

II.3. Shock anafiláctico

Las reacciones anafilácticas, también llamadas de hipersensibilidad inmediata o de tipo I, pueden ser causadas por moléculas de gran tamaño con capacidad inmunogénica, o por moléculas más pequeñas que se unen a portadores (*carriers*) y actúan como haptenos. Para reproducir estas reacciones en los animales de experimentación se utilizan tanto modelos sistémicos como locales en animales sensibilizados de forma activa o pasiva, respectivamente.

Las reacciones de tipo I son mediadas principalmente por inmunoglobulinas E (IgE). Estos anticuerpos son producidos durante las etapas de exposición al antígeno (fase de sensibilización) y la reacción se inicia ante una segunda exposición al antígeno. Los síntomas clínicos son consecuencia de la liberación de mediadores. La gran variedad de mediadores químicos que intervienen (histamina, leucotrienos, tromboxano A₂, prostaglandinas, PAF, etc.), hace del shock anafiláctico una de las manifestaciones más críticas y más complejas de las reacciones alérgicas.

II.3.1. ACTIVO.

Se han utilizado dos especies diferentes: ratón y cobayo. En el modelo de shock anafiláctico en ratón se ha valorado la mortalidad inducida por la administración del antígeno. El modelo con cobayo anestesiado se ha utilizado para valorar otros parámetros, además de la mortalidad, como la presión arterial media y el flujo espiratorio máximo. Ambos son modelos de shock anafiláctico activo, es decir, la sensibilización con un determinado antígeno induce la generación de anticuerpos por parte del propio sistema inmunológico del animal. La reacción de anafilaxia tiene lugar cuando estos anticuerpos entran de nuevo en contacto con el antígeno utilizado en la sensibilización (reexposición).

Para aumentar la sensibilización de los animales se utilizan frecuentemente sustancias coadyuvantes, como por ejemplo el hidróxido de aluminio o suspensiones de bacterias inactivadas, que son potentes inductores de la producción de IgE (Bazin y cols., 1990). En el caso del modelo en ratón, hemos utilizado una cepa de *Bordetella pertussis*.

El cobayo es una especie muy utilizada como modelo experimental de shock anafiláctico activo, puesto que desarrolla una anafilaxia sistémica importante y su pulmón es un órgano diana muy constante y extremadamente sensible. En esta especie, las Ig generadas (IgG e IgE) se fijan a los mastocitos, aunque las IgE lo hacen durante más tiempo que las IgG. La liberación de mediadores de anafilaxia a partir de los mastocitos produce broncoconstricción, que da lugar a síntomas clínicos de diversa gravedad o bien a la muerte del animal. Con un protocolo de sensibilización como el que utilizamos nosotros, se generan predominantemente IgG (Andersson, 1980). La utilización de dosis bajas del antihistamínico mepiramina inmediatamente antes de la reexposición permite evitar la fase aguda de anafilaxia, mediada básicamente por histamina, que ocasionaría la muerte inmediata de los animales.

II.3.1.1. Sensibilización de los animales.

Soluciones a preparar:

- Seroalbúmina bovina (BSA) (1 mg/mL): se pesan 150 mg y se disuelven en 150 mL de suero fisiológico.

- Dilución 1:25 del antígeno de *Bordetella pertussis*: se toman 6.2 mL de la suspensión comercial del antígeno (Difco) y se añaden los 150 mL de la solución de BSA preparada anteriormente.

- Ovoalbúmina (100 mg/mL): se pesan 6.5 g y se disuelven en 130 mL de suero fisiológico (este volumen permite sensibilizar 30 cobayos).

* *Sensibilización en ratón:*

Animales:

Se utilizan ratones Swiss machos, de unas 6 semanas de edad, con un peso aproximado de 30 gramos, mantenidos con agua y comida *ad libitum*.

Método:

Los ratones se distribuyen al azar en grupos de 10. Se administra a cada uno de los animales 1 mL de la dilución 1:25 de *B. pertussis* por vía i.p.

* *Sensibilización en cobayo:*

Animales:

Se utilizan lotes de 30 cobayos Dunkin-Hartley machos, con un peso aproximado de 350-500 gramos, mantenidos con agua y comida *ad libitum*.

Método:

Se administra a cada animal 4 mL de la suspensión de ovoalbúmina, 2 mL por vía i.p. y 2 mL por vía s.c.

II.3.1.2. Reexposición al antígeno en el ratón sensibilizado. Valoración de la mortalidad.

Soluciones a preparar:

- Seroalbúmina bovina 1 mg/mL: se pesan 30 mg y se disuelven en 30 mL de suero fisiológico.

- Seroalbúmina bovina 2 mg/kg: se pesan 60 mg y se disuelven en 30 mL de suero fisiológico.

- Propanolol 1 mg/kg: se pesan 30 mg y se disuelven en 30 mL de suero fisiológico.

- Propanolol 2 mg/kg: se pesan 60 mg y se disuelven en 30 mL de suero fisiológico.

Método:

La reexposición al antígeno se realiza 14 días después de la sensibilización. Se administra en primer lugar el grupo control, induciéndose el shock mediante la administración sucesiva de propanolol (10 mL/kg, i.p.) y BSA (10 mL/kg, i.v.), ambos a la dosis de 1 mg/kg. Si la mortalidad al cabo de 1 h es menor del 60% en este grupo, se vuelve a realizar el mismo proceso con un nuevo grupo de animales, pero aumentando la dosis de BSA a 2 mg/kg. Si tampoco en este caso la mortalidad supera o iguala el 60%, se realiza un tercer grupo control induciendo el shock mediante la administración de propanolol y BSA, ambos a 2 mg/kg.

Cuando la mortalidad es mayor o igual del 60%, se continúa el experimento con el resto de grupos, administrando el producto o productos a estudiar, e induciendo el shock con las mismas dosis de propanolol y BSA que hayan producido una mortalidad mayor o igual de 60% en el grupo control. La mortalidad se valora 1 h después de la administración de BSA. Los animales que permanecen con vida tras este período de tiempo son sacrificados.

El protocolo varía ligeramente según se administren los compuestos a estudiar por vía intravenosa u oral:

** Administración por vía intravenosa:*

Los compuestos a estudiar se administran (10 mL/kg) 15 min después de la administración del propanolol. Cinco minutos después de administrar dichos compuestos, se induce el shock mediante la administración de BSA.

** Administración por vía oral:*

A los 10 min de la administración de los compuestos (20 mL/kg), se administra el propanolol. Veinte minutos después de éste, se induce el shock mediante la administración de BSA.

Cálculo de los resultados:

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

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

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

II.3.1.3. Reexposición al antígeno en el cobayo sensibilizado. Determinación de parámetros respiratorios y hemodinámicos.

Soluciones a preparar:

- Uretano 15%: ver II.1.1.

- Ovoalbúmina 100 mg/mL: se pesan 500 mg y se disuelven en 5 mL de suero fisiológico.

- Mepiramina 15 µg/mL: se pesan 7.5 mg y se disuelven en 50 mL de suero fisiológico. De esta solución se realiza una dilución 1:10, tomando 2 mL y llevándolos a 20 con suero fisiológico.

Método:

La reexposición al antígeno se realiza 28 días después de la sensibilización. Se administra el producto a estudiar p.o. (disuelto en Tween 80 1%, a 10 mL/kg). Se anestesia el animal con uretano 15% (10 mL/kg, i.p.) y se le coloca en decúbito supino sobre una placa calefactora. Se procede a disecar la tráquea, colocando una cánula acoplada a un neumotacómetro. Se aísla la carótida izquierda y se canula con un catéter acoplado a un transductor de presión.

Se administra la mepiramina (1 mL/kg, i.v.) 3 min antes de la reexposición con ovoalbúmina. A los 60 min de la administración del producto, se administra la ovoalbúmina (1 mL/kg, i.v.). Mediante un polígrafo se registran la presión arterial y el flujo respiratorio durante 45 min, después de los cuales se da por finalizado el experimento.

