores basales de P.A.S., P.A.D., P.A.M. y F.C. en los grupos experimentales en los que se analizó la hipotensión inducida por endotoxina de *Salmonella typhosa* (0.5 mg/Kg, i.v.).
Media ± E.E.M. n = 6. l.p.m. = latidos por minuto.

La administración intravenosa de 0.5 mg/Kg de Lipopolisacáridos de *Salmonella typhosa* produjo una lenta disminución de la PAS y PAD, que alcanzó valores máximos a los 60 minutos de su administración para la PAS (-22.5 ± 3.7%) y la PAD (-33.7 ± 2.1%), siendo la caída de la PAD más acusada que la de la PAS (Figuras 35 y 36). Este efecto hipotensor se acompañó de un aumento paralelo de la FC, a partir de los 30 minutos de su administración, alcanzándose el máximo efecto a los 90 minutos (+ 10.2 ± 2.5%). A partir de este tiempo, el incremento de FC se mantuvo o disminuyó ligeramente (Figura 37).

La administración de PCA-4248 (1 mg/Kg) a los 90 minutos de la administración del Lipopolisacárido (máxima hipotensión), produjo una recuperación significativa ($p < 0.05$) de los valores de PAS (-4.5 ± 2.5%) y PAD (-7.3 ± 3.5%), siendo este efecto más acusado y mantenido sobre la PAD y estadísticamente significativo con respecto al valor control ($p < 0.05$) (Figuras 35 y 36). Sobre el incremento de FC inducido por el shock endotóxico, PCA-4248 produjo una ligera disminución (-6.9 ± 5.1%, $p > 0.05$) de la FC al minuto de su administración. Sin embargo, después de 15 minutos, los valores de FC eran semejantes a los obtenidos antes de la administración del fármaco (Figura 37).

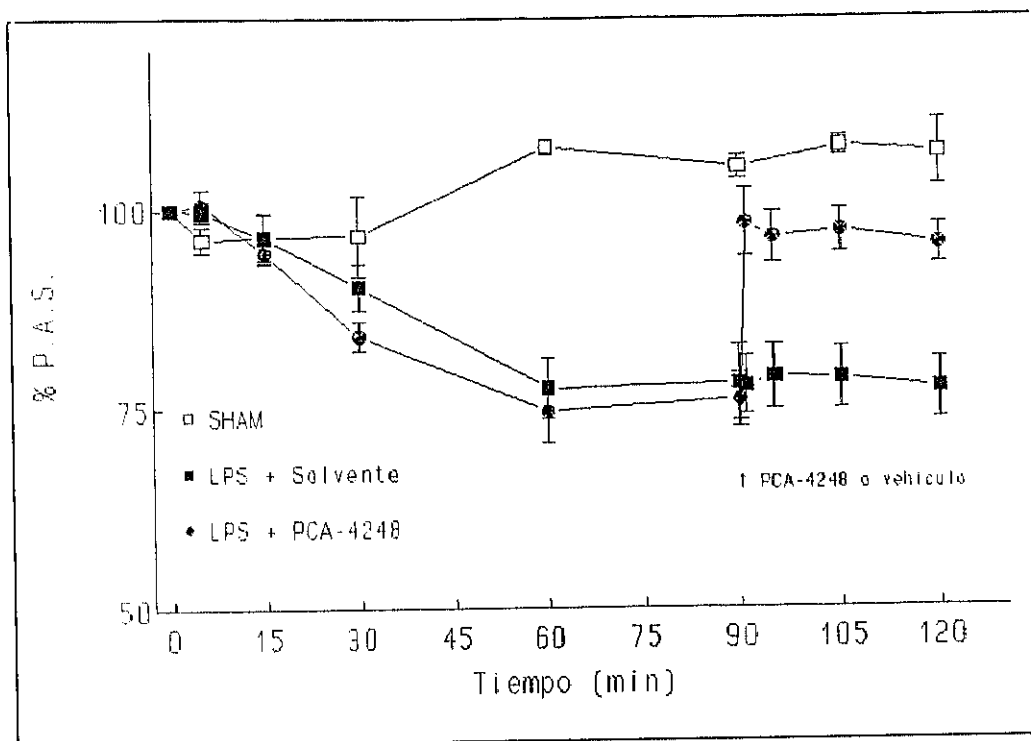


Figura 35.- Efectos del Solvente y PCA-4248 sobre la reducción de la PAS inducida por los LPS de *Salmonella typhosa* (0.5 mg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos). Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

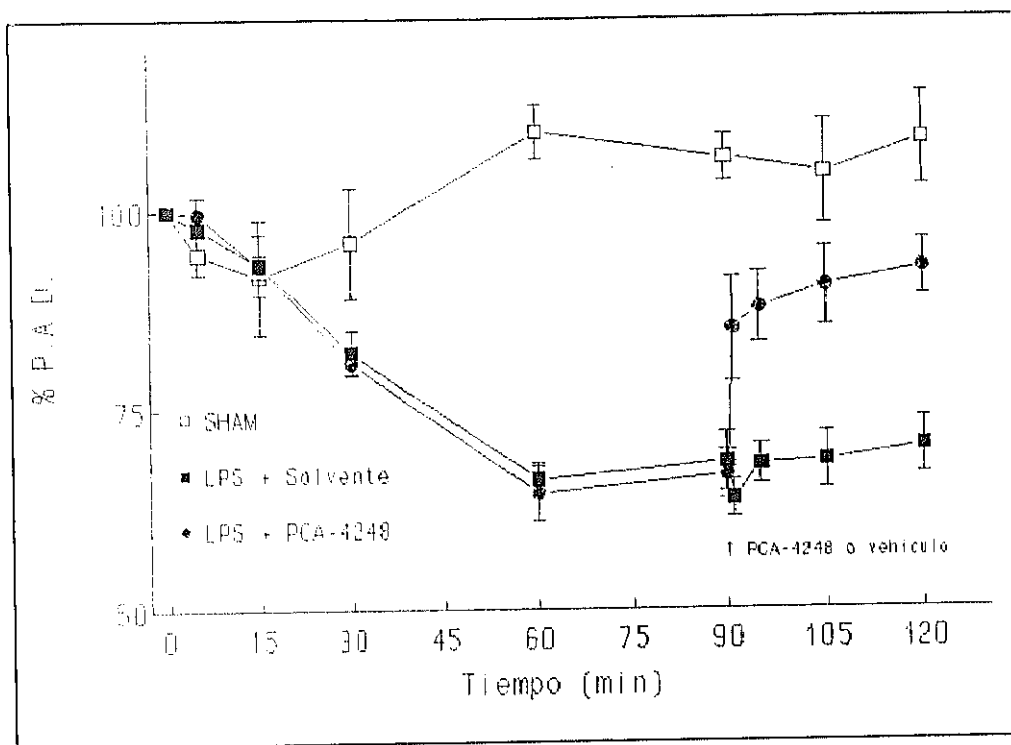


Figura 36.- Efectos del Solvente y PCA-4248 sobre la reducción de la PAD inducida por los LPS de *Salmonella typhosa* (0.5 mg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos). Cada punto representa la media \pm E.E.M. n = 6.

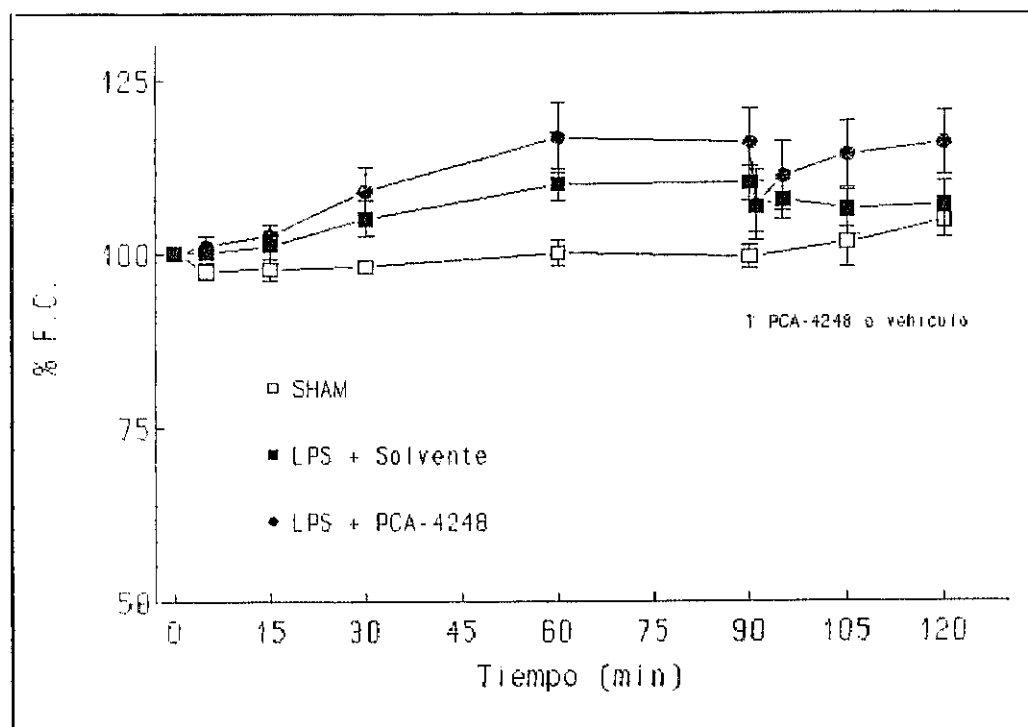


Figura 37.- Efectos del Solvente y PCA-4248 sobre los cambios de la FC producidos tras la administración de los LPS de *Salmonella typhosa* (0.5 mg/Kg, i.v.) en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos).

Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

2.3.4. SHOCK INDUCIDO POR ISQUEMIA-REPERFUSION INTESTINAL TRAS OCLUSION DE LA ARTERIA ESPLECNICA (SHOCK SAO).

Los valores basales de PAS, PAD, PAM y FC correspondientes al grupo Sham, al grupo tratado con solvente (PEG-400) y PCA-4248 se muestran en la Tabla XXVII, observándose que no hubo diferencias significativas entre los valores basales de cada uno de los grupos de tratamiento.

	P.A.S. (mmHg)	P.A.D. (mmHg)	P.A.M. (mmHg)	F.C. (l.p.m.)
SHAM	127 ± 2.3	79 ± 4.6	95 ± 3.6	405 ± 1.7
SOLVENTE	135 ± 9.4	80 ± 6.9	99 ± 7.3	410 ± 15.0
PCA-4248	129 ± 9.9	79 ± 9.3	96 ± 9.5	398 ± 10.7

Tabla XXVII.- Valores basales de P.A.S., P.A.D., P.A.M. y F.C. en los distintos grupos experimentales en los que se estudió el shock inducido por oclusión de la arteria esplénica (SHOCK SAO) en rata anestesiada.

Media ± E.E.M. n = 6. l.p.m. = latidos por minuto.

La oclusión durante 45 minutos de la arteria esplénica y mesentérica inferior en ratas que habían recibido 5 minutos antes vehículo (PEG-400, 0.1 ml/Kg), produjo un aumento inicial de la PAS y PAD (+ 23.4 ± 4.5% y + 34.9 ± 6.4%, respectivamente. $p < 0.05$), que fue disminuyendo paulatinamente durante los 45 minutos de oclusión de ambas arterias hasta alcanzar al cabo de 40 minutos los valores control. La FC disminuyó de forma progresiva a lo largo del tiempo de oclusión, siendo esta reducción del 15.8 ± 4.1% al cabo de 40 minutos. Después de 45 minutos, se retiró el clamp (reperfusión) y se observó una lenta y progresiva caída de los valores de presión arterial que condujo a la muerte del animal a partir de los 100 minutos de la oclusión. Este efecto hipotensor se acompañó de un aumento de la FC (+ 22.8 ± 11.1%) que se mantuvo hasta la muerte del animal (Figuras 38-40). Estos efectos fueron iguales a los obtenidos sin la administración del solvente.

La administración intravenosa de PCA-4248 (1 mg/Kg) 5 minutos antes de la oclusión, redujo ligeramente la elevación de la PAD y la disminución de la FC, pero no modificó los cambios inducidos por la isquemia sobre la PAS. Después de la perfusión, las ratas pretratadas con PCA-4248 presentaron una menor caída de los valores de PAS y PAD a todos los tiempos de registro (Figuras 38 y 39), prolongándose el tiempo de supervivencia ($p < 0.03$) (Tabla XXVIII) de tal forma que los animales fallecieron a partir de los 140 minutos postocclusión. Sin embargo, no se modificó el aumento de la FC, que se mantuvo hasta la muerte del animal (Figura 40).

Con respecto al tiempo medio de supervivencia, el grupo Sham sobrevivió durante todo el período de observación (240 minutos) (Tabla XXVIII); por el contrario, en el grupo tratado con el vehículo se

observó que la mortalidad en los animales ocurrió a los 110 ± 8.5 minutos y el grupo tratado con PCA-4248 tras 155 ± 6.7 minutos ($p < 0.03$) (Tabla XXVIII).

	TIEMPO POSTOCLUSION			
	1 HORA	2 HORAS	3 HORAS	4 HORAS
SHAM	6/6	6/6	6/6	6/6
SOLVENTE	6/6	4/6	0/6	0/6
PCA-4248	6/6	6/6*	4/6*	0/6

Tabla XXVIII.- Efectos del Solvente y PCA-4248 sobre el Índice de mortalidad en ratas anestesiadas tras oclusión de la arteria esplénica (SAO).

* $p < 0.03$ referido al solvente.

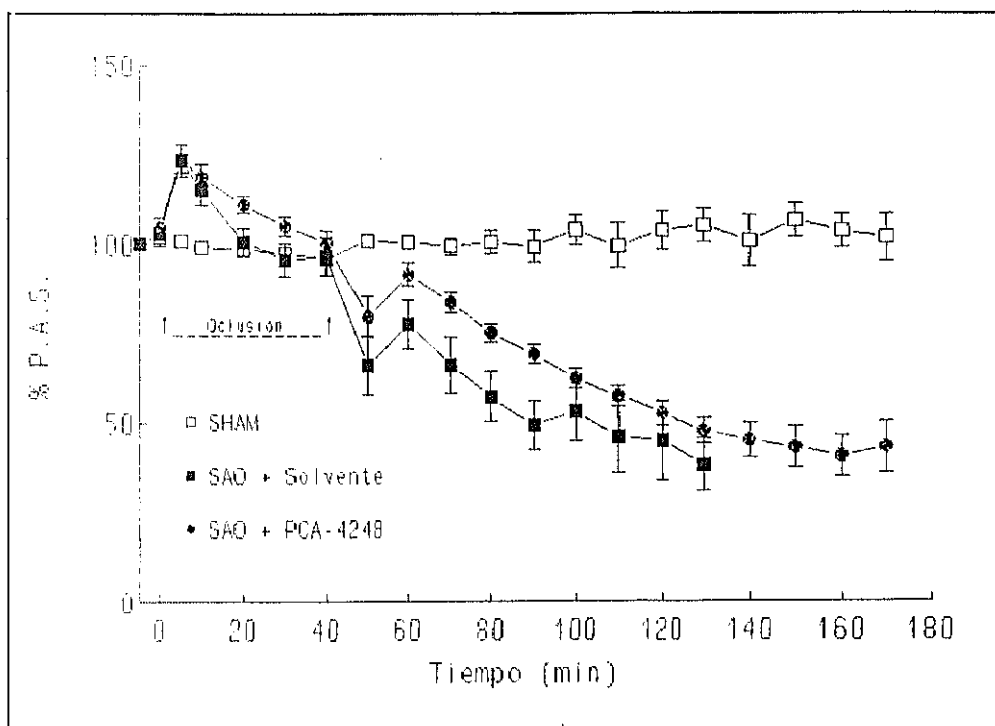


Figura 38.- Efectos del Solvente y PCA-4248 sobre la reducción de la PAS en el modelo de shock inducido por oclusión de la arteria esplénica en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos). Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

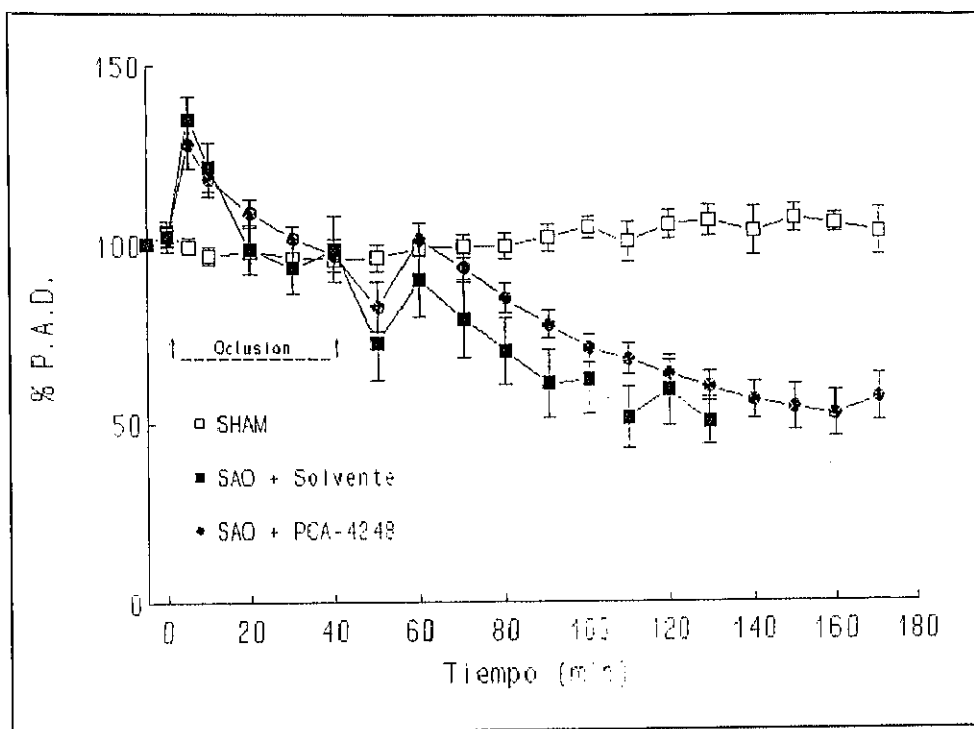


Figura 39.- Efectos del Solvente y PCA-4248 sobre la reducción de la PAD en el modelo de shock inducido por oclusión de la arteria esplénica en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos). Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

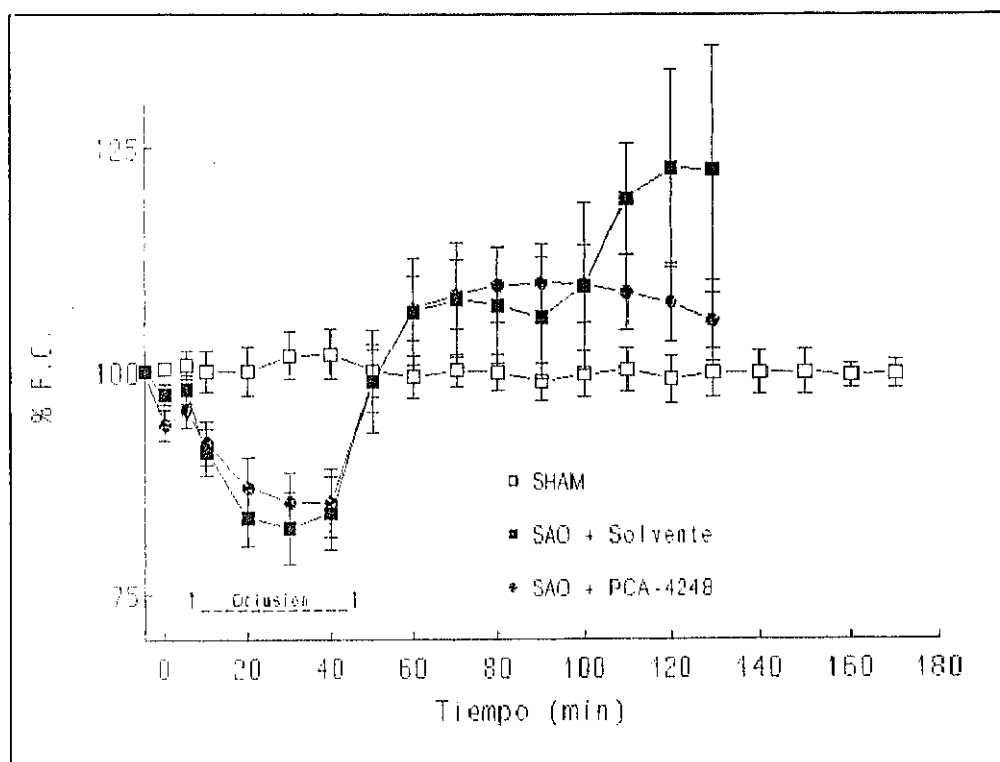


Figura 40.- Efectos del Solvente y PCA-4248 sobre los cambios de la FC en el modelo de shock inducido por oclusión de la arteria esplénica en ratas anestesiadas. En ordenadas se representa el porcentaje de cambio normalizado al valor 100%. En abscisas, el tiempo (minutos). Cada punto representa la media \pm E.E.M. $n = 6$.

DISCUSIÓN

En esta Tesis Doctoral hemos analizado los efectos de un nuevo derivado dihidropiridínico, el PCA-4248, sintetizado por los Laboratorios Alter S.A., en diversas preparaciones cardiovasculares aisladas, en ratas normotensas e hipertensas anestesiadas y en tres modelos experimentales de shock. Nuestros resultados indican que esta DHP, a diferencia de Nifedipino y Nitrendipino, carece de acciones depresoras cardíacas, lo que indica que carece de propiedades bloqueantes de los canales de Ca^{2+} . Sin embargo, a dosis altas ($> 10^{-7}\text{M}$) el PCA-4248 parece ejercer acciones bloqueantes de los canales de Ca^{2+} en preparaciones vasculares aisladas. Finalmente, nuestros hallazgos sugieren que las acciones cardiovasculares del PCA-4248 estarían relacionadas con su capacidad para antagonizar las acciones del PAF.

1. ESTUDIOS REALIZADOS IN VITRO.

1.1. EFECTOS EN PREPARACIONES AISLADAS.

En primer lugar hemos analizado los efectos del PCA-4248 en diversas preparaciones cardiovasculares, observando que:

1) Inhibe las contracciones inducidas por el KCl (35 mM) en la aorta de conejo y en la arteria coronaria de cerdo, aunque su potencia es 2-3 órdenes de magnitud inferior a la de otros bloqueantes de los canales de Ca^{2+} de la familia de las DHPs, como Nifedipino y Nitrendipino. Estas contracciones son debidas exclusivamente a la entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo-L, ya que desaparecen en un medio sin Ca^{2+} y se bloquean por bloqueantes de los canales de Ca^{2+} (Cauvin y cols, 1983; Godfraind y cols, 1986). Por tanto, a concentraciones $> 10^{-7}\text{M}$, el PCA-4248 parece ejercer una cierta actividad bloqueante de los canales de Ca^{2+} en preparaciones vasculares aisladas. Más aún, al igual que se ha descrito con otros bloqueantes de los canales de Ca^{2+} , el PCA-4248 mostraba una mayor acción inhibitoria frente a las contracciones inducidas en las arterias coronarias que en la aorta. Esta mayor selectividad ha sido atribuida (Janis y cols, 1987; Tamargo y cols, 1995) a diferencias en: a) las características fisicoquímicas (liposolubilidad, coeficiente de partición de la membrana vascular, grado de ionización), b) el origen del Ca^{2+} (en nuestro caso esta explicación no es válida ya que en ambas arterias la contracción depende de la entrada de Ca^{2+} extracelular), c) la distribución y características (isoformas) de los canales tipo-L en los distintos territorios vasculares y, muy en particular, d) en el nivel de potencial de membrana, ya que a mayor despolarización mayor predominio del estado inactivo del canal, que es por el que mayor afinidad presentan los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} (Janis y cols, 1987; Triggle, 1991a y b).

2) Inhibe las respuestas contráctiles registradas en aurículas derechas espontáneas y en aurículas izquierdas de cobaya estimuladas a la frecuencia basal de 3 Hz. Sin embargo, el efecto inotrópico negativo del PCA-4248 no se acompañaba de cambios significativos en la frecuencia sinusal, mientras que el

Nitrendipino a concentraciones $> 10^{-7}M$ producía una depresión significativa de este parámetro y a $10^{-6}M$ aparecían bloqueos sinusales en un 50% de las preparaciones. Estos resultados indicaban que el PCA-4248 se comporta a nivel cardíaco de forma distinta a otras DHPs bloqueantes de la entrada de Ca^{2+} . El hallazgo de que la respuesta contráctil podía revertirse al aumentar la $[Ca^{2+}]$ en el medio o al adicionar Isoproterenol al mismo (fármaco que aumenta la entrada de Ca^{2+} a través de canales tipo-L), sugiere que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ secundario a la entrada de Ca^{2+} revierte las acciones inotrópicas negativas del PCA-4248.

Por el contrario, el PCA-4248 no inhibe: a) las contracciones inducidas por la Noradrenalina en aortas aisladas de conejo, lo que confirmaba que carecía de propiedades bloqueantes de los receptores α -adrenérgicos. Más aún, dado que la fase rápida de estas contracciones es debida a la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares y la fase tónica a la entrada de Ca^{2+} a través de canales activados por el agonista insensibles a DHPs, podemos concluir que el PCA-4248 no inhibe ambos procesos en esta preparación. b) La respuesta cronotrópica e inotrópica positiva inducida por el Isoproterenol en aurículas aisladas de cobaya, lo que indicaba que carecía de propiedades bloqueantes de los receptores β -adrenérgicos.

En un intento de conocer si el PCA-4248 presentaba propiedades bloqueantes de los canales de Ca^{2+} , en otro grupo de experimentos, se estudió su capacidad para desplazar la fijación del $[^3H]$ -Nitrendipino en ileon aislado y en corazón aislado de cobaya. En nuestras condiciones experimentales, el PCA-4248 sólo a concentraciones $> 10^{-7}M$ inhibía la unión del radioligando a su receptor en las células musculares lisas y cardíacas, siendo su potencia 2-3 veces inferior a la del Nitrendipino. Este hallazgo confirma los resultados obtenidos en preparaciones vasculares aisladas en esta Tesis Doctoral y nos permite concluir que a concentraciones $< 10^{-7}M$ el PCA-4248 no presenta propiedades bloqueantes de los canales de Ca^{2+} .

En corazones aislados y perfundidos de rata, el PCA-4248 ($< 10^{-7}M$) producía una depresión de la contractilidad concentración-dependiente que alcanzaba valores estables al cabo de 30 minutos. Sin embargo, este efecto era significativamente menos marcado que el producido al mismo rango de concentraciones por el Nitrendipino. Cuando se analizaban los efectos de ambos fármacos sobre los parámetros que definen la velocidad de conducción intracardíaca, pudimos comprobar que ninguno de los compuestos modificaban la conducción intraauricular (intervalo St-A) o intraventricular (intervalos H-Q y Q-V). Dado que la velocidad de conducción en ambos tejidos depende de la activación de la corriente rápida de entrada de Na^+ (I_{Na}), este hallazgo concuerda con la demostración de que el PCA-4248 no modificaba la amplitud o la V_{max} de los potenciales de acción registrados en fibras musculares ventriculares de cobaya, confirmando que no inhibe la I_{Na} . Sin embargo, el Nitrendipino prolongaba la conducción a través del nodo A-V (prolonga el intervalo A-H), una estructura en la que la fase 0 del potencial de acción es debida a la activación de los canales tipo-L de Ca^{2+} . El hallazgo de que el PCA-4248 no modificaba el intervalo A-H podría tener dos posibles explicaciones: a) que el fármaco carece de efectos bloqueantes de los canales

de Ca^{2+} tipo L ó b) que este fármaco es dos órdenes de magnitud menos potente que Nifedipino y Nitrendipino para inhibir la entrada de Ca^{2+} a través de dichos canales, por lo que su acción sólo podría observarse a concentraciones superiores a las ensayadas. En este último caso, el posible interés farmacológico de su acción bloqueante de los canales de Ca^{2+} sería mínimo.

Otro hallazgo que avala esta conclusión es que el PCA-4248 no modifica la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en aurículas de cobaya incubadas en un medio que contiene 1.8 (normal) ó 3.5 mM de Ca^{2+} y estimuladas a la frecuencia de 1 Hz. Sólo en aurículas en las que la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ha sido estimulada de forma marcada (3.5 mM Ca^{2+} , frecuencia de estimulación 3 Hz) el PCA-4248 inhibe este parámetro. Por tanto, de nuevo concluimos que el papel bloqueante de los canales del Ca^{2+} no parece ser el responsable de las acciones cardíacas del fármaco.

1.2. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS.

En un primer grupo de experimentos, estudiamos los efectos del PCA-4248 sobre los potenciales de acción registrados en fibras musculares ventriculares de cobaya estimuladas a la frecuencia basal de 1 Hz. El PCA-4248 no modificaba, a ninguna de las concentraciones ensayadas, las características de la fase 0 del potencial de acción (amplitud, V_{max}) o el potencial de reposo; ello indica que el PCA-4248 no modificaba, respectivamente, ni la I_{Na} , ni la corriente de salida de K^+ que presenta rectificación interna (I_{K1}). Tampoco hemos observado cambios en la duración del tiempo de recuperación de la V_{max} , un índice de la reactivación de la I_{Na} . El PCA-4248 no modificaba la duración del potencial de acción (DPA) medida tanto al 50% como al 90% de repolarización, el período refractario efectivo (PRE) o el cociente PRE/DPA. Esta falta de efectos sobre la DPA podría deberse a que este fármaco ejerce efectos contrapuestos sobre las corrientes iónicas de entrada (de Na^+ o de Ca^{2+}) y de salida de K^+ que regula la repolarización ventricular. Sin embargo, esta hipótesis deberá ser confirmada en estudios directos de estas corrientes iónicas en miocitos cardíacos utilizando la técnica del parche de membrana.

Con el fin de conocer si el PCA-4248 modifica la corriente lenta de entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo-L de las células cardíacas ($I_{\text{Ca,L}}$), analizamos sus efectos en músculos papilares perfundidos con Tyrode hiperpotásico (27 mM K^+). Ello despolarizaba el potencial de membrana hasta -43.8 ± 1.7 mV, lo que inactivaba la I_{Na} y hacía inexcitables las fibras ventriculares. En estas condiciones, el Isoproterenol es capaz de inducir la aparición de potenciales de acción Ca^{2+} -dependientes, cuando las fibras se estimulaban a la frecuencia basal de 0.12 Hz. El PCA-4248 no modificaba ninguno de los parámetros que definen las características de los potenciales de acción lentos cardíacos, lo que de nuevo nos permite afirmar que el fármaco carece de propiedades bloqueantes de los canales de Ca^{2+} a frecuencias cardíacas lentas. Estos resultados nos permiten además explicar por qué el PCA-4248 no modificaba la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en aurículas de cobaya estimuladas a 1 Hz. Además, el hecho de que el PCA-4248 no inhiba los potenciales de acción lentos inducidos por el Isoproterenol nos confirma que carece de propiedades

bloqueantes de los receptores β -adrenérgicos cardíacos.

Para confirmar estos resultados, realizamos otros dos diseños experimentales. En primer lugar se indujeron potenciales de acción lentos con otros fármacos que aumentan la entrada de Ca^{2+} a través de canales tipo-L (histamina) o que bloquean de forma selectiva la salida de K^+ a través de la membrana cardíaca (tetraetilamonio). En ambas situaciones, pudimos demostrar que el PCA-4248 tampoco modificaba estos potenciales de acción lentos. En una segunda aproximación se generaron potenciales lentos con Isoproterenol y comprobamos que éstos podían suprimirse con Verapamilo ($5 \times 10^{-6}\text{M}$) o en presencia de una solución de Tyrode que contenía 0.45 mM Ca^{2+} .

1.2.1. EFECTOS DEL PCA-4248 SOBRE LOS CAMBIOS ELECTROFISIOLÓGICOS INDUCIDOS POR EL PAF EN FIBRAS MUSCULARES VENTRICULARES.

Estudios previos han demostrado que el PCA-4248, a pesar de ser una DHP, presenta como principal efecto farmacológico una actividad antagonista del receptor del PAF (Sunkel y cols, 1990). Este compuesto inhibe de forma concentración-dependiente la agregación plaquetaria y la liberación de ATP y serotonina inducidas por el PAF en plaquetas de conejo, sin modificar la agregación plaquetaria inducida por otros agonistas como ADP, trombina, colágena o ácido araquidónico (Sunkel y cols, 1990), lo que indica que el PCA-4248 actúa específicamente bloqueando los efectos del PAF. También bloquea de forma concentración-dependiente la agregación de plaquetas humanas (Ortega y cols, 1990) y, en estudios de desplazamiento de la unión de [^3H]-PAF a su receptor en plaquetas de conejo y humanas, el PCA-4248 bloquea de manera concentración-dependiente la unión del PAF a su receptor con una K_i en el rango nanomolar, similar al de otros antagonistas del receptor del PAF (Hwang, 1990).