Cálculo de los resultados:

Se calcula la presión arterial media y el flujo espiratorio máximo a partir del registro poligráfico a los 1, 3, 5, 15, 30 y 45 min después de la reexposición al antígeno. La presión arterial media se calcula según la fórmula descrita en *II.2.2.1* y el flujo espiratorio máximo se valora sobre el registro poligráfico, habiendo realizado una calibración previa con un flujo conocido. Se valora también la supervivencia de los animales en el min 45 tras la reexposición al antígeno.

II.3.2. PASIVO.

La anafilaxia pasiva cutánea es uno de los métodos más utilizados en la valoración inicial de la posible actividad antialérgica de nuevos compuestos de síntesis. Esta técnica se basa en una de las características fundamentales de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I: el aumento

de la permeabilidad de las vénulas postcapilares de la piel como consecuencia de la reacción anafiláctica en la membrana mastocitaria.

La anafilaxia pasiva cutánea puede realizarse en cobayos, ratas o ratones. Sin embargo, los resultados obtenidos en la rata parecen ser más consistentes que los obtenidos en el ratón (Watanabe y Ovary, 1977).

La administración de suero de animales sensibilizados provoca una reacción antígeno-anticuerpo que induce la liberación local de sustancias vasoactivas, dando lugar a un aumento drástico de la permeabilidad vascular (Bazin y cols., 1990). Dado que la sustancia antigénica se mezcla con un colorante (azul de Evans, en nuestro caso), la reacción cutánea se evidencia por la aparición de zonas coloreadas en la piel. Estas áreas proporcionan una medida de la cantidad de IgE específica para el antígeno presente en el suero.

II.3.2.1. Obtención del antisuero y sensibilización de los animales.

** Obtención del antisuero específico de ovoalbúmina:*

Soluciones a preparar:

- Suspensión de ovoalbúmina 2 mg/mL + hidróxido de aluminio 200 mg/mL: se pesan 30 mg de ovoalbúmina y 3 g de $\text{Al}(\text{OH})_3$, y se suspenden en 15 mL de suero fisiológico.

- Dilución 1:5 (v/v) del antígeno de *Bordetella pertussis*: 3 mL de la suspensión comercial del antígeno (Difco) se llevan a 15 mL con suero fisiológico.

Animales:

Se utilizan ratas Sprague-Dawley machos, de unos 300 g de peso, mantenidas con comida y agua *ad libitum*.

Método:

Se inyectan por vía s.c. 5 mL/kg de la suspensión que contiene ovoalbúmina e hidróxido de aluminio. Por vía i.p. se administran 5mL/kg de la suspensión de antígeno de *Bordetella pertussis*. Transcurridos 15 días se extrae sangre a las ratas mediante punción cardíaca. El suero obtenido por centrifugación (1000 g durante 15 min a 4°C) se congela a -70°C hasta el momento de su utilización.

* *Sensibilización pasiva de los mastocitos cutaneos:*

Animales:

Se utilizan ratas Sprague Dawley machos, de unos 250 g de peso, mantenidas en ayunas durante 18 h, y con agua *ad libitum*.

Método:

Se depila el dorso de las ratas con la rasuradora. Se esperan 24 h antes de empezar el experimento, con objeto de que disminuya la irritación. A continuación se inyectan por vía i.d. 0.1 mL de antisuero preparado anteriormente, diluido con suero fisiológico (1:5 v/v) en seis zonas bien separadas del dorso depilado de cada animal.

Se esperan 48 h antes de provocar la reacción anafiláctica, debido a que ciertas IgG pueden fijarse a las membranas de los mastocitos. Durante este período de tiempo las IgG se disipan mientras que los anticuerpos de tipo IgE quedan más firmemente unidos a los mastocitos (Krell y Chakrin, 1980).

II.3.2.2. Inducción de la anafilaxia pasiva cutánea en la rata.

Soluciones a preparar:

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

- Suspensión de ovoalbúmina y azul de Evans 10 mg/mL: se pesan 100 mg de ovoalbúmina y 100 mg de azul de Evans, y se disuelven en 10 mL de suero fisiológico.

- Solución de sulfato sódico 0.5% y acetona (3:7 v/v): se pesan 500 mg de sulfato sódico y se disuelven en 100 mL de agua bidestilada. A 90 mL de esta solución se le añaden 210 mL de acetona.

Método:

Las ratas previamente sensibilizadas se anestesian con pentobarbital sódico, administrado por vía i.p. en un volumen de 10 mL/kg.

Se inyectan por la vena femoral 0.5 mL de la suspensión que contiene ovoalbúmina y azul de Evans. Los compuestos a probar se administran p.o. 1 h antes de la inyección del antígeno.

Treinta min después de la inyección de la ovoalbúmina y del azul de Evans, se sacrifican los animales por dislocación cervical. Las pápulas azules formadas en la piel como resultado de la extravasación del azul de Evans en el lugar en donde ha sido inyectado el antisuero, se recortan y se introducen en tubos de vidrio que contienen la solución de acetona y sulfato sódico. El volumen utilizado de esta solución es de 2 mL por pápula.

Los tubos se mantienen durante 24 h en agitación constante y a temperatura ambiente. Una vez concluido este proceso, se filtra el contenido de los tubos a través de un filtro plegado de celulosa (diámetro: 10 cm) y se mide la absorbancia del filtrado en un espectrofotómetro a 620 nm.

Cálculo de los resultados:

Se calcula la media de las absorbancias en cada grupo de tratamiento y a continuación se calcula el porcentaje de inhibición con respecto al valor obtenido por el grupo control en ese experimento concreto.

II.4. Isquemia-reperfusión

La reperfusión temprana de un órgano isquémico es una de las acciones más efectivas para reducir la lesión. Sin embargo, la reperfusión puede ser en sí misma causa de graves daños a las células isquémicas. A esto se le ha llamado "lesión de reperfusión".

Majno y cols. (1967) fueron los primeros en describir el fenómeno de isquemia-reperfusión, que ellos llamaron de "no reflujo". Desde entonces se ha venido estudiando este proceso patológico en medio de cierta controversia entre quienes consideran la reperfusión como una auténtica entidad etiológica, y quienes la consideran como un período de "aturdimiento" tras una fase de isquemia más o menos prolongada.

La lesión por isquemia-reperfusión parece estar absolutamente ligada a la respuesta inflamatoria, dando lugar a fracaso microcirculatorio seguido de necrosis y muerte celular. Las cascadas y mediadores implicados en la respuesta inflamatoria a la lesión por isquemia-reperfusión son complejas y muy interrelacionadas, destacando la generación de radicales libres, los metabolitos del ácido araquidónico y el PAF.

El interés de los modelos de isquemia-reperfusión en animales de experimentación depende del órgano implicado. Una parte de los estudios se centran en problemas relacionados con el trasplante de órganos (riñón, básicamente). En otros órganos, como corazón, cerebro e intestino, la lesión de isquemia-reperfusión tiene una implicación más global sobre el organismo, causando no sólo alteraciones locales en los órganos afectados, sino también estados de shock. Nosotros nos hemos centrado básicamente en este tipo de estudios, realizando un modelo de isquemia-reperfusión en el aparato digestivo, y otro de isquemia-reperfusión miocárdica, ambos en la rata.

II.4.1. OCLUSIÓN DE LAS ARTERIAS ESPLÁNICAS EN LA RATA. VALORACIÓN DE PARÁMETROS HEMODINÁMICOS Y HEMATOLÓGICOS.

El shock por oclusión de las arterias esplánicas, causado por una isquemia prolongada de la región gastroentérica y su posterior reperfusión, es un modelo experimental que se

aproxima clínicamente a las alteraciones gastrointestinales causadas por problemas vasculares, como por ejemplo la arteriosclerosis.

Dicho modelo se basa en la oclusión temporal de uno o más vasos esplácnicos. En el momento de la desoclusión se produce un reajuste de líquidos en el compartimento vascular y hay liberación de diversos mediadores humorales, entre los que el PAF juega un papel importante (Mozes y cols., 1989; Filep y cols., 1989). Estos y otros mecanismos fisiopatológicos dan lugar a una caída en la presión arterial media y a una elevada mortalidad.