A nivel cardíaco, el PAF-acéter no modifica la amplitud o la V_{max} del potencial de acción, ni el potencial de reposo ventricular, pero sí acorta la duración del potencial de acción medido tanto al 50% como al 90% de repolarización (Camussi y cols, 1984a; Levi y cols, 1984; Tamargo y cols, 1985; Robertson y cols, 1988). Nosotros hemos comprobado la actividad PAF-antagonista del PCA-4242, a nivel cardíaco, donde el PCA-4248 (10^{-8}M) revirtió el acortamiento en la duración del potencial de acción inducido por el PAF. Puesto que a esta concentración el PCA-4248 carece de efectos típicos bloqueantes de los canales de Ca^{2+} , este resultado parece confirmar su actividad antagonista del receptor del PAF.

2. ESTUDIOS REALIZADOS IN VIVO.

Los resultados obtenidos en los modelos experimentales en animal entero utilizados en esta Tesis confirman los resultados descritos en el apartado anterior. El PCA-4248, administrado por vía intravenosa a ratas normotensas, no presentó ningún efecto sobre la PAS, la PAD o la frecuencia cardíaca; por el contrario, en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), el PCA-4248 produjo una ligera, aunque significativa disminución de la presión arterial y una reducción no significativa de la frecuencia cardíaca. Nitrendipino en ambos modelos (ratas normotensas y SHR) produjo una marcada disminución de la presión arterial y frecuencia cardíaca de forma dosis-dependiente, siendo este efecto también más acusado en las SHR. De nuevo se demuestra en ambos modelos que los efectos hemodinámicos del PCA-4248 son mínimos y bien distintos de los descritos con la mayoría de las DHPs bloqueantes de los canales de Ca^{2+} , lo que de nuevo sugiere que no presenta la actividad típica de los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} . La mayor efectividad del Nitrendipino en SHR podría deberse a: a) que el potencial de membrana de las células vasculares de las SHR es menos negativo que el registrado en ratas normotensas (Mackay y Cheung, 1988) por lo que predomina el estado I del canal tipo-L, que es por el que mayor afinidad presentan las DHPs (Bean y cols, 1984), b) en las células musculares lisas vasculares de las SHR aumenta la concentración de Ca^{2+} libre citosólico, como consecuencia de un aumento en la densidad y en el tiempo de apertura de los canales de Ca^{2+} tipo-L (Godfraind y cols, 1991)

La administración i.v. de PAF producía una rápida y marcada reducción de la PAS y de la PAD, que se acompañaba de un aumento de la frecuencia cardíaca. En esta Tesis Doctoral, el efecto PAF-antagonista del PCA-4248 ha sido analizado en ratas anestesiadas. Cuando se administraba 5 minutos antes de la infusión del PAF, el PCA-4248 redujo de forma dosis-dependiente la hipotensión sistémica inducida por el PAF (estudios de protección) y revirtió de forma muy rápida la respuesta hipotensora del PAF (estudios de reversión). Resultados semejantes han sido descritos con diferentes antagonistas específicos del receptor del PAF, tales como el BN 52021 (Sánchez Crespo y cols, 1985; Baranes y cols, 1986), el L-652,731 (Doebber y cols, 1986) y el CV-6209 (Yamanaka y cols, 1992). Dado que el efecto hipotensor del PAF está mediado, principalmente, a través de la unión a receptores específicos, nuestros resultados sugieren que el efecto de protección y de reversión del PCA-4248 de la hipotensión inducida por PAF podrían ser la consecuencia del bloqueo de dichos receptores. Nuestros resultados, sin embargo, no permiten descartar un efecto del PCA-4248 sobre la transducción de la señal celular.

El efecto hipotensor del PAF fue más acusado sobre la PAS que sobre la PAD, lo que puede ser atribuido a un mayor efecto deletéreo directo del PAF sobre la función cardíaca (Deavers y cols, 1991). En preparaciones cardíacas aisladas, el PAF produce una disminución de la fuerza contráctil miocárdica de diferentes especies animales (Camussi y cols, 1983; Tamargo y cols, 1985; González-Morales, 1987; Tamargo y González-Morales, 1990; Díez y cols, 1990), deprime la conducción A-V (Levi y cols, 1984;

González-Morales, 1987) y disminuye el flujo coronario al aumentar las resistencias coronarias (Levi y cols, 1984; Tamargo y González-Morales, 1990). A la reducción de la PAD contribuyen la vasodilatación periférica y el aumento de la permeabilidad vascular inducidos por el PAF; ello da lugar a la disminución del volumen sanguíneo y, por consiguiente, a la reducción del retorno venoso y de la precarga (Sánchez Crespo y cols, 1982). Además, el PAF aumenta la liberación de mediadores endógenos y sustancias vasoactivas tales como TXA_2 , serotonina, PGs y LTs, que también aumentan la permeabilidad vascular (Feuerstein y Goldstein, 1987). Por tanto, la hipotensión sistémica inducida por el PAF podría ser debida a la combinación de sus acciones cardíacas y vasculares directas (Deavers y cols, 1991), así como a la liberación de mediadores endógenos. El aumento de la frecuencia cardíaca, sin embargo, parece deberse a la activación refleja de mecanismos compensatorios en respuesta a su marcado efecto hipotensor.

El Nitrendipino también mostró un efecto protector sobre la hipotensión inducida por el PAF, aunque mucho menos acusado que el obtenido por el PCA-4248. Algunos bloqueantes de los canales del Ca^{2+} bloquean los receptores del PAF, antagonizando sus efectos sobre la agregación plaquetaria (Coeffier y cols, 1983) y la contracción del músculo liso vascular (Camussi y cols, 1983), a la vez que en estudios de fijación de radioligandos desplazan al ^3H -PAF de sus puntos de unión (Tuffin y Wide, 1985; Valone, 1987); por ello, este tipo de compuestos fueron incluidos en la larga lista de antagonistas del receptor del PAF (Braquet y cols, 1987). El efecto PAF-antagonista de los fármacos bloqueantes de los canales de Ca^{2+} ha sido explicado por:

- Un antagonismo, competitivo o no competitivo, sobre el receptor del PAF en el tejido vascular y cardíaco o por su posible unión a algún sitio del receptor asociado al canal de Ca^{2+} (Wade y cols, 1986; Valone, 1987; Alloatti y cols, 1987), y que produciría una alteración conformacional del receptor del PAF.
- Un efecto alostérico sobre el receptor del PAF, de tal modo que modificaría la unión del PAF a su receptor y, por consiguiente, su respuesta biológica (Winslow, 1987).
- Su actividad inhibitoria sobre el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el PAF, que es necesario para que el PAF pueda desencadenar sus efectos biológicos (Avdonin y cols, 1988).

Puesto que el PCA-4248 a dosis altas parece presentar un ligero efecto bloqueante de los canales de Ca^{2+} , su efecto inhibitor sobre la respuesta hipotensora inducida por el PAF sería la resultante de su actividad específica como antagonista del receptor del PAF, aunque no se puede descartar que, a dosis elevadas, sus efectos podrían deberse, en parte, a su acción bloqueante de los canales de Ca^{2+} .

3. MODELOS DE SHOCK.

Los resultados obtenidos con el PCA-4248 en los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* demuestran que es un compuesto con actividad dual (PAF-antagonista y bloqueante de los canales de Ca^{2+}), y dado que el PAF parece participar en la fisiopatología del shock (Terashita y cols, 1985; Doebber y cols, 1986; Wallace y cols, 1987; Chang y cols, 1987; López Díez y cols, 1989; Mózes y cols, 1991), nuestro trabajo se centró en estudiar el posible efecto beneficioso del PCA-4248 en tres modelos de shock:

- 3.1. Shock inducido por inmunoagregados solubles de IgG.
- 3.2. Shock endotóxico inducido por LPS de *Salmonella typhosa*.
- 3.3. Shock inducido por isquemia-reperusión intestinal (Shock SAO).

Mientras que el primer modelo de shock es PAF-dependiente, en la etiopatogenia de los otros dos modelos de shock no solamente está implicado el PAF, sino también otros mediadores inflamatorios, así como mecanismos de amplificación, de protección o "downregulación" y de la activación de la respuesta o "priming" que modulan la respuesta de los mediadores endógenos que intervienen en el cuadro de shock (Sanchez-Crespo y cols, 1985; Sanchez-Crespo y Fernandez Gallardo, 1991; Zimmerman y Ringer, 1992; Koltai y cols, 1993; Koltai y cols, 1994).

3.1. SHOCK INDUCIDO POR INMUNOAGREGADOS SOLUBLES DE IgG.

La administración intravenosa de inmunoagregados solubles de IgG en ratas anestesiadas produjo una importante caída de la PAS y de la PAD, muy similar a la obtenida tras la infusión de PAF, que se recuperaba paulatinamente en los siguientes 30 minutos. Esta respuesta se acompañaba de una extravasación de plasma rico en proteínas e infiltración leucocitaria, que son la consecuencia de la activación de diferentes tipos celulares, de la activación del sistema del complemento y de la liberación de mediadores endógenos, tales como eicosanoides, PAF, IL-1 y anafilotoxinas (Sánchez Crespo y cols, 1988). La estimulación de la liberación de PAF por los inmunoagregados solubles de IgG ocurre de forma tiempo- y dosis-dependiente en órganos ricos en leucocitos mononucleares, hígado y bazo de conejo y ratón (Camussi y cols, 1982; Iñarrea y cols, 1984b; Doebber y cols, 1986). Dicha liberación de PAF ocurre también en las reacciones anafilácticas (Pinckard y cols, 1977), en la enfermedad del suero del conejo (Camussi y cols, 1982) y en la sepsis por gérmenes gram negativos (Iñarrea y cols, 1985; Handley y cols, 1986). La administración de antagonistas específicos del receptor del PAF tales como el BN 52021 (Sánchez Crespo y cols, 1985), el L-652,731 (Doebber y cols, 1986) y el SRI-63072 (Handley y cols, 1986) han demostrado un efecto beneficioso en este modelo de shock experimental, lo que confirma la implicación del PAF en su etiopatogenia.

Al igual que ocurrió en las curvas de hipotensión inducida por PAF exógeno, el efecto hipotensor de los inmunoagregados solubles de IgG fue más acusado sobre la PAS que sobre la PAD, probablemente debido a la acción directa del PAF endógeno sobre la función cardíaca; sin embargo, este efecto hipotensor observado tras la administración de los inmunoagregados fue más duradero que el obtenido con el PAF exógeno (Sánchez Crespo y cols, 1985; 1988). Además, cuando se comparan las curvas del efecto hipotensor obtenido por la administración exógena de PAF y la obtenida por IgG, se observa que con los IgG se requieren unos 2-3 minutos para alcanzar el efecto máximo, mientras que cuando se infunde PAF sintético, la respuesta es inmediata, probablemente debido a que tras la estimulación con IgG se precisa de un tiempo para que se genere el mediador secundario y, en consecuencia, se produzca la respuesta biológica (Sánchez Crespo y cols, 1988; Fernández-Gallardo y cols, 1990); Lo podría explicar también la mayor duración de la hipotensión sistémica inducida por los IgG.

El pretratamiento por 5 minutos con PCA-4248 reducía la hipotensión inducida por los inmunoagregados solubles de IgG (estudios de protección); igualmente, cuando se administraba, una vez que la acción hipotensora de los inmunoagregados había alcanzado su efecto máximo, aceleraba de forma clara la recuperación de los niveles basales tensionales (estudios de reversión). Puesto que ha sido descrito que en este tipo de shock experimental el PAF es el principal mediador liberado y que muchos de los efectos biológicos encontrados tras la administración de los inmunoagregados de IgG, tales como la hipotensión, la extravasación plasmática ó la hiperfibrinólisis están mediados vía generación de PAF (Sánchez Crespo y cols, 1985; Doebber y cols, 1986; Fernández-Gallardo y cols, 1988), el efecto protector del PCA-4248 podría ser atribuido a su actividad antagonista del receptor del PAF. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fernández-Gallardo y cols (1990) y apoyan la teoría de que el PAF generado endógenamente participa en la mediación de la respuesta inducida por otros agentes con potencial patogénico, como los IgG y endotoxinas bacterianas.

El Nitrendipino, al igual que en la hipotensión inducida por PAF, también produjo un ligero efecto protector de la hipotensión inducida por los inmunoagregados solubles de IgG. Dicho efecto podría ser explicado por la actividad PAF-antagonista que presentan los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} .

Dado que el PCA-4248 también presenta a altas dosis una cierta actividad bloqueante de los canales de Ca^{2+} , el efecto protector y de reversión producido por este compuesto en este modelo de shock experimental podría ser el resultado de la combinación de su actividad PAF-antagonista junto con su actividad bloqueante de los canales de Ca^{2+} . De este modo, actuaría directamente sobre el receptor del PAF, podría inhibir su liberación y la de otros mediadores endógenos que cooperarían en la hipotensión y extravasación plasmática y, además, podría reducir la $[Ca^{2+}]_i$, evitando que se desencadene la respuesta biológica mediada por el PAF.

3.2. SHOCK ENDOTOXICO INDUCIDO POR LPS DE SALMONELLA TYPHOSA.

La sepsis bacteriana es una de las principales causas de shock (Thiemerman, 1994). El shock endotóxico se caracteriza por fiebre, hipotensión, hiporreactividad a agentes vasoconstrictores endógenos y exógenos, disfunción miocárdica, permeabilidad vascular, alteraciones en la distribución del flujo sanguíneo y en la extracción del oxígeno celular. Todos estos factores conllevan al fallo orgánico múltiple y a la muerte celular (Parke y cols, 1987).

Los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) son un potente estímulo inflamatorio para el huésped e inducen la liberación de mediadores humorales y celulares, tales como el PAF, TNF_{α} , IL-1, eicosanoides, sistema del complemento y opioides, que son los responsables de las alteraciones en las funciones celulares, metabólicas y fisiológicas y de los mecanismos que componen el cuadro clínico del shock endotóxico (Zimmerman y Ringer, 1992). La gravedad del shock depende de la vía de administración, de la dosis utilizada y de la especie animal (Koltai y cols, 1993). Las endotoxinas de *E. coli* y *S. typhosa* y *enteriditis* son las más comunmente utilizadas en este modelo de shock y, aunque las dosis utilizadas y los efectos obtenidos con ambos tipos de endotoxinas son muy similares, la de *E. coli* es la más rápida y potente, ya que su efecto hipotensor aparece a los 5-10 minutos de su infusión, mientras que la endotoxina de *S. typhosa* produce su hipotensión máxima a los 60-90 minutos de su administración (Terashita y cols, 1985; Li y cols, 1991; Siegfried y cols, 1992; Hogaboam y cols, 1992; Squadrito y cols, 1992; Hom y cols, 1995).

La administración intravenosa de los LPS de *S. typhosa* produjo una paulatina disminución de la PAS y de la PAD, que alcanzó su efecto máximo a los 60 minutos de su infusión. Este efecto hipotensor fue más acusado sobre la PAD que sobre la PAS, al contrario que lo que ocurría en las curvas de PAF y en el shock inducido por los inmunoagregados solubles de IgG y se acompañaba de un aumento en la frecuencia cardíaca. Este hecho podría ser atribuido a una importante vasodilatación periférica y a un acusado aumento de la permeabilidad inducidos no solamente por el PAF, sino por la liberación de otros mediadores endógenos tales como TNF_{α} , IL-1 y eicosanoides que contribuirían a la disminución del volumen sanguíneo y, por tanto, a la reducción del retorno venoso (Sánchez Crespo y cols, 1991).

Nuestros resultados demuestran que el PCA-4248, administrado intravenosamente en el momento de máxima hipotensión, revierte de forma inmediata los cambios hemodinámicos inducidos por la endotoxina. Además, reducía el aumento de la frecuencia cardíaca producido por los LPS. El efecto beneficioso del PCA-4248 en este modelo de shock podría ser debido a:

- a) Su actividad antagonista del receptor del PAF. Se ha demostrado que la hipotensión sistémica y la extravasación plasmática producidas tras la administración de los LPS bacterianos está mediada, al menos en parte, a través de un aumento de la síntesis y

liberación de PAF (Doebber y cols, 1985; Etienne y cols, 1986; Chang y cols, 1987; Handley y cols, 1988; López Díez y cols, 1989), que se acompaña de una disminución del volumen minuto, de las resistencias vasculares sistémicas y de la perfusión tisular y de leucopenia, trombocitopenia e hipoglucemia (Mózes y cols, 1991); de hecho, estas manifestaciones coinciden con el nivel máximo de liberación del PAF, que se alcanza a los 30-45 minutos de la infusión de los LPS (Klosterhalfen y cols, 1992). Puesto que el PCA-4248 inhibe la extravasación plasmática inducida por los LPS de *E. coli* (Fernández-Gallardo y cols, 1990) y revierte casi por completo la hipotensión sistémica inducida por los LPS de *S. typhosa*, y ambos efectos son debidos a la liberación de PAF, parece probable que su efecto beneficioso, en el shock endotóxico, sea la consecuencia de su actividad antagonista del receptor del PAF. Efectos similares han sido observados con otros antagonistas específicos del PAF, tales como la Kadsurenona, el BN 52021 y el BN 52731 (Doebber y cols, 1985; Rabinovici y cols, 1990; Mózes y cols, 1991).

- b) El TNF_α es también un importante mediador del shock endotóxico. Esta citocina es secretada por los macrófagos activados por la endotoxina u otros agentes como el PAF y los LTs (Mathison y cols, 1988; Sun y Hsueh, 1988; Huber y cols, 1988). La infusión de TNF_α humano recombinante reproduce los efectos deletéreos de la endotoxina (Tracey y cols, 1986) y, además, se han encontrado niveles plasmáticos elevados de TNF_α en pacientes con shock séptico, que se correlacionan con la gravedad de la enfermedad (Cannon y cols, 1990). El TNF_α también estimula la liberación de otros mediadores del shock endotóxico (PAF, IL-1 y PGs) y aumenta la adherencia de los PMNs activados por los LPS al endotelio vascular, aumentando la producción de radicales libres derivados del oxígeno que dañarían la célula endotelial a través de la desnaturalización de proteínas, la peroxidación lipídica y la degradación de la matriz intersticial, lo que facilita el paso de sustancias a través de las células endoteliales y contribuye al estado de shock (Herbert y cols, 1991; Siegfried y cols, 1992). La peroxidación de la membrana plasmática podría favorecer la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular o la oxidación de lipocortinas, lo que daría lugar a la activación de enzimas implicadas en la biosíntesis del PAF y, por tanto, a la liberación de PAF endógeno (Alloatti y cols, 1994). Aunque nosotros no hemos estudiado la actividad anti- TNF_α del PCA-4248, trabajos realizados por otros autores han demostrado que este compuesto es capaz de inhibir el acúmulo de seroalbúmina bovina marcada (^{125}I -BSA) tras la administración intradérmica de TNF_α y de reducir en un 40% la mortalidad inducida en ratones tras la inyección intravenosa del TNF_α (Fernández-Gallardo y cols, 1990; Emling, 1993), lo que sugiere un posible efecto anti- TNF_α del fármaco. Este efecto podría contribuir a mejorar las alteraciones inducidas por los LPS, ya que se ha demostrado que los antagonistas del PAF que disminuyen la liberación del TNF_α , como el L-659,989 y el BN 50739, mejoran la supervivencia y los cambios inducidos por los LPS

(Rabinovici y cols, 1990; Zingarelli y cols, 1992).

- c) Algunos bloqueantes de los canales de Ca^{2+} como Nifedipino, Nitrendipino, Nivaldipino, Diltiazem y Verapamilo protegen del fallo cardiovascular y prolongan el tiempo de supervivencia en varios modelos de shock endotóxico (Sakaguchi y cols, 1984; Bosson y cols, 1985; Lee y Lum, 1986; Lee y cols, 1989). Esta acción protectora se ha relacionado con: 1) la inhibición del aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular que aparece como consecuencia de su entrada desde el medio extracelular (Sakaguchi y cols, 1984; Sayeed y Maitra, 1987; Maitra y Sayeed, 1987); 2) la prevención del fenómeno de coagulación intravascular diseminada (Lee y cols, 1989) y 3) la protección de la isquemia miocárdica o intestinal, un efecto también relacionado con la disminución de la concentración intracelular de Ca^{2+} libre (Bosson y cols, 1985). Dado que a dosis altas el PCA-4248 presenta una ligera actividad bloqueante de los canales de Ca^{2+} , es posible que parte del efecto beneficioso de este compuesto en el shock endotóxico pudiera relacionarse con una inhibición de la entrada de Ca^{2+} a la célula muscular cardíaca y vascular.
- d) En los últimos años, se ha dado una especial relevancia a la participación del NO en la endotoxemia. Este potente agente vasodilatador es sintetizado por el enzima NO sintasa inducible (μNOS) en macrófagos, PMNs, hepatocitos humanos, miocitos y células endocárdicas ventriculares en respuesta a LPS, TNF_α , IL-1 y γ -interferón, todos ellos mediadores endógenos implicados en el shock endotóxico (Schultz y cols, 1992; Szabó y cols, 1993; Smith y cols, 1993; Hom y cols, 1995). La producción de NO contribuye a la hipotensión, hiporreactividad a agentes vasoconstrictores, disfunción miocárdica y, en consecuencia, a la letalidad del shock. Además, se ha descrito que algunos bloqueantes de los canales de Ca^{2+} , como Nifedipino y Amlodipino, son capaces de prevenir la inducción de la μNOS y, por tanto, de mejorar las alteraciones hemodinámicas producidas por la endotoxemia (Szabó y cols, 1993; Salomone y cols, 1995). Dado que nosotros no hemos mantenido la endotoxemia durante 6-8 horas, período necesario para la inducción del enzima y la actividad bloqueante de los canales de Ca^{2+} del PCA-4248 aparece sólo a dosis elevadas, no podemos afirmar que el efecto beneficioso del fármaco este relacionado con su capacidad para inhibir la inducción de la μNOS . Sin embargo, por su posible actividad anti- TNF_α , el PCA-4248 sí podría tener un posible efecto inhibitorio sobre la inducción de dicho enzima en los macrófagos, células que secretan TNF_α y sintetizan μNOS .

Por tanto, el efecto beneficioso producido por el PCA-4248 en el shock endotóxico sería la consecuencia de su actividad antagonista del PAF y del TNF_α , que son mediadores endógenos íntimamente implicados en la endotoxemia. A través de este efecto dual, el PCA-4248 podría aumentar la supervivencia e inhibir los cambios hemodinámicos inducidos por los LPS y la liberación de otros mediadores (IL-1, PGs

y radicales libres derivados del oxígeno) que agravan el cuadro clínico del shock. Ya que el PAF y el TNF_{α} participan en los mecanismos moduladores del shock, el PCA-4248 podría suprimir el proceso de amplificación y de " priming " que aumentan la respuesta biológica, contribuyendo a mejorar el estado de shock. Además de este efecto dual, el PCA-4248 presenta una ligera actividad bloqueante de los canales de Ca^{2+} que podría también contribuir a atenuar los cambios hemodinámicos producidos en el shock.

3.3. SHOCK INDUCIDO POR ISQUEMIA-REPERFUSION INTESTINAL (SHOCK SAO).

El shock SAO es una forma severa de shock producido por la oclusión y posterior reperfusión de las arterias celíacas y mesentéricas superior e inferior que perfunden al páncreas, hígado e intestino. Este modelo de shock se caracteriza por un aumento de la presión arterial durante la isquemia y por una marcada disminución de la presión arterial durante la reperfusión, que se acompaña de un aumento en la frecuencia cardíaca y una elevada mortalidad (Sturniolo y cols, 1988).

En la fisiopatología de este modelo experimental de shock intervienen diversos factores, tales como el daño de la mucosa intestinal, alteraciones en la función microvascular del intestino, dando lugar a un aumento de la permeabilidad vascular, liberación local de hidrolasas lisosomales, aumento de la proteólisis, pérdida del fluido intravascular y edema tisular (Heglund y Lundgren, 1978). También existe una disminución en la actividad del sistema retículoendotelial, disfunción endotelial, disminución en la actividad de los macrófagos y PMNs y una importante liberación de mediadores endógenos, incluyendo radicales libres derivados del oxígeno, TXA_2 , LTs, PAF, TNF_{α} , factor depresor del miocardio (MDF) y eicosanoides que participan en la patogénesis de este modelo de shock (Lefer, 1989). Todos estos mediadores son liberados en las fases tempranas del shock, como consecuencia de la hipoperfusión producida por la oclusión del tronco celíaco y, tras la reperfusión, pasan al torrente circulatorio para actuar sobre las células diana (Lefer, 1989). Squadrito y cols (1991) han demostrado que el L-652,731, un antagonista específico del receptor del PAF, protege en el shock SAO, ya que aumenta el tiempo de supervivencia y revierte la hipotensión, la leucopenia y la actividad fagocitaria de los macrófagos, lo que sugiere la implicación del PAF, entre otros mediadores, en este modelo de shock.

Los resultados obtenidos con el PCA-4248 mostraron un efecto beneficioso en este tipo de shock experimental, ya que redujo la caída de la presión arterial postreperfusión y aumentó el tiempo de supervivencia. Sin embargo, no modificó los cambios observados en la frecuencia cardíaca. El efecto protector obtenido con el PCA-4248 sobre la hipotensión podría ser debido a su actividad dual como antagonista del receptor del PAF y anti- TNF_{α} , ya que ambos mediadores están involucrados en la disfunción endotelial del shock SAO (Lefer, 1989). El PAF produce un marcado efecto vasodilatador dependiente del endotelio en las arteriolas precapilares mesentéricas, así como un efecto constrictor independiente del endotelio en la circulación postcapilar. Ambos efectos producen un aumento de la presión hidrostática que facilitarían la extravasación plasmática inducida por el PAF (Clainy y cols, 1994). A este efecto hay que

añadir que el PAF también induce un aumento sostenido de la $[Ca^{2+}]$ en las células endoteliales, posiblemente mediado a través de la activación específica del canal de Ca^{2+} tipo-R recientemente descrito por Bkaily y cols, (1993). Este canal podría tener una importante función en la contracción sostenida del músculo liso vascular y en el mecanismo de acoplamiento excitación-secreción de las células endoteliales vasculares y, en consecuencia, en la liberación de sustancias vasoactivas, como el factor relajante derivado del endotelio (Claing y cols, 1994). El WEB-2170 revierte el aumento sostenido de Ca^{2+} intracelular inducido por el PAF, lo que sugiere que los antagonistas del PAF podrían, quizás, inhibir directamente la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo-R y los efectos vasoactivos del PAF sobre la musculatura mesentérica (Claing y cols, 1994), contribuyendo a disminuir la liberación de otros agentes vasoactivos.

La participación del TNF_{α} en la disfunción endotelial está íntimamente relacionado con el NO. Aunque algunos autores han observado que la producción de NO endotelial está disminuida en el shock SAO (Carey y cols, 1992), otros autores proponen que el NO es uno de los responsables de la disfunción endotelial porque, incluso en ausencia de endotelio, persiste una continuada producción de NO, probablemente debida a la inducción de la μ NOS por los PMNs y las células del músculo liso vascular (Busse y Mulsch, 1990). Por tanto, es posible que la disfunción endotelial producida por esta citocina sería el resultado de la suma de ambos eventos, ya que el TNF_{α} es capaz de disminuir la liberación de μ NOS endotelial o de incrementar la liberación de μ NOS del músculo liso vascular (Squadrito y cols, 1994b).

Por tanto, el efecto protector obtenido con el PCA-4248 en este modelo de shock podría ser atribuido a una acción dual: 1) como antagonista del receptor del PAF podría contribuir a mejorar la disfunción endotelial, una de las principales causas de la hipotensión del shock SAO, por inhibir en el lecho mesentérico la vasodilatación precapilar dependiente del endotelio y la vasoconstricción postcapilar independiente del endotelio y, por consiguiente, la extravasación plasmática; además, impediría la apertura sostenida de los canales de Ca^{2+} tipo-R, lo que inhibiría el aumento de la $[Ca^{2+}]$, y la liberación de sustancias vasoactivas que intervienen en este modelo de shock. 2) Como anti- TNF_{α} , el PCA-4248 también mejoraría la disfunción endotelial ya que, indirectamente, disminuiría la producción de NO a través de la inhibición de la síntesis del enzima μ NOS inducido por el TNF_{α} . El aumento en el tiempo de supervivencia producido por el PCA-4248 también podría ser explicado a través de su actividad anti- TNF_{α} , ya que a esta citocina se la ha relacionado con la letalidad del shock (Squadrito y cols, 1991).

Además de esta actividad dual que modularía la liberación de otros mediadores endógenos, el PCA-4248 también presenta una ligera actividad bloqueante de los canales de Ca^{2+} que podría influir en la protección del shock. La efectividad de los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} como agentes terapéuticos en el shock experimental ha sido descrita por varios autores (Hackel y cols, 1979; Lefer y Carrow, 1981; Lefer y Spath, 1984). Se sabe que durante el período de oclusión arterial (isquemia) se produce un aumento en la $[Ca^{2+}]$. Durante los primeros 10 minutos de reperfusión, la $[Ca^{2+}]$ tisular se incrementa 8-10 veces por encima del control (Shen y Jennings, 1972; Caputi y cols, 1980). Este aumento de la $[Ca^{2+}]$,

estimula diversas proteasas y fosfolipasas que lesionan directamente la membrana celular y, por consiguiente, facilitan una mayor entrada de Ca^{2+} a las células (Jennings y Reimer, 1981). También se ha descrito que en los estados de shock los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} disminuyen la liberación de captesina D, eicosanoides (Altura y cols, 1983), TXs y LTs (Towart y Perzborn, 1981; Samuelsson y Hammarstrom, 1982), efectos probablemente debidos a su capacidad de estabilizar las membranas lisosomales y, por tanto, para bloquear la liberación de enzimas lisosomales que activan el factor depresor del miocardio (MDF) y conducen a la aparición de lesiones irreversibles celulares (Lefer y cols, 1980; Araki y cols, 1980; Lefer, 1989). Por consiguiente, el ligero efecto bloqueante de los canales de Ca^{2+} del PCA-4248 podría contribuir también a la protección producida por este compuesto en este modelo de shock. Sin embargo, los efectos de los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} en el shock es muy variable. Esta variabilidad de los resultados podría deberse a que algunos de estos fármacos presentan otras propiedades específicas (Sturniolo y cols, 1988). Así, mientras que Verapamilo no mejora el tiempo de supervivencia, Nitrendipino y Benidipino sí protegen en este modelo de shock ya que, además de su actividad bloqueantes de los canales de Ca^{2+} , el Nitrendipino mejora la actividad fagocitaria de los macrófagos (Sturniolo y cols, 1988) y el Benidipino disminuye la acumulación de derivados aminonitrogenados libres y del MDF, mejorando la función endotelial (Karasawa y cols, 1991).

En conclusión, el PCA-4248 es una molécula que presenta varias actividades farmacológicas: PAF-antagonista, anti-TNF $_{\alpha}$ y, a dosis altas, presenta ligeros efectos bloqueantes de los canales de Ca^{2+} . La asociación de estas tres propiedades farmacológicas le convierten en un compuesto de posible interés en situaciones fisiopatológicas como las estudiadas en esta tesis, donde el compuesto ha mostrado una actividad beneficiosa y, por tanto, un importante potencial terapéutico que debiera ser confirmado en posteriores estudios clínicos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos han permitido establecer las siguientes conclusiones:

A.- De los resultados in vitro:

1. El PCA-4248 a concentraciones $> 10^{-7}M$ parece ejercer una cierta actividad bloqueante de los canales de Ca^{2+} en preparaciones vasculares aisladas, mostrando una mayor selectividad en la arteria coronaria que en la aorta.
2. El PCA-4248 a concentraciones $> 10^{-7}M$ inhibe la unión del [3H]-Nitrendipino a su receptor en las células musculares lisas y cardíacas, aunque su potencia es 2-3 veces inferior a la del Nitrendipino.
3. El PCA-4248 carece de propiedades bloqueantes de los receptores α - y β -adrenérgicos, ya que no inhibe las contracciones inducidas por la Noradrenalina en aortas aisladas de conejo ni la respuesta inotrópica y cronotrópica positiva inducida por el Isoproterenol en aurículas aisladas de cobaya.
4. El PCA-4248 a concentraciones $< 10^{-7}M$ produce un efecto inótrope negativo en aurículas derechas e izquierdas aisladas de cobaya y en corazones aislados y perfundidos de rata de forma concentración-dependiente, sin cambios significativos sobre la frecuencia sinusal; sin embargo, no modifica la captación de $^{45}Ca^{2+}$ en aurículas de cobaya.
5. El PCA-4248 no modifica la conducción intraauricular (intervalo St-A), intraventricular (intervalos H-Q y Q-V) ni la conducción a través del nodo A-V (intervalo A-H).
6. El PCA-4248 no modifica ninguno de los parámetros que definen las características de los potenciales de acción ni de los potenciales de acción lentos en fibras musculares ventriculares de cobaya; sin embargo, a la concentración de $10^{-8}M$, revierte el acortamiento en la duración del potencial de acción inducido por el PAF.