En el hombre, el tracto intestinal está irrigado por tres arterias principales, que corresponden a las tres áreas de desarrollo embrionario: el intestino anterior, el medio y el posterior. Estos tres grandes troncos arteriales, que proceden directamente de la aorta abdominal, son el tronco celíaco, la arteria mesentérica superior (arteria mesentérica anterior o craneal en animales) y la arteria mesentérica inferior (arteria mesentérica posterior o caudal en animales).

En la rata, las zonas irrigadas por dichas arterias son:

- tronco celíaco: vísceras abdominales craneales (estómago, bazo, páncreas, hígado y porción craneal del duodeno).
- a. m. anterior: mesenterio e intestino delgado.
- a. m. posterior: colon y recto.

Estos tres sistemas se conectan entre sí por circuitos anastomóticos que, en caso de lesiones crónicas de uno de ellos, permiten una compensación entre los mismos, explicando en muchos casos la ausencia de síntomas. En los casos de obstrucción aguda de una de estas arterias, sin embargo, no da tiempo a que se pongan en marcha los mecanismos de anastomosis. Se considera que al menos dos troncos arteriales principales deben estar afectados para producir sintomatología cuando la oclusión es crónica. Es por este motivo que la mayoría de autores utilizan una oclusión simultánea de la arteria mesentérica anterior y el tronco celíaco para provocar un estado de shock tras su desoclusión.

La rata es el animal de experimentación más utilizado para realizar este modelo de shock. Mientras que en especies como el perro se requieren períodos de isquemia de un mínimo de 2 h, en la rata son suficientes 40-45 min de oclusión arterial. Nosotros hemos utilizado un protocolo de isquemia de 45 min que, en nuestras condiciones, provoca alteraciones graves, similares a las descritas por otros autores con períodos idénticos de isquemia.

Soluciones a preparar:

- Uretano 13%: *ver II.1.1.*

- EDTA 5%: *ver II.1.1.*

Animales:

Se utilizan ratas Sprague-Dawley machos, de 230-250 g, mantenidas en ayunas las 18 h previas al experimento y con agua *ad libitum*.

Método:

Se anestesia al animal con uretano al 13% (10 mL/kg, i.p.). Se inmoviliza al animal, una vez anestesiado, sobre la mesa de operaciones termostatzada, y se procede a la realización de una traqueotomía y conexión a un transductor de presión según se ha descrito anteriormente (*ver II.2.2.1*). Se disecan también los paquetes vasculares femorales, en la cara medial de ambas extremidades posteriores. La vena femoral izquierda se canula con una palomilla de infusión para administrar el producto en infusión continua, y la femoral derecha se canula con una aguja y una jeringa de 1 mL para administrar el producto a estudiar en forma de bolus.

Se incide el abdomen por la línea alba, cortando sucesivamente piel, tejido subcutáneo y capa muscular. Mediante un retractor se mantienen separados ambos lados de la herida quirúrgica para facilitar la manipulación.

Se conectan polígrafo y amplificador y se comienza a registrar la presión arterial de forma continua durante todo el experimento.

Apartando la masa intestinal hacia el lado izquierdo del animal, se individualizan el tronco celíaco y la arteria mesentérica anterior con ayuda de dos pinzas de disección. Dichos vasos se ocluyen con la ayuda de dos pinzas hemostáticas de Dieffenbach.

Se resitúa el paquete intestinal y se saca el retractor, uniendo los labios de la herida mediante un par de puntos en la capa muscular. La superficie de la herida se mantiene humedecida con suero fisiológico con ayuda de unas gasas.

La oclusión se mantiene durante 45 min, pasados los cuales se vuelve a abrir la herida quirúrgica y se retiran cuidadosamente las pinzas de Dieffenbach. Se suturan las capas muscular y cutánea.

Pueden seguirse dos protocolos diferentes:

** Estudio del efecto reversor:*

Dos minutos después de haber retirado las pinzas hemostáticas, se administra el producto a estudiar en forma de bolus i.v. Cinco minutos después de dicho bolus, el producto se administra a la misma dosis/h mediante una infusión continua realizada por una bomba de infusión (0.02 mL/min, durante 30 min). Se valora la presión arterial y el tiempo de supervivencia.

** Estudio del efecto preventivo:*

El producto se administra 10 min antes de la extracción de las pinzas hemostáticas, en forma de bolus i.v., seguido de una infusión continua a la misma dosis/h hasta el final del experimento. Se valora la presión arterial y el tiempo de supervivencia.

Para estudiar los parámetros hematológicos (leucocitos, valor hematócrito y plaquetas) se realizan experimentos independientes, en los cuales se sigue el mismo protocolo anterior (preventivo), pero haciendo dos extracciones de sangre (0.5 mL cada vez) alternativamente por ambas venas yugulares externas, previamente disecadas. Los tiempos de extracción son los siguientes: 10 min antes de administrar el producto o vehículo (basal) y 1 h después de extraer las pinzas hemostáticas. La sangre se recoge con jeringas de 1 mL (con las cuales previamente se habrá aspirado y expulsado un volumen de EDTA 5% suficiente como para que las paredes del émbolo y la aguja queden impregnadas). Se extrae la aguja y la sangre se vierte y se agita cuidadosamente en tubos Eppendorf (que contienen a su vez 10 μ L de EDTA 5%) para su posterior análisis con un contador automático. Este proceso debe hacerse con cuidado, apoyando el extremo de la jeringa en las paredes interiores del tubo y dejando que la sangre resbale por ellas lentamente.

II.4.2. ISQUEMIA-REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA.

Las causas de muerte tras un infarto agudo de miocardio son varias. Entre ellas destacan el shock cardiogénico y la fibrilación, causas ambas estudiadas en nuestros modelos de isquemia-reperfusión. Otras causas de mortalidad son la rotura cardíaca y el fallo cardíaco secundario a edema pulmonar.

La oclusión coronaria aguda suele suceder en individuos que padecen una enfermedad aterosclerótica de gravedad. Si se produce una oclusión, la sangre deja de circular por el territorio afectado y llega un momento, si la oclusión se mantiene, en que el flujo sanguíneo no es suficiente como para permitir que se mantenga la funcionalidad de las fibras miocárdicas de esa zona. Cuando se da el caso de que hay fibras musculares que apenas funcionan o que no funcionan en absoluto, la capacidad global de bombeo del corazón se encuentra gravemente disminuída. Si el corazón no puede contraerse lo bastante como para enviar un volumen suficiente de sangre a la circulación periférica, se produce insuficiencia cardíaca y alteración

isquémica de los tejidos periféricos. Esta disminución del gasto cardíaco, junto con la isquemia tisular, son las dos bases del shock cardiogénico que puede definirse como la incapacidad del corazón -como consecuencia de una alteración en su función de bombeo- para suministrar un flujo sanguíneo suficiente a los tejidos como para satisfacer sus requerimientos metabólicos (Dole y O'Rourke, 1983).

Para estudiar el efecto de los antagonistas del PAF en la isquemia-reperfusión miocárdica se han utilizado tanto métodos *in vitro* como *in vivo*. En los estudios *in vivo* se pretende valorar en primer lugar los efectos de la oclusión de una arteria coronaria sobre parámetros electrocardiográficos y hemodinámicos. Es decir, efectos sobre el animal entero. Además, es posible valorar marcadores bioquímicos (mieloperoxidasa o lactato deshidrogenasa, por ejemplo) y hallazgos post-mortem como el tamaño del área de infarto usando la tinción con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC).

Por otra parte, en los estudios *in vitro* se valoran parámetros intrínsecos del propio miocardio (flujo coronario, presión del ventrículo izquierdo, etc.), siendo factible también valorar marcadores bioquímicos a partir del líquido de perfusado. Sin embargo, no hemos encontrado hasta hoy en la literatura ningún estudio en el que se combine el corazón aislado y la valoración de infarto con TTC. En unos experimentos previos de isquemia-reperfusión realizados *in vitro* en corazón de rata perfundido con líquido de Krebs-Henseleit, quisimos valorar el área de infarto con dicho método, de manera análoga a los experimentos que se venían realizando *in vivo*. Sorprendentemente, corazones cuyo funcionalismo había disminuído considerablemente, no mostraron apenas lesiones macroscópicas tras la tinción con TTC. Además, en el modelo *in vivo*, con idénticos tiempos de isquemia y perfusión, sí se producía una evidente alteración macroscópica. Estas observaciones nos llevaron a la consideración de que las células sanguíneas deberían tener una participación crucial en este modelo de isquemia-reperfusión, y nos sugirieron la conveniencia de introducir un perfusado de sangre diluida en el circuito de Langendorff. Esta modificación del sistema clásico permitiría ampliar el experimento *in vitro* de forma que se pudiera valorar la lesión miocárdica macroscópica sin necesidad de realizar experimentos *in vivo* adicionales.