B.- De los estudios realizados in vivo:

7. El PCA-4248 no presenta ningún efecto sobre la PAS, PAD o frecuencia cardíaca en ratas normotensas; sin embargo, en ratas SHR produce una ligera, aunque significativa, disminución de la presión arterial y una reducción no significativa de la frecuencia cardíaca.

8. El PCA-4248 reduce de forma dosis-dependiente y revierte la hipotensión sistémica inducida por el PAF y por los inmunoagregados solubles de IgG (estudios de protección y reversión); sin embargo, el Nitrendipino muestra un efecto protector menos acusado que el obtenido con el PCA-4248.
9. El PCA-4248 revierte de forma inmediata los cambios hemodinámicos inducidos por los LPS de *S. typhosa*, así como reduce el aumento de frecuencia cardíaca producido por dichos LPS.
10. El PCA-4248 muestra un efecto beneficioso en el shock SAO, ya que reduce la caída de presión arterial postreperfusión y aumenta el tiempo de supervivencia.

BIBLIOGRAFÍA

ADOLFS, M.J.P., BEUSENBERG, F.D. y BONTA, R.L.: " PAF-acether modifies human peritoneal macrophage cAMP levels in a biphasic fashion ". *Agents and Actions*. 26: 119-120, 1989.

ALTURA, B.M., LEFER, A.M. y SCHUMER, W.: " Handbook of Shock and Trauma ". New York, Raven Press, 1983.

ALLOATTI, G., MONTRUCCHIO, G., MARIANO, F., TETTA, C., EMANUELLI, G. y CAMUSSI, G.: " Protective effect of verapamil on the cardiac and circulatory alterations induced by platelet-activating factor ". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 9: 181-189, 1987.

ALLOATTI, G., MONTRUCCHIO, G. y CAMUSSI, G.: " Role of platelet-activating factor (PAF) in oxygen radical-induced cardiac dysfunction ". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269: 766-771, 1994.

AMORIM, C.Z., SERGIO, R., CORDEIRO, B. y VARGAFTIG, B.B.: "Interference of PCA-4248, a novel PAF receptor antagonist, with antigen-induced paw edema in mice ". *Eur. J. Pharmacol.* 236: 301-304, 1993.

ARAKI, H., SOLLOTT, S.J. y LEFER, A.M.: " Role of splanchnic organ in development of tolerance to traumatic shock ". *J. Trauma*. 20: 1046-1050, 1980.

AVDONIN, P.V., CHELAKOV, I.B., BOOGRY, E.M., SVITINAULITINA, I.V., MAZAEV, A.V. y TKACHUK, V.A.: "Evidence for the receptor-operated calcium channels in human platelet plasma membranes ". *Thromb. Res.* 46: 29-37, 1987.

AVDONIN, P.V., MENISHIKOV, M.Y., SVITINA-ULITINA, I.J. y TKACHUK, V.A.: " Blocking of the receptor-stimulated calcium entry into human platelets by verapamil and nicardipine ". *Thromb. Res.* 52: 587-597, 1988.

BARANES, J., HELLEGOUARCH, A., LE HEGARAT, M., VIOSSAT, I., AUGET, M., CHABRIER, P.E. y BRAQUET, P.: " The effects 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.

BATT, J.P., LAMOURI, A., TAVET, F., HEYMANS, F., DIVE, G. y GODFROID, J.J.: " New hypothesis on the conformation of the PAF-receptor from studies on the geometry of selected platelet-activating factor-antagonists". *J. Lip. Med.* 4: 343-346, 1991.

BEAN, B.P., NOWYCKY, M.C. y TSIEN, R.W.: " Beta-adrenergic modulation of calcium channels in frog ventricular heart cells ". *Nature* 307: 371-375, 1984.

BEAN, B.P.: " Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity and pharmacology ". *J. Gen. Physiol.* 86: 1-30, 1985.

BEAN, B.P.: " Classes of calcium channels in vertebrate cells ". *Annu. Rev. Physiol.*, 16: 265-290, 1989.

BENVENISTE, J, HENSON, P.M. y COCHRANE, C.G.: " Leukocyte-dependent hystamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and platelet-activating factor ". *J. Exp. Med.* 136: 1356-1377, 1972.

BENVENISTE, J, TENCE, M, VARENNE, P, BIDAULT, J, BOULLET, C. y POLONSKY, J.: " Semi-synthese et structure purpousee du facteur activant les plaquettes (PAF); PAF-acether, un alkyl ether analogue de la lysophosphatidylcholine ". *C.R. Acad. Sci. Ser. D.* 298: 1037-1040, 1979.

BERRIDGE, M.: " Temporal aspects of calcium signalling ". *Adv. Second. Messenger and Phosphoprotein Res.* 24: 108-114, 1990.

BERTOLINO, M. Y LLINAS, R.R.: "The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32: 399-341, 1992.

BINNAKA, T., YAMAGUCHI, T., HIROHARA, J., HIRAMATSU, A. y MIZUNO, T.: " Gastric mucosal damage induced in rats by intravenous administration of platelet-activating factor ". *Scand. J. Gastroenterol.* 24 (supl 162): 67-70, 1989.

BKAILY, G., ECONOMOS, D., POTVIN, L., ARDILOUZE, J.L., MARRIOTT, C., CORCOS, J., BONNEAU, D. y FONG, C.N.: " Blockade of insulin sensitive steady-state R-type Ca^{2+} channel by PN200-110 in heart and vascular smooth muscle ". *Mol. Cell. Biochem.* 117: 93-106, 1992.

BKAILY, G., D'ORLEANS-JUSTE, P., NAIK, R., PERODIN, J., STANKOVA, J., ABDULNOUR, E. y ROLA-PLSZCZYNSKI, M.: " PAF activation of a voltage-gated R-type Ca^{2+} channel in human and canine aortic endothelial cells ". *Br. J. Pharmacol.* 110: 519-520, 1993.

BLANK, M.L., SNYDER, F, BYERS, L.W., BROOKS, B. y MUIRHEAD, E.E.: " Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine ". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90: 1194-1200, 1979.

BLANK, M.L., LEE, TC, FITZGERALD, V. y SNYDER, F.: " A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid) ". *J. Biol. Chem.* 256: 175-178, 1981.

BLANK, M.L., LEE, Y.J., CRESS, E.A. y SNYDER, F.: " Stimulation of the de novo pathway for the biosynthesis of platelet-activating factor (PAF) via cytidyltransferase activation in cells with minimal endogenous PAF production ". *J. Biol. Chem.* 263: 5656-5661, 1988.

BOLGER, G.T., GENGO, P.J., LUCHOWSKI, E.M., SIEGE, H., TRIGGLE, D.J. y JANIS, R.A.: " High affinity binding of calcium channel antagonist to smooth and cardiac muscle ". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104: 1604-1609, 1982.

BOLTON, T.B., AARONSON, P.I. y MACKENZIE, I.: " Voltage-dependent calcium channel in intestinal and vascular smooth muscle cells ". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 522: 32-42, 1988.

BOSSON, S., KUENZIG, M. y SCHWARTZ, S.I.: " Verapamil improves cardiac function and increases survival in canine *E. coli* endotoxin shock ". *Circ. Shock.* 16: 307-316, 1985.

BRAQUET, P. y GODFROID, J.J.: " PAF-acether specific binding sites. 2. Design of specific antagonist ". *Trends. Pharmacol. Sci.* 7: 397-403, 1986.

BRAQUET, P., TOUQUI, L., SHEN, T.S. y VARGAFTIG, B.B.: " Perspectives in platelet-activating factor research". *Pharmacol. Rev.* 39: 97-145, 1987.

BRAQUET, P.: " The Ginkgolides: potent platelet-activating factor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L.: chemistry, pharmacology and clinical applications ". *Drugs Future* 12: 643-699, 1987.

BRAQUET, P., ETIENNE, A., MENCIA-HUERTA, J.M. y CLOSTRE, F.: " Effects of the specific platelet activating factor antagonists, BN 52021 and BN 52063 on various experimental gastrointestinal ulcerations ". *Eur. J. Pharmacol.* 150: 269-276, 1988.

BRAQUET, P., PAUBERT-BRAQUET, M., BOURGAIN, R.H., BUSSOLINO, F. y HOSFORD, D.: " PAF/cytokine autogenerated feedback networks in microvascular immune injury: consequences in shock, ischemia and graft rejection ". *J. Lip. Med.* 1: 75-112, 1989.

BROWN, A.M. y BIRNBAUMER, L.: " Direct G protein gating of ion channels ". *Am. J. Physiol.* 254: H401-H410, 1988.

BURRI, K., BARNER, R., CASSAL, J.M., HADVARY, P., HIRTH, G. y MULLER, K.: " PAF: from agonists to antagonists by synthesis ". *Prostaglandins* 30: A691, 1985.

BUSSE, R. y MULSCH, A.: " Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells ". FEBS Lett. 275: 87-90, 1990.

CAMPBELL, K.P.; LEUNG, A.T. Y SHARP, A.H.: " The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel ". TINS, vol. 11 nº 10: 425-430, 1988.

CAMUSSI, G., TETTA, C., DE REGIBUS, M., BUSSOLINO, F. y VERCELLONE, A.: " Platelet-activating factor (PAF-acether) in experimentally-induced rabbit acute serum sickness. Role of basophil-derived PAF-acether in immune complex deposition ". J. Immunol. 128: 86-94, 1982.

CAMUSSI, G., MONTRUCCHIO, G., ANTRO, C., BUSSOLINO, F., TETTA, C. y EMANUELLI, G.: " Platelet-activating factor-mediated contraction of rabbit lung strips: pharmacologic modulation ". Immunopharmacol. 6: 87-96, 1983.

CAMUSSI, G., ALLOATTI, G., MONTRUCCHIO, G., MEDA, M. y EMANUELLI, G.: " Effect of platelet-activating factor on guinea-pig papillary muscle ". Experientia. 40: 697-699, 1984a.

CAMUSSI, G., TETTA, C., CODA, R., SEGOLONI, G.P. y VERCELLONI, A.: " Platelet-activating factor induced loss of glomerular anionic charges ". Kidney. Int. 25: 73-81, 1984b.

CANNON, J.G., TOMPKINS, R.G., GELFAND, J.A., MICHIE, H.R., STANFORD, G.G., VAN DER MEER, J.W.M., ENDRES, S., LONNEMAN, G., CORSETTI, J., CHERNOW, B., WILMORE, D.W., WOLFF, S.M., BURKE, J.F. y DINARELLO, C.A.: " Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever ". J. Infect. Dis. 161: 79-83, 1990.

CAPUTI, A.P., ROSSI, F., CARNEY, K. y BREZENOFF, H.E.: " Modulatory effect of brain acetylcholine on reflex-induced bradycardia and tachycardia in conscious rats ". J. Pharmacol. Exp. Ther. 215: 309-316, 1980.

CARBONE, E. y LUX, H.D.: " Single low-voltage-activated calcium channels in chick and rat sensory neurones ". J. Physiol. 386: 571-601, 1987.

CAREY, C., SIEGFRIED, M.R., MA, C., WEYRICH, A.S. y LEFER, A.M.: " Antishock and endothelial protective actions of a NO donor in mesenteric ischaemia and reperfusion ". Circ. Shock. 38: 209-216, 1992.

CASALS-STENZEL, J., MUACEVIC, G. y WEBER, K-H.: " Pharmacological actions of WEB-2086, a new specific antagonist of platelet activating factor ". J. Pharmacol. Exp. Ther. 241: 974-981, 1987.

CATTERALL, W.A.: " Structure and function of voltage-sensitive ion channels ". *Science*. 242: 50-61, 1988.

CAUVIN, C., LOUTZENHISER, R. y VAN BREEMEN, C.: " Mechanism of calcium antagonist-induced vasodilation". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 373-396, 1983.

CHANG, S.W., FEDDERSEN, C.O., HENSON, P.M. y VUELKEL, N.F.: " Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin treated rats ". *J. Clin. Invest.* 81: 1498-1509, 1987.

CHIGNARD, M., LE COUEDIC, J.P., VARGAFTIG, B.B. y BENVENISTE, J.: " Platelet-activating factor (PAF-acether) secretion from platelets: effects of aggregating agents ". *Br. J. Haematol.* 46: 455-464, 1980.

CHILTON, F.H., ELLIS, J.M., OLSON, S.C. y WYKLE, R.L.: " 1-O-alkyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine: a common source of platelet-activating factor and arachidonate in human polymorfonuclear leukocytes ". *J. Biol. Chem.* 259: 12014-12019, 1984.

CLAING, A., BKAILY, G., BERTHIAUME, N., SIROIS, P., ROLA-PLESZCZYNSKI, M y D'ORLEANS-JUSTE, P.: "Role of R-type calcium channels in the response of the perfused arterial and venous mesenteric vasculature of the rat to platelet-activating factor ". *Br. J. Pharmacol.* 112: 1202-1208, 1994.

COEFFIER, E., CERRINA, J., JOUVIN-MARCHE, E. y BENVENISTE, J.: " Inhibition of rabbit platelet aggregation by the Ca²⁺-antagonist verapamil and diltiazem and by trifluoperazine ". *Thromb. Res.* 31: 565-576, 1983.

COOPER, K., FRAY, M.J., PARRY, M.J., RICHARDSON, K. y STEELE, J.: " 1,4-Dihydropyridines as antagonists of platelet-activating factor. 1. Synthesis and structure-activity relationships of 2-(4-heterocyclyl)phenyl derivates". *J. Med. Chem.* 35: 3115-3129, 1992.

CORDEIRO, R.S.B., MARTINS, M.A., SILVA, P.M.R., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., CASTANHERIARA, J.R.C. y VARGAFTIG, B.B.: " Desensitizacion to PAF-induced rat paw oedema by repeated intraplantar injections ". *Life. Sci.* 39: 1871-1878, 1986.

CUSS, F.M., DIXON, C.M.S. y BARNES, P.J.: " Effects of inhaled platelet-activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man ". *Lancet* 2: 189-192, 1986.

DA COSTA, M., METCALFE, S. y CALNE, R.Y.: " Prolongation of rat heart allograft survival using low dose cyclosporin plus a PAF antagonist WEB 2107 ". *Transplant. Proc.* 22: 1945-1946, 1990.

DEAVERS, S.I., ARROYAVE, J.M., PRIHODA, T.J. y Mc MANUS, L.M.: " Cardiopulmonary and intravascular alterations during the sustained infusion of PAF ". *J. Lip. Med.* 4: 145-163, 1991.

DEMOPOULOS, C.A., PINCKARD, R.N. y HANAHAN, D.J.: " Platelet-activating factor: evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of liquid chemical mediator) ". *J. Biol. Chem.* 254: 9355-9358, 1979.

DESQUANDS, S., RUFFIE, C., BENDAHO, M., LEFORT, J. y VARGAFTIG, B.B.: " Interference of the PAF antagonist compound PCA-4248 anaphylactic shock and hyperresponsiveness to PAF ". *Eur. J. Pharmacol.* 183: A187, 1990.

DESQUANDS, S., RUFFIE, C., LEFORT, J., HATMI, M., PIÑA, M., PRIEGO, J.G. y VARGAFTIG, B.B.: " Compound PCA-4248 interferes with bronchopulmonary anaphylaxis and with in vitro hyperresponsiveness to platelet-activating factor ". *Eur. J. Pharmacol.* 235: 101-108, 1993.

DIEZ, J., TAMARGO, J. y VALENZUELA, C.: " Negative inotropic effect of somastatin in guinea-pig atrial fibres ". *Br. J. Pharmacol.* 86: 547-555, 1985.

DIEZ, J., DELPON, E. y TAMARGO, J.: " Effects of platelet activating factor on contractile force and ⁴⁵Ca fluxes in guinea-pig isolated atria ". *Br. J. Pharmacol.* 100: 305-311, 1990.