II.4.2.1. *In vitro*.

Para valorar el efecto antiisquémico de un compuesto *in vitro* se utiliza la técnica del corazón aislado. El empleo de la técnica del corazón aislado de mamífero fue descrita por primera vez por Oscar Langendorff a finales del siglo pasado y viene utilizándose desde entonces, con distintas modificaciones, como test de screening de fármacos con actividad sobre el inotropismo cardíaco. Asimismo, esta técnica permite valorar efectos sobre la frecuencia cardíaca y el flujo coronario (Döring y Dehnert, 1988), así como otros parámetros hemodinámicos.

Tras la medición de los parámetros basales pre-isquemia, el corazón se somete a un determinado periodo de isquemia (anulando o reduciendo la perfusión del líquido nutricional), tras el cual se reinstaura el flujo de perfusión basal. En estas condiciones, los corazones control suelen sufrir una disminución considerable de su contractibilidad y, en general, de su funcionalismo. Este fenómeno puede prevenirse si en el líquido de perfusión se halla disuelto un fármaco antiisquémico, como pueden ser el cromakalim y el pinacidil (Grover y cols., 1990), o antagonistas del calcio (Buser y cols., 1991).

Como ya se ha comentado, se ha introducido en el protocolo clásico de isquemia-reperfusión en corazón aislado la valoración del infarto por tinción del miocardio con TTC. La tinción con TTC es una técnica muy utilizada para valorar el tamaño del infarto en modelos *in vivo*. Se ha demostrado que hay una buena correlación entre la extensión de la lesión medida con TTC y la valorada mediante examen histológico (Werns, 1991). El tetrazolio reacciona con NADH en presencia de deshidrogenasas y provoca que el tejido que contiene dichas enzimas cambie a un color descrito como "rojo ladrillo". Las áreas infartadas pierden estas enzimas rápidamente y por tanto no muestran signos de coloración.

Este grupo de experimentos *in vitro* se ha dividido en dos grandes bloques: por un lado se han estudiado varios protocolos de isquemia-reperfusión administrando sangre diluida con el fin de apoyar la hipótesis de que es necesaria la intervención de elementos sanguíneos para producir infarto. En una segunda fase se ha elegido el protocolo más adecuado de todos los estudiados para valorar el efecto de los antagonistas del PAF.

II.4.2.1.1. Preparación del corazón aislado de rata.

Soluciones a preparar:

- Pentobarbital sódico 6 mg/mL: ver II.1.1.

- Líquido de perfusión Krebs-Henseleit:

<u>producto</u>	<u>g/L</u>
NaCl	6.9
KCl 10%	3.5
NaHCO ₃	2.1
CaCl ₂ 10%	2.78
MgSO ₄ 5%	3.96
KH ₂ PO ₄ 1%	16.1
Glucosa	1.0

- Productos en estudio: los productos a estudiar se disuelven en el líquido de perfusión a la concentración deseada.

Animales:

Se utilizan ratas Sprague-Dawley, machos, con un peso de 200-225 g para realizar la extracción del corazón, y con un peso de 300 g para la obtención de sangre.

Método:

** Preparación del corazón:*

El animal se hepariniza con 0.2 mL de heparina sódica comercial al 5%, por vía i.p. Diez minutos después, se anestesia con pentobarbital sódico (6 mg/mL, 10 mL/kg, i.p.) y se procede a abrirle el tórax. Se conecta el animal a una bomba de respiración. Se extraen el corazón y los pulmones y se colocan en una placa de Petri con solución de Krebs-Henseleit a 37°C, a fin de limpiar un poco la preparación.

El corazón se suspende por la aorta del extremo inferior de la cánula en "Y" del baño de Langendorff. El líquido nutricio debe estar ya pasando a través del circuito. Se ligan las venas cava y pulmonar y se desprenden los pulmones.

Se introduce un pequeño globo de látex dentro del ventrículo izquierdo, conectado mediante una cánula metálica a un transductor de presión. Se utilizan balones del nº 4 ó 5, dependiendo del tamaño del corazón.

** Preparación de la sangre diluida:*

Se anestesia la rata con éter dietílico anestésico y se extrae la sangre mediante punción cardíaca, utilizando jeringas de 20 mL (con las cuales previamente se habrá aspirado y expulsado un volumen de heparina suficiente como para que las paredes del émbolo y la aguja queden impregnadas). A continuación la sangre extraída se diluye en una proporción 1:1 con el líquido de Krebs-Henseleit.

** Protocolo de isquemia-reperfusión:*

- Controles con sangre:

La preparación se deja estabilizar durante unos 10 min. Una vez transcurrido este tiempo, se cierra el paso de líquido nutricio con ayuda de una pinza de Kocher y se administra la sangre diluida durante 30 s a través de la rama libre de la cánula en "Y". Para ello se utiliza una bomba de infusión continua a una velocidad de 2.5 mL/min. Una vez finalizada esta infusión comienza el período de isquemia, ya que tanto el paso de líquido nutricio como el de sangre se hallan interrumpidos. La situación de isquemia se prolonga durante 10, 15 ó 20 min (según el protocolo utilizado). Pasado este tiempo se vuelve a infundir sangre durante 2 min y posteriormente se saca la pinza de Kocher para que vuelva a llegar el líquido nutricio. Este período de reperfusión se continúa durante 8, 13 ó 18 min (según el protocolo).

- Controles sin sangre:

Se procede igual que los controles con sangre pero la sangre diluida se sustituye por el líquido de Krebs-Henseleit.

- Tratamientos:

Cuando se administra alguno de los tratamientos, el protocolo utilizado es el más largo de los tres que se han estudiado, es decir, 20 min de isquemia y 20 min de reperfusión.

La preparación se deja estabilizar durante 10 min, distribuidos de la siguiente manera:

- Los 5 primeros minutos se perfunde con el Krebs-Henseleit solo.

- A continuación se cambia el contenido del reservorio situado en la parte superior del aparato de Langendorff, añadiendo el fármaco a estudiar disuelto en Krebs-Henseleit, continuando la perfusión durante 5 min.

El resto del protocolo es idéntico al que se ha descrito para los controles con sangre. La reperfusión se realiza con el fármaco disuelto en el líquido de perfusión.

II.4.2.1.2. Determinación de alteraciones hemodinámicas en corazón aislado de rata.

Para valorar el flujo coronario se recoge el líquido de perfusión que sale del corazón en un Eppendorff situado justo bajo el vértice cardíaco. El volumen se mide con ayuda de una probeta graduada, expresándose el resultado en mL/min.

A partir del registro de presión obtenido, se valoran los siguientes parámetros:

- Frecuencia cardíaca (latidos/min)

- Presión sistólica (mmHg)
- Presión telediastólica (mmHg)

A partir de los parámetros anteriores se calculan los siguientes:

- Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (mmHg) =
Presión sistólica - Presión telediastólica
- Producto presión-frecuencia (mmHg/min) =
Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo - Frecuencia cardíaca

Las mediciones se realizan en los siguientes tiempos: valor basal (pre-isquemia) y 5, 10, 15 y 20 min tras la reperfusión.

II.4.2.1.3. Determinación del área de infarto en corazón aislado de rata.

Soluciones a preparar:

- Solución de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) 1%: se pesan 100 mg de TTC y se disuelven en 10 mL de tampón fosfato a pH=7.4. Esta solución se prepara diariamente y se mantiene protegida de la luz.

- Solución de KCl 10%: se pesan 200 mg de KCl y se disuelven en 20 mL de agua bidestilada. Se mantiene en nevera hasta el momento de su utilización.