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

DOEBBER, T.W., WU, M.S., ROBBINS, J.C., MCCHOY, B., CHANG, M.N. y SHEN, T.Y.: " Platelet-activating factor involvement in endotoxin-induced hypotension in rats: studies with PAF receptor antagonist kadsurenone ". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127: 799-808, 1985.

DOEBBER, T.W., WU, M.S. y BIFTU, T.: " Platelet-activating factor (PAF) mediation of rat anaphylactic response to soluble immune complexes: studies with PAF receptor antagonist L-652,731 ". *J. Immunol.* 136: 4659-4668, 1986.

ELSTAD, M.R., STAFFORINI, D.M., McINTYRE, T.M., PRESCOTT, S.M. y ZIMMERMAN, G.: " Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage differentiation ". *J. Biol. Chem.* 264: 8467-8470, 1989.

EMLING, F.: Comunicación personal. Departamento de Inmunología. Laboratorios Knoll. Ludwigshafen (Alemania), 1993.

ETIENNE, A., HECQUET, F., SOULARD, C., SPINNEWYN, B., CLASTRE, F. y BRAQUET, P.: " In vivo inhibition of plasma protein leakage and Salmonella enteritidis-induced mortality in the rat by a specific PAF-acether antagonist: BN 52021 ". Agents and Actions. 17: 368-370, 1986.

FELIX, S.B., STEGER, A., BAUMAN, G., BUSCH, R., OCHSENFELD, G. y BERDEL, W.E.: " Platelet-activating factor-induced coronary constriction in the isolated perfused guinea-pig heart and antagonistic effects of the PAF antagonist WEB 2086 ". J. Lip. Med. 2: 9-20, 1990.

FERNANDEZ-GALLARDO, S., CANO, E., BRAQUET, P. y SANCHEZ CRESPO, M.: " Role of PAF-acether in the mediation of pathophysiological responses to aggregated immunoglobulins. Studies with the platelet-activating factor receptor antagonist BN 52021 ". Int. J. Immunopharmacol. 10: 353-360, 1988.

FERNANDEZ-GALLARDO, S., ORTEGA, M.P., PRIEGO, J.G., FAU DE CASA-JUANA, M., SUNKEL, C. y SANCHEZ-CRESPO, M.: " Pharmacological actions of PCA 4248, a new platelet-activating factor receptor antagonist: in vivo studies ". J. Pharmacol. Exp. Ther. 255: 34-39, 1990.

FERNANDEZ-GALLARDO, S., GIJON, M.A., GARCIA, C., FURIA, V., LIU, F-T. y SANCHEZ-CRESPO, M.: " The role of platelet-activating factor and peptidoleukotrienes in the vascular changes of rat passive anaphylaxis ". Br. J. Pharmacol. 105: 119-125, 1992.

FEUERSTEIN, G., ZUKOWSKA-GROJEC, Z., KRAUS, M.M., BLANK, M.L., SNYDER, F. y KOPIN, I.J.: " Cardiovascular and sympathetic effects of 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine in conscious SHR and WKY rats ". Clin. Exp. Hypertens. [A]4: 1335-1350, 1982.

FEUERSTEIN, G., BOYD, L.M., EZRA, D. y GOLDSTEIN, R.E.: " Effect of platelet-activating factor on coronary circulation of the domestic pig ". Am. J. Physiol. 246: H466-H471, 1984.

FEUERSTEIN, G. y GOLDSTEIN, R.E.: " Effect of PAF on the cardiovascular system ". En Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators, ed. Snyder, F. New York, Plenum Press, pg 403-424, 1987.

FITZGERALD, M.F., PARENTE, L. y WHITTLE, B.J.: " Release of PAF-acether and eicosanoids from guinea-pig alveolar macrophages by FMLP: effects of cyclooxygenase and lipoxygenase inhibition ". Eur. J. Pharmacol. 164: 539-546, 1989.

FLORES, N.A. y SHERIDAN, D.J.: " 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.

FONTELES, M.C., CAMPOS, H.H. y ARAUJO FILHO, R.M.: " Interference of PCA-4248 with the toxic effects of cyclosporine A on rabbit kidneys ". J. Lip. Med. 2: 224(A), 1990.

FOX, A.P., NOWYCKY, M.C. y TSIEN, R.W.: " Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones ". J. Physiol. 394: 149-172, 1987a.

FOX, A.P., NOWYCKY, M.C. y TSIEN, R.W.: " Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones ". J. Physiol. 394: 173-200, 1987b.

GODFRAIND, T., MILLER, R. y WIBO, M.: " Calcium antagonism and calcium entry blockade ". Pharmacol. Rev. 38: 321-416, 1986.

GODFRAIND, T., KAZDA, S. y WIO, M.: " Effects of a chronic treatment by nisoldipine, a calcium antagonist dihydropyridine, on arteries of spontaneously hypertensive rats ". Circ. Res. 68: 674-682, 1991.

GODFROID, J.J., HEYMANS, F., MICHEL, E., REDEUILH, C., STEINER, E. y 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.

GOLDENBERG, M.M. y MEURER, R.D.: " A pharmacologic analysis of the action of platelet-activating factor in the induction of hindpaw oedema in the rat ". Prostaglandins 28: 271-278, 1984.

GOLLASCH, M., IGNATIEVA, V., KOBRINSKY, E., VORNOVITSKY, E. y ZABOROVSKAYA, L.: " Electrophysiological mechanisms responsible for the action of PAF in guinea-pig myocardium. Relation to the putative membrane signalling processes of PAF ". J. Lip. Med. 3: 139-159, 1991.

GONZALEZ-MORALES, M.A.: " Fosfolípidos y corazón: acciones sobre la actividad eléctrica y contráctil". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, 1987.

HACKEL, D.B., MIKAT, E.M., WHALEN, G., REIMER, K. y ROCHLANI, S.P.: " Treatment of hemorrhagic shock in dogs with verapamil: effects on survival and cardiovascular lesions ". Lab. Invest. 41: 356-359, 1979.

HANDLEY, D.A., VAN VALEN, R.G., MELDEN, M.K., FLURY, S., LEE, M.L. y SAUNDERS, R.N.: " Inhibition and reversal of endotoxin, aggregated IgG-and PAF-induced hypotension in the rat by SRI63-072, a PAF receptor antagonist ". *Immunopharmacol.* 12: 11-16, 1986.

HANDLEY, D.A., VAN VALEN, R.G., MELDEN, M.K., HOUHMAN, W.J. y SAUNDERS, R.N.: " Biological effects of the orally active platelet activating factor receptor antagonist SDZ64-412 ". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 617-623, 1988.

HEBERT, R.L., SIROIS, P., BRAQUET, P. y PLANTE, G.E.: " Hemodynamic effects of PAF-acether on the dog kidney". *Prostag. Leukotr. Med.* 26: 189-202, 1987.

HEGLUND, U. y LUNDGREN, O.: " Intestinal ischemia and shock factors ". *Fed. Proc.* 37: 2729-2733, 1978.

HELLEGOUARCH, A., AUGUET, M., CLOSTRE, F. y BRAQUET, P.: " Effects of BN 52063 and other agents inhibiting platelet-activating factor-induced contractile responses in rat portal vein ". *J. Pharm. Pharmacol.* 40: 589-591, 1988.

HELLEWELL, P.G. y WILLIAMS, T.J.: " Antagonism of PAF-induced oedema formation in rabbit skin: a comparison of different antagonist ". *Br. J. Pharmacol.* 97: 171-180, 1989.

HENRIQUES, M.G.M.O., WEG, V.B., AMORIM, C.Z., CORDEIRO, R.S.B. y VARGAFTIG, B.B.: " A pharmacological analysis of inflammation induced by carrageenin and platelet-activating factor in the mice". *Eur. J. Pharmacol.* 183: A2252, 1990.

HERBERT, J.M., ZESPY, L. y MAFFRAND, J.P.: " Protective effect of SR27417, a novel PAF antagonist, on lethal anaphylactic and endotoxin-induced shock in mice ". *Eur. J. Pharmacol.* 205: 271-276, 1991.

HERD, C.M., DONIGI-GALE, D., SHOUBE, T.S., KILFEATHER, S.A., OKIJI, S.A. y PAGE, C.P.: " Effect of PF 10040 on PAF-induced airway responses in neonatally immunized rabbits ". *Br. J. Pharmacol.* 111: 7-12, 1994.

HEYMANS, F., MICHEL, E., BORREL, M., WICHROWSKI, B., GODFROID, J.J., CONVERT, O., COEFFIER, E., TENCE, M. y BENVENISTE, J.: " New total synthesis and high resolution ¹H NMR spectrum of platelet-activating factor, its enantiomer and racemic mixtures ". *Biochem. Biophys. Acta.* 666: 230-237, 1981.

HILLE, B.: " Ionic channel of excitable membranes ". Sinauer Associates Sunderland, MA, 1984.

- HILLMAN, D., CHEN, S., AUNG, T.T., CHERKSEY, B., SUGIMORI, M. y LLINAS, R.R.: " Localisation of P-type calcium channels in the central nervous system ". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7076-7080, 1991.
- HIRAFUJI, M., MAEYAMA, K., WATANABE, T. y OGURA, Y.: " Transient increase of cytosolic free calcium in cultured human vascular endothelial cells by platelet-activating factor ". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 910-917, 1988.
- HOCKBERGER, P. y SWANDULLA, D.: " Direct ion channel gating: a new function for intracellular messengers". *Cell. Mol. Neurobiol.* 7: 229-236, 1987.
- HOFMANN, F., NASTAINCZYK, W., ROHRKASTEN, A., SCHNEIDER, T. y SIEBER, M.: " Regulation of the L-type calcium channel ". *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 393-398, 1987.
- HOGABOAM, C.M., DONIGI-GALE, D., SHOUBE, T.S. y WALLACE, J.L.: " PF-5901 inhibits gastrointestinal platelet-activating factor synthesis ". *Eur. J. Pharmacol.* 216: 315-318, 1992.
- HOLLAND, M.R., VENABLE, M.E., WATHLEY, R.E., ZIMMERMAN, G.A., McINTYRE, T.M. y PRESCOTT, S.M.: " Activation of the acetyl-coenzyme A: lysoplatelet-activating factor acetyltransferase regulates platelet-activating factor synthesis in human endothelial cells ". *J. Biol. Chem.* 267: 22883-22890, 1992.
- HOM, G.J., GRANT, S.K., WOLFE, G., BACH, T.J., McINTYRE, D.E. y HUTCHINSON, N.I.: " Lipopolysaccharide-induced hypotension and vascular hyporeactivity in the rat: tissue analysis of nitric oxide synthase mRNA and protein expression in the presence and absence of dexamethasone, N^G-monomethyl-L-arginine or indomethacin". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272: 452-459, 1995.
- HONDA, Z-I., NAKAMURA, M., MIKI, J., MINAMI, M., WATANABE, T., SEYAMA, Y., OKADO, H., TOH, H., ITO, K., MIYAMOTO, T. y SHIMIZU, T.: " Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung ". *Nature* 349: 342-346, 1991.
- HOSEY, M.M. y LAZDUNSKI, M.: " Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation". *J. Membrane Biol.* 104: 81-105, 1988.
- HOSFORD, D. y BRAQUET, P.: " Antagonist of Platelet-Activating Factor: chemistry, pharmacology and clinical applications ". *En Progress in Medicinal Chemistry*, ed. Ellis, G.P. y West, G.B. Vol XXVII, New York, Elsevier. Sci, pg 325-380, 1990.

HUBER, M., BEUTLER, B. y KEPPLER, D.: " Tumor necrosis factor alpha stimulates leukotriene production in vivo ". *Immunol.* 18: 2085-2090, 1988.

HWANG, S.B., LAM, M.H., BIFTU, T., BEATTIE, T.R. y SHEN, T.Y.: " Trans-2,5-bis(3,4,5-trimethoxyphenyl)tetrahydrofuran. An orally active, specific and competitive receptor antagonist of platelet-activating factor". *J. Biol. Chem.* 261: 13720-13726, 1985a.

HWANG, S.B., LI, C.L., LAM, M.H. y SHEN, T.Y.: " Characterization of cutaneous vascular permeability induced by platelet-activating factor in guinea-pigs and rats and its inhibition by a platelet-activating factor antagonist". *Lab. Invest.* 52: 617-630, 1985b.

HWANG, S.B., LAM, M.H., LI, C.L. y SHEN, T.Y.: " Release of platelet-activating factor and its involvement in the first phase of carrageenin-induced rat paw oedema ". *Eur. J. Pharmacol.* 120: 33-41, 1986.

HWANG, S-B.: " Specific receptors of platelet-activating factor, receptor heterogeneity, and signal transduction mechanisms ". *J. Lip. Med.* 2: 123-158, 1990.

IMANISHI, N., MURAKAMI-UCHIDA, M., KOIKE, H., NATSUME, Y. y MOROOKA, S.: " Biological effects of the new platelet-activating factor receptor antagonist (+)-cis-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl)thiazolidin-4-one-hydrochloride". *Drug Res.* 44: 317-322, 1994.

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

IÑARREA, P., ALONSO, F. y SANCHEZ CRESPO, M.: " Platelet-activating factor, an effector substance of the vasopermeability changes induced by the infusion of immunoaggregates in the mouse ". *Immunopharmacol.* 6: 7-14, 1984b.

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

IOCULANO, M., SQUADRITO, F., ALTAVILLA, D., CANALE, P., CAMPO, G.M., BUSSOLINO, F., SARDELLA, A., URNA, G. y CAPUTI, A.P.: " Protective effects of L-659989, a platelet-activating factor receptor antagonist, in myocardial ischemia and reperfusion in rats ". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23: 7-12, 1994.

JAMES-KRACKE, M.R., SEXE, R.B. y SHUKLA, S.D.: " Picomolar platelet-activating factor mobilizes Ca to change platelet shape without activating phospholipase C or proteinkinase C; simultaneous flourometric measurement of intracellular free Ca concentration and aggregation ". J. Pharmacol. Exp. Ther. 271: 824-831, 1994.

JANIS, R.A. y TRIGGLE, D.J.: " New developments in Ca²⁺ channels antagonists ". J. Med. Chem. 26: 775-785, 1983.

JANIS, R.A., SILVER, P.J. y TRIGGLE, D.J.: " Drug action and cellular calcium regulation ". Adv. Drugs. Res. 16: 309-591, 1987.

JENNINGS, R.B. y REIMER, K.A.: " Lethal myocardial ischemic injury ". Am. J. Phatol. 102: 241-255, 1981.

JIMENEZ DE LA PUERTA, J.C.: " Estudios de la actividad del PCA-4248 en el transplante cardíaco heterotrópico en la rata Lewis ". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. 1993.

JOSEPH, R. y WELCH, K.M.: "Granulocytes, platelet activating factor and myocardial injury ". Circulation. 79: 140-141, 1989.

JOUVIN-MARCHE, E., NINIO, E., BEAUVAIN, G., TENCE, M., NIAUDET, P. y BENVENISTE, J.: " Biosynthesis of PAF-acether (platelet-activating factor). VII. Precursors of PAF-acether and acetyltransferase activity in human leukocytes". J. Immunol. 133: 892-898, 1984.

KARASAWA, A., ROCHESTER, J.A., MA, X.L. y LEFER, A.M.: " Protection of endothelial damage and systemic shock by benidipine, a calcium antagonist, in rats subjected to splanchnic ischemia and reperfusion ". Circ. Shock. 33: 135-141, 1991.

KLOSTERHALFEN, B., HORSTMANN-JUNGEMANN, K., VOGEL, P., FLOHE, S., OFFNER, F., KIRKPATRICK, G.J. y HEINRICH, P.C.: " The time course of various inflammatory mediators during recurrent endotoxemia ". Biochem. Pharmacol. 43: 2103-2109, 1992.

KOLTAI, M., LEPRAN, I., SZEKERES, L., VIOSSAT, I., CHABRIER, E. y BRAQUET, P.: " Effect of BN 52021, a specific PAF-acether antagonist, on cardiac anaphylaxis in Langendorff hearts isolated from passively sensitized guinea-pigs ". Eur. J. Pharmacol. 130: 133-136, 1986.