Método:

Una vez finalizado el protocolo descrito en *II.4.2.1.1*, se saca el corazón del Langendorff y se sumerge rápidamente en KCl frío para provocar su asistolia inmediata. Una vez conseguido esto, se eliminan las aurículas y los vasos mayores y se cortan los ventrículos en láminas lo más finas posible, en sentido perpendicular al eje longitudinal del corazón, con ayuda de una hoja de bisturí.

Los trozos de miocardio se incuban por separado en la solución de TTC a 37°C durante 15 min. La incubación con este producto da lugar a una coloración rojiza en las zonas en donde hay deshidrogenasas, es decir, en las zonas no infartadas. Los infartos no se tiñen y permanecen de color pálido.

Las láminas de miocardio se colocan, lo más planas posible, entre dos portaobjetos. Se mide, en cada lado de la preparación, el área total y el área de infarto mediante el analizador de imágenes Smart® (Letica) y se calcula el porcentaje de infarto con respecto al área total.

II.4.2.1.4. Determinación de la lactato deshidrogenasa (LDH) en el perfusado de corazón aislado de rata.

Se utiliza el método descrito en *II.4.2.1.1* y se recogen muestras del líquido de perfusión en cuatro tiempos previamente determinados (una recogida basal, durante el primer minuto tras la reperfusión, durante los minutos 2 y 3, y durante los minutos 4 a 10). La valoración de la LDH se hace mediante un contador de microplacas, realizando las muestras por triplicado. Esta metodología la hemos validado previamente comparando los resultados obtenidos con el método tradicional (equipo de reactivos para valoración de LDH, Boehringer Mannheim).

II.4.2.1.5. Determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO) en corazón aislado de rata.

Se utiliza el método descrito en *II.4.2.1.1* y, al final del experimento, se congelan los corazones hasta la valoración de la MPO.

** Obtención del homogenado:*

Soluciones a preparar:

- Bromuro de hexadeciltetrametilamonio (HTAB) 0.5%: se pesa 1 g y se disuelve en 200 mL de agua bidestilada.

Método:

Se descongela el corazón y se trocea en fragmentos lo más pequeños posibles. Se pasan los trozos a un tubo de centrifuga y se les añade 8 mL de HTAB al 0.5%. Se pasa por el triturador durante 1 min, poniendo el tubo en un baño de hielo.

La muestra obtenida se filtra con ayuda de una gasa y se recoge en un vaso de 10 mL, que se mantiene en una bandeja con hielo. Se introduce en el recipiente del homogenizador y se homogeniza 15 veces a 1000 rpm. Cada homogenado se reparte en tubos Eppendorff (0.5 mL por tubo) y se somete a un proceso de congelación/descongelación que se repite tres veces. Para hacer esto se ponen los tubos en una gradilla metálica que se sumerge en una bandeja con acetona, añadiendo nieve carbónica hasta que se congelan. Se descongelan a temperatura ambiente.

Las distintas alícuotas de cada problema se juntan en un tubo de plástico de 10 mL, que se centrifuga a 10000 rpm durante 30 min a 4°C. Una vez centrifugado, se mide el volumen de sobrenadante y se congela a -70°C hasta su valoración.

** Determinación de proteína por el método de Bradford:*

Soluciones a preparar:

- Seroalbúmina bovina (BSA) 25 µg/mL: se pesan 5 mg y se disuelven en 200 mL de agua bidestilada. Esta solución se guarda en nevera a 4°C durante 15 días.

Método:

Para realizar una recta patrón se utilizan tubos de plástico de 10 mL, que se llenan con un volumen determinado de la solución de BSA a distintas concentraciones:

- 25 µg/mL (1.6 mL de la solución de BSA ya preparada)
- 12.5 µg/mL (1.6 mL del tubo anterior + 1.6 mL de agua bidestilada)
- 6.25 µg/mL (1.6 mL del tubo anterior + 1.6 mL de agua bidestilada)
- 3.12 µg/mL (1.6 mL del tubo anterior + 1.6 mL de agua bidestilada)
- 1.56 µg/mL (1.6 mL del tubo anterior + 1.6 mL de agua bidestilada)

Estos tubos se preparan por duplicado. Se agitan bien y se extraen 1.6 mL de cada uno (excepto el primero), para que todos tengan el mismo volumen. Se prepara también un tubo que servirá como blanco (1.6 mL de agua bidestilada).

Se añaden a cada tubo 400 µL de Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH) y se procede a su lectura con el espectrofotómetro ($\lambda=595$ nm). Se ponen primero los dos blancos en cubetas de plástico desechables, y luego se van añadiendo las distintas concentraciones en orden creciente, dejando siempre una cubeta en blanco en el lugar más interior del espectrofotómetro. De esta forma se obtienen los distintos puntos que constituirán la recta patrón.

A continuación se determina la proteína de los sobrenadantes problema, previamente descongelados. Tras medir el volumen total, se toman 10 µL y se llevan a 10 mL con agua bidestilada en un matraz aforado. De esta solución se toman 1.6 mL y se añaden 400 µL de Bio-Rad Protein Assay. Se agita, se pone en la cubeta del espectrofotómetro y se procede a su lectura. Esto se realiza con todas las muestras problema.

** Determinación de la actividad enzimática MPO:*

Soluciones a preparar:

- Fosfato monosódico 0.2 M: se pesan 27.6 g y se disuelven en 1 L de agua bidestilada. Esta solución se guarda en la nevera a 4°C.

- Fosfato disódico dihidrato 0.2 M: se pesan 3.56 g y se disuelven en 100 mL de agua bidestilada. Esta solución se guarda en la nevera a 4°C.

- Tampón fosfato: se prepara a partir de las dos soluciones anteriores: Se toman 100 mL de la primera solución y se añade la cantidad necesaria de la segunda para obtener un pH de 5.4.

- Tetrametilbenzidina (TMB) 4.8 mg/dL: se pesan 24 mg y se disuelven en 5 mL de dimetilformamida.

- Peróxido de hidrógeno 0.3 mM: 0.5 mL de peróxido de hidrógeno 30% se llevan a 100 mL con agua bidestilada.

Método:

Se procede a la lectura con el espectrofotómetro ($\lambda=655$ nm), con el baño a 37°C. En una cubeta de cuarzo para espectro visible se van añadiendo:

- 200 μ L de TMB
- 1 mL de agua bidestilada
- 1.52 mL de tampón fosfato pH=5.4
- 500 μ L del sobrenadante problema

En el momento de iniciar la reacción se añaden 20 μ L de H₂O₂ 0.3 mM. Se agita la cubeta y se introduce en el espectrofotómetro. Tras un tiempo de equilibración de 40 s se realizan 4 lecturas en 1 min.

Cálculos:

La actividad MPO se expresa como incremento de absorbancia/min/mg proteína, y se calcula de la siguiente forma:

volumen cubeta (0.5 mL) x concentración de proteína (mg/mL) = x mg añadidos a la cubeta

actividad MPO = incremento de absorbancia/min x $1/x$ mg

II.4.2.2. *In vivo*.

La ligadura de una arteria coronaria en animal de experimentación es una técnica ampliamente utilizada para producir tanto episodios arrítmicos como zonas de infarto. La utilización de especies de tamaño grande, como el perro, ha demostrado ser poco conveniente, no sólo por motivos económicos, sino también debido a la gran variabilidad en la respuesta a la oclusión. Hace ya casi 40 años que se describió la primera técnica sencilla y que permitía obtener resultados muy homogéneos en la rata (Selye y cols., 1960). La gran ventaja de esta especie es que presenta, como el cerdo y los primates, pocas arterias coronarias colaterales; es decir, las coronarias son arterias terminales y las isquemias provocadas por la oclusión serán mucho más uniformes que en otras especies (Johns y Olson, 1954; Maxwell y cols., 1987).

En nuestros estudios hemos utilizado dos protocolos diferentes de isquemia-reperfusión, utilizando en ambos la misma técnica quirúrgica (que es básicamente la descrita por Selye). Con un protocolo corto (6 min de isquemia y 10 min de perfusión) podemos valorar los fenómenos arrítmicos y los cambios hemodinámicos. Con un protocolo más largo (20 min de isquemia y 20 min de perfusión) se produce una lesión suficiente como para poder valorar el tamaño del infarto con la técnica de tinción con TTC, ya descrita. La arteria elegida para realizar la oclusión es la coronaria izquierda, que es la principal responsable de la irrigación del ventrículo izquierdo.