- KOLTAI, M., TOSAKI, A., HOSFORD, D. y 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., GUINOT, P., ESANU, A. y BRAQUET, P.: " Platelet-activating factor (PAF). A review of its effects, antagonist and possible future clinical implications ". (Part I y II). *Drugs.* 42: 9-29 y 174-204, 1991.
- KOLTAI, M., HOSFORD, D. y BRAQUET, P.: " PAF-induced amplification of mediator release in septic shock: prevention or downregulation by PAF antagonist ". *J. Lipid. Med.* 6: 183-198, 1993.
- KOLTAI, M., GUINOT, P., HOSFORD, D. y BRAQUET, P.: " Platelet-activating factor antagonist: scientific background and possible clinical applications ". *Advances in Pharmacology*, 28: 81-167, 1994
- KORNECKI, E. y EHRLICH, Y.H.: " Neuroregulatory and neuroacathological actions of the ether phospholipid platelet-ctivating factor ". *Science* 240: 1792-1794, 1988.
- KUNO, M. y GARDNER, P.: " Ion channels activated by inositol 1,4,5-trisphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes ". *Nature* 326: 301-304, 1987.
- LAPETINA, E.G. y SIEGEL, F.L.: " Shape change induced in human platelets by platelet-activating factor". *J. Biol. Chem.* 258: 7241-7245, 1983.
- LAURENT, S., LONDON, G. y MARCHAIS, S.: " Vascular compliance in hypertension: therapeutic implications". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 10 (Supl.5): S108-S111, 1987.
- LAURINDO, F.R.M., EZRA, D., CZAJA, J.F., FEUERSTEIN, G. y GOLDSTEIN, R.E.: " Acute right ventricular failure due to platelet-activating factor or tromboxane A₂ analog ". *Clin. Res.* 33: 203A (Abstract), 1985.
- LEE, M.L., WINSLOW, C.M., JAEGGI, C., D'ARIES, F., FRISCH, G., FARLEY, C., MELDEN, H.K., HANDLEY, D.A. y SAUNDERS, R.N.: " Inhibition of platelet-activating factor: synthesis and biological activity of SRI 63-073, a new phospholipid antagonist ". *Prostaglandins* 30: A690, 1985.
- LEE, H.C. y LUM, B.K.: " Protective action of calcium entry blockers in endotoxin shock ". *Circ. Shock.* 18: 193-203, 1986.
- LEE, H.C., HARDMAN, J.M. y LUM, B.K.: " The effects of the calcium entry blockers, nivaldipine and nitrendipine, on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation ". *Life. Sci.* 45: 877-883, 1989.

- LEFER, A.M., SMITH, E.F.III., ARAKI, J., SMITH, J.B., AHARONY, D., CLAMERON, D.A., MAGULDA, P.L. y NICOLAU, K.C.: " Dissociation of vasoconstrictor and platelet aggregatory activities of thromboxane by carbocyclic thromboxane A₂, a analog of thromboxane A₂ ". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1706-1710, 1980.
- LEFER, A.M. y CARROW, B.A.: " Salutory action of nimodipine in traumatic shock ". Life. Sci. 29: 1347-1353, 1981.
- LEFER, A.M. y SPATH, J.A.: " Pharmacologic basis of the treatment of circulatory shock ". En Cardiovascular Pharmacology (2ª ed), ed. Antonaccio, M. New York, Raven Press, pg 535-578, 1984.
- LEFER, A.M.: " Significance of lipid mediators in shock state ". Circ. Shock. 27: 3-12, 1989.
- LEVI, R., BURKE, J., GUO, Z-G., HUTTON, Y., HOPPENS, C., McMANUS, L., HANAHAN, D. y PINCKARD, R.: " Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (AGEPC). A putative mediator of cardiac anaphylaxis in the guinea-pig". Circ. Res. 54: 117-124, 1984.
- LEWIS, M.S., WHATLEY, R.E., CAIN, P., McINTYRE, T.M. y PRESCOTT, S.M.: " Hydrogen peroxidase stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophils adhesion ". J. Clin. Invest. 82: 2045-2055, 1988.
- LI, E.J., COOK, J.A., ASHTON, S., WISE, W.C. y HALUSHKA, P.V.: " Effect of the LTD₄ receptor antagonist LY203647 on endotoxic shock sequelae in the rat ". Eur. J. Pharmacol. 199: 221-225, 1991.
- LIMA, M.C.R., NETO, H.C.C.F., SILVA, P.M.R., DIAS, M.T.R.P., BOZZA, P.T., PEREZ, S.A.C., MARTINS, M.A. y CORDEIRO, R.S.B.: " Interference of PCA-4248, a novel PAF antagonist, on antigen-induced pleurisy ". Eur. J. Pharmacol. 183: A888, 1990.
- LOPEZ DIEZ, F., NIETO, M.L., FERNANDEZ-GALLARDO, S., GIJON, M.A. y SANCHEZ CRESPO, M.: " Occupancy of receptors for platelet-activating factor in patients with septicemia ". J. Clin. Invest. 83: 1733-1740, 1989.
- LORY, P., VARADI, G.F. SLISH, D.F. y SCHWARTZ, A.: " Characterization of β subunit modulation of a rabbit cardiac L-type Ca²⁺ channel α_1 subunit as expressed in mouse L cells ". FEBS Lett., 315: 167-172, 1993.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J.: " Protein measurement with the Folin phenol reagent ". J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.

- LUCKHOFF, A. y CLAPHAN, D.E.: " Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca^{2+} permeable channel". *Nature* 355: 356-359, 1992.
- LLINAS, R.R., SUGIMORI, M. y CHERKSEY, B.: " Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons: the P channel". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 560: 103-111, 1989a.
- LLINAS, R., SUGIMORI, M., LIN, J.W. y CHERKSEY, B.: " Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison ". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1689-1693, 1989b.
- MACKAY, J. y CHEUNG, D.: " The increased sensitivity of the spontaneously hypertensive rat superior mesenteric artery to agents affecting voltage-operated calcium channels is due to membrane depolarization". *FASEB J.* 2: A786, 1988.
- MAHAUT-SMITH, M.P., SAGE, S.O. y RING, T.J.: " Receptor-activated single channels in intact human platelets". *J. Biol. Chem.* 265: 10479-10483, 1990.
- MAITRA, S.R. y SAYEED, M.M.: " Effect of diltiazem on intracellular Ca^{2+} mobilization in hepatocytes during endotoxic shock ". *Am. J. Physiol.* 253: R545-R548, 1987.
- MALAVASI, F., TETTA, C., FURANO, A., BELLONE, G., FERRERO, E., FRANZONE, A.C., DELLABONA, P., RUSCI, R., MATERA, L., CAMUSSI, G. y CALIGARIS-CAPPIO, F.: " Fc receptor triggering induces expression of surface activation antigens and release of platelet-activating factor in large granular lymphocytes ". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 2443-2447, 1986.
- MAN, R.Y.K., HU, W., y KINNAIRD, A.A.A.: " Coronary vascular response to platelet-activating factor in the perfused rat heart ". *J. Lip. Med.* 2: 75-83, 1990.
- MAN, R.Y.K., WEIMIN, H y KINNAIRD, A.A.A.: " Mechanisms of the coronary vascular effects of platelet-activating factor in the rat perfused heart ". *Br. J. Pharmacol.* 103: 1097-1102, 1991.
- MANGINO, M.J., ANDERSON, C.B., MURPHY, M.K. y TURK, J.: " Arachidonate lipoxygenase products and renal allograft rejection in dogs ". *Transplantation.* 44: 805-808, 1987.
- MANNHOLD, R., RODENKIRCHEN, R. y BAYER, R.: " Qualitative and quantitative structure-activity relationship of specific Ca antagonists ". *Prog. Pharmacol.* 5: 25-52, 1982.

- MATHINSON, J.C., WOLFSON, E. y ULEVITCH, R.J.: " Participation of tumor necrosis factor in mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits ". *J. Clin. Invest.* 81: 1925-1937, 1988.
- McDONALD, P.P., McCOLL, S.R., BRAQUET, P. y BERGEAT, P.: " Autocrine enhancement of leukotriene synthesis by endogenous leukotriene B₄ and platelet-activating factor in human neutrophils ". *Br. J. Pharmacol.* 111: 852-860, 1994.
- McINTYRE, T.M., ZIMMERMAN, G.A. y PRESCOTT, S.M.: " Leukotrienes C₄ y D₄ stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils ". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 2204-2206, 1986.
- McKENNA, E., KOCH, W.I., SLISH, D.F. y SCHWARTZ, A.: " Toward an understanding of the dihydropyridines-sensitive calcium channel ". *Biochem. Pharmacol.*, 39: 1145-1150, 1990.
- MELDOLESI, J. y POZZAN, T.: " Pathway of Ca²⁺ influx at the plasma membrane: voltage-,receptor-, and second-messenger-operated channels ". *Exp. Cell. Res.* 171: 271-283, 1987.
- MICKELSON, J.K., SIMPSON, P.J. y LUCCHESI, B.R.: " Myocardial dysfunction and coronary vasoconstriction induced by platelet-activating factor in the post-infarcted rabbit isolated heart ". *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20: 547-561, 1988.
- MILLER, R.J.: " Multiple calcium channels and neuronal function ". *Science* 235: 46-52, 1987.
- MOLSKI, T.F.P., TAO, W., BECKER, E.L. y SHA'AFI, R.I.: " Intracellular calcium rise produced by platelet-activating factor is deactivated by fMet-Leu-Phe and this requires uninterrupted activation sequence: role of protein kinase C ". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 836-843, 1989.
- MONTRUCCHIO, G., ALLOATI, G., TETTA, C., DE LUCA, R. y SAUNDERS, R.N.: " Release of platelet activating factor from ischemic-reperfused rabbit heart ". *Am. J. Physiol.* 25: H1236-H1246, 1989.
- MOZES, T., HEILIGERS, J.P.C., CORNE, J.A.M., FREEK, T., ZIJLSTRA, S.B.E., SAXENA, P.R. y BONTA, I.L.: " Platelet activating factor is one of the mediators involved in endotoxic shock in pigs ". *J. Lip. Med.* 4: 309-325, 1991.
- MYERS, A.K., NAKANISHI, T. y RAMWELL, P.: " Antagonism of PAF-induced death in mice ". *Prostaglandins.* 35: 447-458, 1988.

- NAYLER, W.G. ed: " Calcium antagonist ", Academic Press. San Diego, CA, 1988.
- NELSON, M.T., POTLACK, J.B., WORLEY, J.F. y STANDEN, N.B.: " Calcium channels, potassium channels and voltage-dependence of arterial smooth muscle tone ". *Am. J. Physiol.* 259: C3-C18, 1990.
- NG, D.S. y WONG, K.: " Effect of platelet-activating factor (PAF) on cytosolic free calcium in human peripheral blood mononuclear leukocytes ". *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 64: 351-354, 1989a.
- NG, D.S. y WONG, K.: " Platelet-activating factor (PAF) stimulates phosphatidylinositol hydrolysis in human peripheral blood mononuclear leukocytes ". *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* 66: 219-231, 1989b.
- ODA, M., SATOUCHI, K., YASUNAGE, K. y SAITO, J.: " Molecular species of platelet-activating factor generated by human neutrophils challenged with ionophore A23187 ". *J. Immunol.* 135: 1090-1093, 1985.
- OHNO, M., FUJITA, F., SHIRAIWA, M., ISUMI, A., KOBOYASI, S., YOSHIWARA, M., KUDO, I., INONE, K. y NOJIMA, S.: " Molecular design toward biologically significant compounds based on platelet activating factor: a highly selective agonist as a potential antihypertensive agents ". *J. Med. Chem.* 29: 1812-1814, 1986.
- OKAMOTO, M., YOCHIDA, K., UCHIDA, I., KOSHAKA, M. y AOKI, H.: " Studies of platelet activating factor (PAF) antagonist from microbial products. II. Pharmacological studies of FR-49175 in animal models ". *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)* 34: 345-348, 1986.
- OLIVERA, A., CARAMELO, C., ARRIBA, G., LAMAS, S., RODRIGUEZ-PUYOL, D., SCHRIER, R.W., RODRIGUEZ-BARBERO, A. y LOPEZ-NOVOA, J.M.: " Effect of atrial natriuretic peptide and calcium antagonists on platelet-activating factor-induced contraction and intracellular calcium mobilization in rat mesangial cells ". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 24: 388-393, 1994.
- ORTEGA, M.P., GARCIA, M.C., GIJON, M.A., FAU DE CASA-JUANA, M., PRIEGO, J.G., SANCHEZ-CRESPO, M. y SUNKEL, C.: " 1,4-Dihydropyridines, a new class of platelet-activating factor receptor antagonists: in vitro pharmacologic studies ". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 28-33, 1990.
- OTSUKA, A., MASUGI, F., OGIHARA, T., SACKI, S., NAGANO, M., KOYAMA, Y., TABUCHI, Y. y KUMAHARA, Y.: " Hypotensive mechanism of acetylglceryletherphosphorylcholine (AGEPC) in dogs. Effects on hemodynamics and humoral factors ". *Prostaglandin Leukotrienes Med.* 19: 25-35, 1985.

- OU, C., KAMBAYASI, J., KAWASAKI, T., UEMURA, Y., SHINOZAKI, K., SHIBA, E., SAKON, M., YOKAWA, M. y MORI, T.: " Potential etiologic role of PAF in two major septic complications: disseminated intravascular coagulation and multiple organ failure". *Thromb. Res.* 73: 227-238, 1994.
- PALMER, R.M.J., REES, D.D., AHSTON, D.S. y MONCADA, S.: " Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine ". *Nature* 333: 664-666, 1988.
- PARKER, M.M., SHELHAMER, J.H., NATANSON, C., ALLING, D. y PARRILLO, J.E.: " Serial hemodynamic patterns in survivors and non-survivors of septic shock in humans ". *Crit. Care. Med.* 15: 923-929, 1987.
- PENNER, R., MATTEWS, G. y NEHER, E.: " Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells". *Nature* 334: 499-504, 1988.
- PINCKARD, R.N., HALONEN, M., PALMER, J.D., BUTLER, C., SHAW, J.O. y HENSON, P.M.:
" Intravascular aggregation and pulmonary sequestration of platelets during IgE-induced systemic anaphylaxis in the rabbit. Abrogation of lethal anaphylatic shock by platelet-depletion ". *J. Immunol.* 199: 2185-2193, 1977.
- PIROTZKY, E., BIDAULT, J., BURTIN, C., GUBLER, M.C. y BENVENISTE, J.: " Release of platelet-activating factor, slow-reacting substance and vasoactive species from isolated rat kidney ". *Kidney. Int.* 25: 404-410, 1984.
- PONS, F., TOUVAY, C., LEJEUNE, V., CARRE, C. y VILAIN, B.: " Action of platelet-activating factor (PAF) antagonist on the bronchopulmonary effects of PAF in the guinea-pig ". *J. Lip. Med.* 1: 329-340, 1989.
- Preclinical study of the new PAF-antagonist PCA-4248, N° PRCL4248. Laboratorios Alter.
- QIAN, C., GUO, Z-M., PETERS, C.J. y LIU, C-T.: " Platelet-activating factor (PAF)-induced cardiopulmonary dysfunctions and their reversal with a PAF antagonist (BN 52021) in strain 13 guinea-pigs ". *J. Lip. Med.* 7: 223-237, 1993.
- RABINOVICI, R., YUE, T.L., FARHAT, M., SMITH, E.F., ESSER, K.M., SLIVJAK, M. y FEUERSTEIN, G.:
" Platelet activating factor (PAF) and tumor necrosis factor- α (TNF $_{\alpha}$) interactions in endotoxemic shock: studies with BN 50739, a novel PAF antagonist ". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 256-263, 1990.
- RABINOVICI, R., BUGELSKI, P.J., ESSER, K.H., HILLEGAS, L.M., GRISWALD, D.E., VERNICK, J. y FEUERSTEIN, G.: " Tumor necrosis factor - α mediates endotoxin-induced lung injury in platelet-activating factor-primed rats". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267: 1550-1557, 1993.