II.4.2.2.1. Oclusión y reperfusión de la arteria coronaria izquierda en la rata anestesiada.

Soluciones a preparar:

- Uretano 13%: *ver II.1.1.*

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

Animales:

Se utilizan ratas Sprague-Dawley machos, con un peso aproximado de 300 g, mantenidas en ayunas durante las 24 horas previas al experimento, y con agua *ad libitum*.

Método:

Se anestesia el animal con uretano al 13% (10 mL/kg, i.p.). Se rasura el hemitórax izquierdo para facilitar el abordaje torácico. Se coloca al animal en decúbito supino y se conectan las extremidades a los electrodos de un electrocardiógrafo.

Se realiza una traqueotomía y se insertan dos catéteres: uno en la carótida izquierda para valorar la presión arterial (*ver II.2.2.1*), y otro en la vena yugular derecha para la administración del producto. Además, se realiza una pequeña incisión en la cara interna de la pata trasera derecha para acceder a la vena femoral, otra vía de acceso para la administración del producto.

Una vez realizados estos pasos, se comienza a registrar la presión arterial con un polígrafo, que recibe la señal de un transductor al cual se ha conectado el catéter procedente de la arteria carótida. Se realiza simultáneamente un electrocardiograma (derivación II). Dichas mediciones representan los valores basales de ambos parámetros (presión arterial y actividad electrocardiográfica).

Con un bisturí se realiza una incisión cutánea en el hemitórax izquierdo, paralela al esternón, y de una longitud aproximada de 3 cm. Con ayuda de unas tijeras se separa la piel del tejido subcutáneo por disección roma.

Se incide la fascia muscular y se separan los músculos pectoral superficial y pectoral profundo, intentando producir la mínima hemorragia posible. Las hemorragias causadas por la sección de los vasos intercostales se detendrán por pinzamiento o, en caso necesario, por ligadura con seda quirúrgica. Se expone así el 4º espacio intercostal, lugar indicado para realizar la toracotomía.

Antes de abrir el tórax, se realiza una sutura "en bolsa de tabaco" en la capa muscular para facilitar el cierre rápido de la cavidad torácica.

Se incide cuidadosamente con unas tijeras de punta roma en el músculo del 4º espacio intercostal. En ese momento, la cánula de la traqueotomía debe conectarse a una bomba de respiración (60 emboladas/min; 1 mL de aire/100 g de peso) puesto que el pulmón queda colapsado y el animal no puede respirar por sí solo.

Se agranda la incisión torácica lateralmente hacia ambos lados y se cortan las costillas 4ª y 5ª para agrandar la abertura. Se introduce un separador (nosotros utilizamos un blefarostato de oftalmología humana, que tiene un tamaño muy adecuado, es atraumático y es muy rápido de colocar) para mantener los bordes de la toracotomía separados.

Con unas pinzas con diente de ratón se pinza muy cuidadosamente el pericardio (poniendo extremo cuidado en no dañar el miocardio ventricular o auricular, o alguno de los grandes vasos) y se incide con unas tijeras de punta roma, con el fin de que el corazón pueda exteriorizarse.

Con ayuda de un asa fabricada con alambre, a la que se ha dado forma de "V", se saca el corazón fuera de la abertura y se gira ligeramente para mostrar su cara izquierda. Con el extremo agudo de la "V" se mantiene levantada la aurícula izquierda para visualizar la arteria coronaria descendente, que tiene su inicio justamente en ese punto. Se pasa una sutura atraumática (C-8,

6/0) por debajo de la coronaria, con cuidado de no incidir demasiado en el miocardio que la rodea.

Se vuelve a introducir el corazón en el tórax y se pasan los dos extremos de la sutura por el interior de un fino tubo de polietileno (0.59 mm diámetro interno, 0.97 mm diámetro externo). Se cierra la sutura en bolsa de tabaco colocada previamente.

Todo este proceso quirúrgico debe realizarse lo más rápidamente posible. Todo animal cuya presión arterial quede muy por debajo de su valor inicial o que presente alteraciones en su ritmo cardíaco debe ser excluido del experimento.

Para realizar la oclusión se tira de los dos extremos de la sutura que sobresalen del tubo de plástico al tiempo que se oprime éste contra el corazón. De esta manera el vaso queda ocluido. Para fijar la oclusión se coloca una pinza de Dieffenbach en el extremo externo del tubo, sujetando los dos cabos del hilo de sutura.

La oclusión se mantiene durante 6 ó 20 min (según el protocolo), pasados los cuales se saca la pinza de Dieffenbach y el tubo para que se produzca la reperfusión del miocardio. Tras un período de reperfusión de 10 ó 20 min (según el protocolo) se sacrifican los animales que hayan sobrevivido.

II.4.2.2.2. Determinación de alteraciones electrocardiográficas y hemodinámicas en la rata anestesiada.

Método:

Se realiza una oclusión de la arteria coronaria izquierda tal y como se ha descrito en II.4.2.2.1 y se mantiene durante 6 min, pasados los cuales se saca la pinza de Dieffenbach y el tubo para que se produzca la reperfusión del miocardio, reperfusión que se mantiene durante 10 min.

El producto a estudiar o el vehículo se administran 10 min antes de la oclusión, en forma de bolus (1 mL/kg), seguido de una infusión continua que dura hasta el final del experimento. Tanto durante el período de oclusión como durante el de reperfusión se registra la presión arterial y se realiza también un electrocardiograma continuo.

Al final del experimento se valora:

- supervivencia al final del período de reperfusión
- presencia de arritmias (taquicardia y/o fibrilación ventricular) en el período de oclusión y en el período de reperfusión
- tiempo de aparición y duración de las arritmias en el período de oclusión y en el de reperfusión
- alteraciones hemodinámicas: presión arterial media, sistólica y diastólica, frecuencia cardíaca e índice presión-frecuencia.

II.4.2.2.3. Determinación del área de infarto en miocardio de rata.

Soluciones a preparar:

- Solución de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) 1%: se pesan 100 mg de TTC y se disuelven en 10 mL de tampón fosfato a pH=7.4. Esta solución se prepara diariamente y se mantiene protegida de la luz.

- Solución de azul de Evans 5%: se pesan 500 mg de azul de Evans y se disuelven en 10 mL de suero fisiológico.

- Solución de KCl 10%: se pesan 200 mg de KCl y se disuelven en 20 mL de agua bidestilada. Se mantiene en nevera hasta el momento de su utilización.

Método:

Se realiza una oclusión de la arteria coronaria izquierda tal y como se ha descrito en *II.4.2.2.1* y se mantiene durante 20 min, pasados los cuales se saca la pinza de Dieffenbach y el tubo de plástico para que se produzca la reperfusión del miocardio, reperfusión que se mantiene durante otros 20 min.

El compuesto a estudiar o el vehículo se administran en forma de bolus (1 mL/kg) 5 min antes de la desoclusión, y se continúan administrando hasta el final del experimento mediante una bomba de infusión (velocidad: 0.3 mL/min) a una dosis por minuto igual a la administrada mediante bolus.

Al finalizar el experimento, se ocluye de nuevo la arteria coronaria y se administran, a través de la yugular, 2 mL de una solución de azul de Evans. Se espera unos 2 min hasta que el colorante se haya distribuido por todo el sistema circulatorio del animal.

Se extrae rápidamente el corazón y se sumerge en KCl frío para producir su asistolia. Todo el miocardio queda teñido de color azul excepto el área irrigada por la arteria coronaria ocluida. Esto es lo que llamamos área de riesgo.

Se eliminan las aurículas, los vasos mayores y el ventrículo derecho. El ventrículo izquierdo se corta en finas láminas como se ha descrito en el apartado *II.4.2.1.3* y se separa cuidadosamente de cada lámina el área teñida de la que no lo está (área de riesgo). Pesando en una balanza todos los fragmentos se calcula el porcentaje de área de riesgo con respecto a la totalidad del ventrículo izquierdo.

El área teñida se despreja y los fragmentos de área de riesgo se llevan a incubación con TTC a 37°C durante 15 min, calculándose el porcentaje de área de infarto tal como se ha descrito en el apartado *II.4.2.1.3*.

II.4.2.2.4. Determinación de la lactato deshidrogenasa (LDH) en el plasma de rata.

Soluciones a preparar:

- EDTA 5%: ver II.1.1.

Método:

Se realiza una oclusión de la arteria coronaria izquierda tal y como se ha descrito en II.4.2.2.1. Los períodos de isquemia y reperfusión, y el protocolo de administración de los compuestos a estudiar son los mismos que se ha descrito en II.4.2.2.3. Se extraen dos muestras de sangre (2 mL cada vez) por la vena yugular previamente disecada. Los tiempos de extracción son los siguientes: inmediatamente antes de la oclusión (basal) y al final del período de reperfusión. La sangre se recoge con jeringas de 5 mL (con las cuales previamente se habrá aspirado y expulsado un volumen de EDTA 5% suficiente como para que las paredes del émbolo y la aguja queden impregnadas). Se extrae la aguja y la sangre se vierte y se agita cuidadosamente en tubos de centrifuga de 3 mL (que contienen a su vez 200 µL de EDTA 5%). Este proceso debe hacerse con cuidado, apoyando el extremo de la jeringa en las paredes interiores del tubo y dejando que la sangre resbale por ellas lentamente. Los tubos se centrifugan a 1000 g durante 15 min. Se separa el plasma y se guarda en nevera hasta el momento de realizar el análisis.

La valoración de la LDH se hace mediante un contador de microplacas, como ya se ha comentado en II.4.2.1.4.

II.4.2.2.5. Determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO) en miocardio de rata.

Se realiza una oclusión de la arteria coronaria izquierda tal y como se ha descrito en II.4.2.2.1. Los períodos de isquemia y reperfusión, y el protocolo de administración de los

compuestos a estudiar son los mismos que se han descrito en *II.4.2.2.3*. Al final del experimento, se extraen los corazones y se congelan hasta el momento de realizar el análisis.

La valoración de la MPO se realiza exactamente igual a como se ha descrito para los corazones del experimento *in vitro* (*II.4.2.1.5*).

II.5. Shock endotóxico

En diferentes modelos animales, la administración de endotoxina puede simular ciertos aspectos del síndrome séptico y, aunque los efectos causados por la endotoxina no son exactamente iguales a los producidos en un verdadero modelo de sepsis, el shock endotóxico ha sido y sigue siendo un modelo extremadamente útil y ventajoso (Wichterman y cols., 1980). La administración de endotoxinas a los animales de experimentación produce la aparición de un estado de shock caracterizado por una profunda hipotensión sistémica, coagulación vascular diseminada, lesiones en diversos órganos, etc. La mayoría de las consecuencias patológicas de la endotoxina tienen lugar a través de la liberación de mediadores endógenos, uno de los cuales es el PAF (Handley, 1990b; Koltai y cols., 1993).

Los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos o endotoxinas son sustancias ubicuas que forman parte de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, incluyendo *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* y otros géneros. No se destruyen al autoclave ni por tratamiento con ácidos, solventes orgánicos o líquidos de esterilización (Elin y Wolff, 1973). La endotoxina es el componente de la bacteria Gram negativa responsable de muchas de las propiedades patológicas del organismo entero (Westphal, 1975).

La molécula de LPS está compuesta por tres partes: un lípido A que contiene ácidos grasos y otros constituyentes, un oligosacárido específico de la cepa (hexosa y amino hexosas), y un O-antígeno tipo-específico constituido por series de tetrasacáridos repetidos (Hunt, 1985). El lípido A se une a una glicoproteína llamada LBP (*lipopolysaccharide binding protein*), cuya concentración plasmática se incrementa en unas 100 veces, como parte de lo que se ha dado en llamar fase aguda de respuesta a la infección. El complejo LPS-LBP se une a un receptor, CD14, en monocitos y macrófagos (Aldridge, 1993).

Hay una gran variación con respecto a la sensibilidad animal a la endotoxina. Ratones y ratas son relativamente resistentes pero exhiben respuestas reproducibles y homogéneas cuando se les administra endotoxina en un rango de miligramos. Los cerdos domésticos responden en un rango de 0.05-0.20 mg/kg, pero los conejos y ovejas son significativamente más sensibles, respondiendo en un rango de pocos microgramos (Galanos y cols., 1979). La mínima dosis pirogénica en humanos es 0.1-0.5 ng/kg, haciendo de ellos la más sensible de todas las especies (Dinarelo, 1983).

En nuestros estudios hemos intentado abarcar un amplio espectro de lo que consideramos como "marcadores" del shock, es decir, alteraciones características que tienen lugar tras la administración de una cierta dosis de endotoxina (Giral y cols., 1996). Estos marcadores son la hipotensión, la leucopenia, la trombocitopenia, la hemoconcentración, la coagulación intravascular diseminada, y los cambios en algunos parámetros bioquímicos y enzimáticos, sin olvidar la mortalidad inducida por la propia endotoxina.

Se han utilizado dos tipos de endotoxina, provenientes de dos cepas distintas de *Escherichia coli*, suministradas por Sigma y Difco. Las endotoxinas comerciales se presentan en forma de polvo liofilizado preparado utilizando un procedimiento de extracción con fenol o con ácido tricloroacético, según el caso.

Se ha utilizado el serotipo más conveniente para cada experimento: en el estudio de la permeabilidad vascular, por ejemplo, se utilizó el 0127:B8 porque una serie de pruebas preliminares demostraron que provocaba mayor aumento de la permeabilidad que el 0111:B4. También se tuvo que variar la procedencia de la endotoxina y utilizar el serotipo 0111:B4 de Difco al observar que el mismo serotipo procedente de Sigma producía poca mortalidad cuando se administraba en el ratón.

II.5.1. VALORACIÓN DE LA HIPOTENSIÓN INDUCIDA POR ENDOTOXINA EN LA RATA ANESTESIADA.

Soluciones a preparar:

- Pentobarbital sódico (6 mg/mL): ver II.1.1.

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

- Solución de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, serotipo 0111:B4 (Sigma), 20 mg/kg:
se pesan 100 mg de LPS y se disuelven en 5 mL de suero fisiológico.

- Solución de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, serotipo 0127:B8 (Sigma), 15 mg/kg:
se pesan 75 mg de LPS y se disuelven en 5 mL de suero fisiológico.

Animales:

Se utilizan ratas Sprague Dawley machos, de 250-275 g de peso, mantenidas en ayunas y con agua *ad libitum*.

Método:

Se anestesia el animal con pentobarbital sódico 6 mg/mL, administrado vía i.p. en un volumen de 10 mL/kg. Se inmoviliza el animal, una vez anestesiado, sobre la mesa de operaciones termostatzada, y se procede a la realización de una traqueotomía, mediante un catéter de polietileno de 2 mm de diámetro interno.

Se introduce un catéter en la arteria carótida izquierda (*ver II.2.2.1*) para registrar la presión arterial. Se disecan los paquetes vasculares femorales, en la cara medial de ambas extremidades posteriores. Las venas femorales serán las vías de administración de los distintos productos y de la endotoxina.

Una vez realizada la manipulación quirúrgica, se espera a que la presión arterial se estabilice. Durante toda la prueba, la anestesia se mantiene mediante la administración de pentobarbital sódico por vía i.p., a un ritmo aproximado de 20 mg/kg/h.

II.5.1.1. Protocolo reversor.

Método:

A través de una de las venas femorales, se administra la endotoxina (LPS 0127:B8 15 mg/kg o bien 0111:B4 20 mg/kg) en un volumen de 1 mL/kg. Una hora después, se administra el producto a estudiar (o bien el vehículo) a través de la otra vena femoral, en un volumen de 1 mL/kg. La presión arterial se monitoriza continuamente hasta el final del experimento.

A las 2 h de haber administrado la endotoxina se detiene el experimento y se sacrifica el animal.

II.5.1.2. Protocolo preventivo.