- RAMON, J.R., LASTRA, L.A. y GARCIA DE JALON, P.D.: " Estudio de la actividad eléctrica y contráctil en corazón aislado de cobaya mediante una modificación de la técnica de Langendorff". *Rev. Esp. Cardiol.* 32: 555-561, 1979.
- ROBERTSON, D.A., WANG, D.Y., LEE, C.O. y LEVI, R.: " Negative inotropic effect of platelet activating factor: association with a decrease in intracellular sodium activity ". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245: 124-128, 1988.
- ROLA-PLESZCZYNSKY, M., GASNON, L., RUDZINSKIA, M., BERGEAT, P. y SIROIS, P.: " Human natural cytotoxic cell activity: enhancement by leukotrienes (LT) A₄, B₄ and D₄ but not stereoisomers of LTB₄ or HETE'S". *Prostaglandin Leukotrienes Med.* 13: 113-117, 1984.
- SAGE, S.O. y RINK, T.J.: " The kinetics of changes in intracellular calcium concentration in fura-2-loaded human platelets ". *J. Biol. Chem.* 262: 16364-16369, 1987.
- SAGE, S.O., MAHAUT-SMITH, M.P. y RINK, T.J.: " Calcium entry in non excitable cells: lesson from human platelets". *News Physiol. Sci.* 7: 108-113, 1992.
- SAKAGUCHI, S., ABE, H. y SAKAGUCHI, O.: " Calcium behavior in endotoxin-poisoned mice: specially calcium accumulation in mitochondria ". *Microbiol. Immunol.* 28: 517-527, 1984.
- SALOMONE, S., MOREL, N. y GODFRAIND, T.: " Effect of amlodipine on the induction of nitric oxide synthase by endotoxin ". *Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther.* 329: 344A, 1995.
- SAMUELSSON, B. y HAMMARSTROM, S. Eds.: " Leukotrienes: a novel group of biologically active compounds". En *Vitamins and Hormones*, Academic Press, pg 1-15, 1982.
- SANCHEZ CRESPO, M., ALONSO, F., IÑARREA, P., ALVAREZ, V. y EGIDO, J.: " Vascular actions of synthetic PAF-acether (a synthetic platelet-activating factor) in the rat: evidence for a platelet independent mechanism ". *Immunopharmacol.* 4: 173-185, 1982.
- SANCHEZ CRESPO, M., FERNANDEZ-GALLARDO, S., NIETO, M.L., BARANES, J. y BRAQUET, P.: " Inhibition of the vascular actions of IgG aggregates by BN 52021, a highly specific antagonist of PAF-acether ". *Immunopharmacol.* 10: 69-75, 1985.
- SANCHEZ CRESPO, M., FERNANDEZ-GALLARDO, S. y NIETO, M.L.: " Inhibition of the vascular actions of aggregated immunoglobulins by BN 52021 ". En *Ginkgolides: Chemistry, Biology, Pharmacology and Clinical Perspectives*, ed Braquet, P., New York, J.R. Prous Science Publishers. S.A., pg 507-512, 1988.

- SANCHEZ CRESPO, M. y FERNANDEZ-GALLARDO, S.: " Pharmacological modulation of PAF: a therapeutic approach to endotoxin shock ". J. Lip. Med. 4: 127-143, 1991.
- SAYEED, M.M. y MAITRA, S.R.: " Effect of diltiazem on altered cellular calcium regulation during endotoxic shock". Am. J. Physiol. 253: R549-R554, 1987.
- SCHLONDORFF, D. y NEUWIRTH, D.A.: " Platelet-activating factor and the kidney ". Am. J. Physiol. 251: F1-F11, 1986.
- SCHMIDT, J., LINDSTAEDT, R. y SZELENYI, I.: " Characterization of platelet-activating factor induced superoxide anion generation by guinea-pig alveolar macrophages ". J. Lip. Med. 5: 13-22, 1992.
- SCHULZ, R., NAVA, E. y MONCADA, S.: " Induction and potential biological relevance of a Ca²⁺-independent nitric oxide synthase in the myocardium ". Br. J. Pharmacol. 105: 575-580, 1992.
- SETCHELL, K.D., LAWSON, K.M., MITCHELL, F.L., ADLERCREUTZ, H., KIRK, D.N. y AXELSON, M.: " Lignans in man and in animal species ". Nature 287: 740-742, 1983.
- SHAW, J.O., PINCKARD, R.N., FERRIGNI, K.S., McMANNUS, L. y HANAHAN, D.J.: " Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (platelet-activating factor) ". J. Immunol. 123: 1847-1857, 1981.
- SHEN, A.C. y JENNINGS, R.B.: " Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury ". Am. J. Pathol. 67: 441-452, 1972.
- SHEN, T.Y., HWANG, S.B., CHANG, M.N., DOEBBER, T.W., LAM, M.H., WU, H.S., WANG, X., HANG, G.O. y LI, R.Z.: " Caracterización a platelet-activating factor receptor antagonist isolated from haifenteng (*Piper futokadsura*): specific inhibition of in vitro and in vivo platelet-activating factor-induced effects ". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 672-676, 1985.
- SHER, E., BIANCARDI, E., PASSAFARO, M. y cols.: " Physiopathology of neuronal voltage-operated Ca²⁺ channel ". FASEB J, 5: 2677-2683, 1991.
- SIEGFRIED, M.R., MA, X-L y LEFER, A.M.: " Splanchnic vascular endothelial dysfunction in rat endotoxemia: role of superoxide radicals ". Eur. J. Pharmacol. 212: 171-176, 1992.
- SIGAL, E.C., VALONE, F.H., HOLTZMAN, M. y GOETZL, E.J.: " Preferential human eosinophil chemotactic activity of the platelet activating factor (PAF) 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine

- (AGEPC) ". *J. Clin. Immunol.* 7: 179-184, 1987.
- SIROIS, M.G., LIMA, W.T., FERNANDES, A.J.B., JOHNSON, G.E.P. y SIROIS, P.: " Effect of PAF on rat lung vascular permeability: role of platelets and polymorphonuclear leucocytes ". *Br. J. Pharmacol.* 111: 1111-1116, 1994.
- SMITH, S.I. y AGUSTINE, G.I.: " Calcium ions active zones and synaptic transmitter release ". *TINS*, vol 11, nº 10: 458-464, 1988.
- SMITH, J.A., RADOMSKI, M.W., SCHULZ, R., MONCADA, S. y LEWIS, M.J.: " Porcine endocardial cells in culture express the inducible form of nitric oxide synthase ". *Br. J. Pharmacol.* 108: 1107-1110, 1993.
- SPEEDING, M. y PAOLETTI, R.: " Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function ". *Pharmacol. Rev.* 44: 363-376, 1992.
- SQUADRITO, F., STURNIOLO, R., ALTAVILLA, D., SANTORO, G., CAMPO, G.M., ARENA, A. y CAPUTI, A.P.: "Platelet activating factor involvement in splanchnic artery occlusion shock in rats ". *Eur. J. Pharmacol.* 192: 47-53, 1991.
- SQUADRITO, F., ALTAVILLA, D., CAMPO, G.M., CALOPAI, G., IOCOLANO, M., ZINGARELLI, B., SAIITA, A., PROSDOCIMI, M. y CAPUTI, A.P.: " Cloricromene, a coumarine derivative, protects against lethal endotoxin shock in rats ". *Eur. J. Pharmacol.* 210: 107-113, 1992.
- SQUADRITO, F., CANALE, P., ALTAVILLA, D., ZINGARELLI, B., IOCOLANO, M. y CAPUTI, A.P.: " Platelet activating factor and tumour necrosis factor induce leukocyte adhesion in splanchnic artery occlusion shock". *Br. J. Pharmacol.* 111: 224P, 1994a.
- SQUADRITO, F., ALTAVILLA, D., CANALE, P., IOCOLANO, M., CAMPO, G.M., AMMENDOLIA, L., FERLITO, M., ZINGARELLI, B., SQUADRITO, G., SAIITA, A. y CAPUTI, A.P.: " Participation of tumor necrosis factor and nitric oxide in the mediation of vascular dysfunction in splanchnic artery occlusion shock". *Br. J. Pharmacol.* 113: 1153-1158, 1994b.
- STAFFORINI, D.M., CARTER, M.E., McINTYRE, T.M. y PRESCOTT, S.M.: " Human plasma platelet activating factor acetylhydrolase: association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor". *J. Biol. Chem.* 262: 4215-4222, 1987.
- STURNIOLO, R., ALTAVILLA, D., BERLINGHIERI, M.C., SQUADRITO, F. y CAPUTI, A.P.: " Splanchnic artery occlusion shock in the rat: effects of the calcium entry blockers nimodipine and verapamil ". *Circ.*

Shock. 24: 43-53, 1987.

SUN, X.M. y HSUEH, W.: " Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor ". J. Clin. Invest. 81: 1328-1331, 1988.

SUNKEL, C.E., FAU DE CASA-JUANA, M., SANTOS, L., GOMEZ, M.M., VILLARROYA, M., GONZALEZ-MORALES, M.A., PRIEGO, J.G. y ORTEGA, P.: " 4-alkyl-1,4-dihydropyridines derivatives as specific PAF-acether antagonists". J. Med. Chem. 33: 3205-3210, 1990.

SUTTER, M.C.: " The mesenteric-portal vein in research". Pharmacol. Rev. 42: 287-327, 1990.

SZABO, C., MITCHELL, J.A., GROSS, S.S., THIEMERMANN, C. y VANE, J.R.: " Nifedipine inhibits the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide ". J. Pharmacol. Exp. Ther. 265: 674-680, 1993.

TAMARGO, J., TEJERINA, T., DELGADO, C. y BARRIGON, S.: " Electrophysiological effect of platelet-activating factor (PAF-acether) in guinea-pig papillary muscles ". Eur. J. Pharmacol. 109: 219-227, 1985.

TAMARGO, J. y GONZALEZ-MORALES, M.A.: " Biphasic effects of PAF-acether in isolated guinea-pig heart ". Rev. Farmacol. Clin. Exp. 7: 225-229, 1990.

TAMARGO, J., LOPEZ-SENDON, J., DELPON, E., GONZALEZ-MORALES, M. y DE MIGUEL, E.: "Cardiovascular effects of the new dihydropyridine derivate elgodipine". Arzneimittel/Drug Res. 41: 895-900, 1991.

TAMARGO, J., VALENZUELA, C. y DELPON, E.: " Molecular pharmacology of electrical alterations of the heart ". En : Molecular Cell Biology of Cardiovascular Diseases. Eds. J. Diez, V. Dzau, R. Ferrari, E.H. Frolich. Ed. Mosby/Doyma, pag 433-454. Barcelona, 1995.

TERASHITA, Z., TSUSHIMA, S., YOSHIOKA, Y., NOMURA, H., INODA, Y. y NISHIKAWA, K.: " CV-3988-a specific antagonist of platelet-activating factor (PAF) ". Life. Sci. 32: 1975-1982, 1983.

TERASHITA, Z., IMURA, Y., NISHIKAWA, K. y SUMIDA, S.: " Is platelet activating factor (PAF) a mediator of endotoxic shock? ". Eur. J. Pharmacol. 109: 257-261, 1985.

THIEMERMAN, C.: " The role of the L-arginine: nitric oxide pathway in circulatory shock ". Adv. Pharmacol. 28: 45-79, 1994.

- TOLINS, J.P., VERCELLOTTI, G.M., WILKOWSTE, M., JACOBS, H.S. y RAIJ, L.: " Role of platelet activating factor in endotoxemic acute renal failure in the male rat ". *J. Lab. Clin. Med.* 113: 316-324, 1989.
- TOUQUI, L., JACQUEMIN, C., DUMAREY, C. y VARGAFTIG, B.B.: " 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine is the precursor of platelet-activating factor in stimulated rabbit platelets. Evidence for an alkylacetyl-glycerophosphorylcholine cycle ". *Biochem. Biophys. Acta.* 833: 111-118, 1985.
- TOUQUI, L., ROTHHUT, B., SHAW, A.M., FRADIN, A., VARGAFTIG, B.B. y RUSSO-MARIE, F.: " Platelet activation-a role for a 40Kd antiphospholipase A₂ protein indistinguishable from lipocortin ". *Nature.* 321: 177-180, 1986.
- TOWART, R. y PERZBORN, E.: " Nimodipine inhibits carbocyclic thromboxane-induced contractions of cerebral arteries ". *Eur. J. Pharmacol.* 69: 213-215, 1981.
- TRACEY, K.J., BEUTLER, B., LOWRY, S.F., MERRYWEATHER, J., WOLFE, S., MILSARK, J.W., HARIRI, R.J., FAHEY, T.J., ZENTELLA, A., ALBERT, J.D., SHIRES, G.T. y CERAMI, A.: " Shock and tissue injury induced recombinant human cachectin ". *Science* 234: 470-474, 1986.
- TRIGGLE, D.J., LANGS, D.A. y JANIS, R.A.: " Ca²⁺ channel ligands: structure-function relationship of the 1,4-dihydropyridines ". *Med. Res. Rev.* 9: 123-179, 1989.
- TRIGGLE, D.J.: " Calcium-channel drugs: structure-function relationship and selectivity of action ". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 18 (Supl 10): S1-S6, 1991a.
- TRIGGLE, D.J.: " Sites, mechanisms of action and differentiation of calcium channel antagonists ". *Am. J. Hypertension* 47 (Supl 4): 4225-4295, 1991b.
- TSENG, G.N. y BOYDEN, P.A.: " Multiple types of Ca²⁺ currents in single canine Purkinje cells ". *Circ. Res.* 65: 1735-1750, 1989.
- TSIEN, R.W., ELLINOR, P.T. y HORNE, W.A.: " Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channel ". *Trends Pharmacol. sci.*, 12: 349-354, 1991.
- TUFFIN, D.P. y WADE, P.J.: " Calcium channel blocking drugs: a structural lead for PAF antagonist? ". *Prostaglandins* 30: 702, 1985.
- UKENA, D., KROGEL, C., DENT, G., YUKAWA, T. y SYBRECHT, G.: " PAF-receptors on eosinophils: identification with a novel ligand [³H]WEB 2086 ". *Biochem. Pharmacol.* 38: 1702-1705, 1989.

- VALENZUELA, C., DELGADO, C. y TAMARGO, J.: " Electrophysiological effects of 5-hydroxypropafenone on guinea-pig ventricular muscle fibres ". *Br. J. Pharmacol.*, 96: 970-976, 1987.
- VALONE, F.H., COLES, E., REINHOLD, V.R. y GOETZL, E.J.: " Specific binding of phospholipid platelet-activating factor by human platelets ". *J. Immunol.* 129: 1637-1641, 1982.
- VALONE, F.H.: " Inhibition of platelet-activating factor binding to human platelets by calcium channel blockers". *Thromb. Res.* 45: 427-435, 1987.
- VARGAFTIG, B.B. y BENVENISTE, J.: " Platelet-activating factor today ". *Trends Pharmacol. Sci.* 4: 341-343, 1983.
- VARGAFTIG, B.B. y BRAQUET, P.: " PAF-acether today: relevance for acute experimental anaphylaxia ". *Br. Med. Bull* 43: 312-335, 1987.
- VENABLE, M.E., ZIMMERMANN, G.A., McINTYRE, T.M. y PRESCOTT, S.M.: " Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions ". *J. Lip. Res.* 34: 691-702, 1993.
- VLEEMING, W., WEMER, J. y PORSIUS, A.J.: " 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.
- VON TSCHARNER, V., PROD'HOM, B., BAGGIOLINI, M. y REUTER, H.: " Ion channels in human neutrophils activated by a rise in free cytosolic calcium concentration ". *Nature* 324: 369-372, 1986.
- WADE, P.J., LAD, N. y TUFFIN, D.P.: " Interaction of the human platelet PAF-acether binding site with calcium and calcium channel antagonists ". *Prog. Lipid. Res.* 25: 163-165, 1986.
- WAINWRIGHT, C.L., PARRAT, J.R. y BIGAUD, M.: " The effects of PAF-antagonist on arrhythmias and platelets during acute myocardial ischaemia and reperfusion ". *Eur. Heart J.* 10: 235-243, 1989.
- WALLACE, J.L. y WHITTLE, B.J.R.: " Prevention of endotoxin-induced gastrointestinal damage by CV-3988, an antagonist of platelet-activating factor ". *Eur. J. Pharmacol.* 124: 209-210, 1986.
- WALLACE, J.L., STEEL, G., WHITTLE, B.J.R., LAGENTE, V. y VARGAFTIG, B.B.: " Evidence for platelet-activating factor as a mediator of endotoxin-induced gastrointestinal damage in the rat ". *Gastroenterology* 93: 765-773, 1987.

ZINGARELLI, B., SQUADRITO, F., IOCLANO, M., ALTAVILLA, D., BUSSOLINO, F., CAMPO, G.M. y CAPUTI, A.P.: " Platelet activating factor interaction with tumor necrosis factor and myocardial depressant factor in splanchnic artery occlusion shock ". Eur. J. Pharmacol. 222: 13-19, 1992.

ZUKOWSKA-GROJEC, Z., BLANK, M.L., SNYDER, F. y FEUERSTEIN, G.: " The adrenergic system and the cardiovascular effects of platelet-activating factor (1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) in SHR and WKY rats ". Clin. Exp. Hypertens. [A]7: 1015-1031, 1985.