Método:

Se administra el producto a estudiar (o bien el vehículo), a través de una de las venas femorales, en un volumen de 1 mL/kg. Cinco o 10 min después, a través de la otra vena femoral, se administra la endotoxina (LPS 0127:B8 15 mg/kg o LPS 0111:B4 20 mg/kg, respectivamente) en un volumen de 1 mL/kg. La presión arterial se monitoriza continuamente hasta el final del experimento.

A las 2 h de haber administrado la endotoxina se detiene el experimento y se sacrifica el animal.

II.5.2. VALORACIÓN DE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN LA RATA CON SHOCK ENDOTÓXICO.

Soluciones a preparar:

- EDTA 5%: ver II.1.1.

- Solución de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, serotipo 0111:B4 (Sigma), 20 mg/kg: ver II.5.1.

Método:

Para valorar los parámetros hematológicos se utiliza el protocolo preventivo (*ver II.5.1.2*).

Se diseccionan las dos venas yugulares y se realiza la toma de muestras de sangre alternativamente en ambos vasos (0.5 mL cada vez). Los tiempos de toma de muestras son: justo antes de la administración del producto o vehículo (basal), y 5 y 45 min tras la administración de LPS. La sangre se recoge con jeringas de 1 mL (con las cuales previamente se habrá aspirado y expulsado un volumen de EDTA 5% suficiente como para que las paredes del émbolo y la aguja queden impregnadas). Se extrae la aguja y la sangre se vierte y agita cuidadosamente en tubos Eppendorf (que contienen a su vez 10 µL de EDTA 5%) para su posterior análisis con un contador automático. Este proceso debe hacerse con cuidado, apoyando el extremo de la jeringa en las paredes interiores del tubo y dejando que la sangre resbale por ellas lentamente.

II.5.3. VALORACIÓN DE LA MORTALIDAD INDUCIDA POR ENDOTOXINA EN LA RATA Y EN EL RATÓN CONSCIENTES.

** en la rata:*

Soluciones a preparar:

- Solución de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, serotipo 0127:B8 (Sigma), 5 mg/kg: se pesan 50 mg de LPS y se disuelven en 20 mL de suero fisiológico.

Animales:

Se utilizan ratas Sprague-Dawley machos, de 110-125 g de peso, mantenidas en ayunas y con agua *ad libitum*.

Método:

Las ratas se distribuyen al azar en grupos de 5. Utilizando un potro de inmovilización, se administra la endotoxina por una de las venas caudales (2 mL/kg). Los productos a estudiar se administran 5 min (i.v.) o 30 min (p.o.) antes de la endotoxina.

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

Una vez finalizada la inyección de la endotoxina, se dejan los animales en observación durante 24 h y se contabiliza el número de animales muertos.

* *en el ratón:*

Soluciones a preparar:

- Solución de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, serotipo 0111:B4 (Difco), 20 mg/kg: se pesan 60 mg de LPS y se disuelven en 30 mL de suero fisiológico.

Animales:

Se utilizan ratones Swiss machos, de 22-26 g de peso, mantenidos en ayunas y con agua *ad libitum*.

Método:

Los ratones se distribuyen al azar en grupos de 10. Utilizando un potro de inmovilización, se administra la endotoxina por una de las venas caudales (10 mL/kg). Los productos a estudiar se administran 5 min (i.v.) o 30 min (p.o.) antes de la endotoxina.

Como en el caso de la rata, la cola de los animales se sumerge en un vaso de precipitados con agua caliente para facilitar la administración.

Una vez finalizada la inyección de la endotoxina, se dejan los animales en observación durante 24 h y se contabiliza el número de animales muertos.

Cálculo de los resultados:

Tanto en los experimentos realizados en la rata como en el ratón, se calcula el porcentaje de inhibición causado por el tratamiento según la fórmula:

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

Los resultados se expresan como DI_{50} .

II.5.4.- DETERMINACIÓN DE CAMBIOS INDUCIDOS POR ENDOTOXINA EN LA PERMEABILIDAD VASCULAR EN TEJIDOS EN LA RATA.

Los estudios de permeabilidad vascular se han dividido en dos partes. En primer lugar, se han realizado una serie de pruebas utilizando tres dosis de endotoxina y analizando ocho órganos diferentes. Estas pruebas han permitido determinar cuál es la dosis más adecuada de endotoxina

y cuáles son los órganos que muestran un aumento significativo de la permeabilidad vascular. A partir de estos datos, se ha realizado un estudio de la actividad de los antagonistas del PAF en la extravasación inducida por endotoxina sobre tráquea, timo y vesícula seminal de rata.

II.5.4.1. Estudios de distribución tisular.

Soluciones a preparar:

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

- Solución de azul de Evans (1%): se pesan 100 mg y se disuelven en 10 mL de suero fisiológico.

- Solución de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, serotipo 0127:B8 (Sigma), (10, 25 o 40 mg/kg) en azul de Evans 1%: se pesan 100, 250 o 400 mg de LPS y se disuelven en 10 mL de la solución de azul de Evans preparada anteriormente.

- Solución de sulfato sódico 0.5% y acetona (30:70 v/v): se vierten 210 mL de acetona en un vaso de precipitados. Se añaden lentamente y con agitación suave y continua 90 mL de una solución de sulfato sódico al 0.5% en agua destilada.

Animales:

Se utilizan ratas Sprague-Dawley machos, con un peso de 180-220, mantenidas en ayunas durante las 24 h previas al experimento, y con agua *ad libitum*.

Método:

Se anestesia el animal con pentobarbital sódico (6 mg/mL, 10 mL/kg, i.p.). Se inyecta la endotoxina disuelta en azul de Evans por una de las venas femorales (1 mL/kg).

Transcurrida 1 h, se exsanguina el animal mediante punción cardíaca. Se disecan y se pesan los siguientes órganos: tráquea, parénquima pulmonar, timo, corazón, estómago, duodeno, yeyuno y vesícula seminal. El colorante azul de Evans se extrae en una solución de sulfato sódico 0.5% y acetona a 20°C durante 24 h (se usan 2 mL por órgano, excepto en el caso de estómago, duodeno y yeyuno, con los que se utilizan 4 mL). A continuación, los órganos se filtran, se secan a 60°C durante 24 h y se pesan.

La concentración de azul de Evans en la mezcla extractiva se determina mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm.

Cálculo de los resultados:

Los resultados se extrapolan a partir de una curva estándar de azul de Evans (0.1-5 g/mL). El contenido de colorante en cada mezcla se expresa como microgramos por gramo de tejido seco. La expresión de los resultados en función del peso seco del tejido evita la sobrevaloración de los cambios debidos a la formación de edema.

II.5.4.2. Estudios de inhibición.

Método:

Se administra el producto a estudiar (o bien el vehículo) por vía i.v. Cinco minutos después se administra la endotoxina (LPS 0127:B8, 25 mg/kg i.v.) en un volumen de 1 mL/kg, y se procede como se ha indicado en el apartado *II.5.4.1*, estudiándose solamente tráquea, timo, vesícula seminal y estómago.

II.5.5.- DETERMINACIÓN DEL TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA ACTIVADA EN LA RATA CON SHOCK ENDOTÓXICO.

Soluciones a preparar:

- Solución de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, serotipo 0127:B8 (Sigma), 25 mg/kg: se pesan 125 mg de LPS y se disuelven en 5 mL de suero fisiológico.

- Citrato sódico 3.8%: se pesan 3.8 g de citrato trisódico trihidrato y se disuelven en 100 mL de suero fisiológico. Esta solución se prepara semanalmente.

Animales:

Se utilizan ratas Sprague-Dawley machos, con un peso de 180-220 g, mantenidas en ayunas y con agua *ad libitum*.

Método:

Se administra la endotoxina (LPS 0127:B8, 25 mg/kg, 1 mL/kg i.v.) por una de las venas caudales. Los productos a estudiar se administran i.v. 5 min antes del LPS.

** Preparación de las muestras:*

Las ratas son exsanguinadas 2 h después de la administración del LPS y la sangre obtenida se mezcla con citrato sódico en tubos de plástico, en una relación de 9 volúmenes de sangre y uno de anticoagulante.

Se centrifuga a 1000 g durante 15 min. A continuación se separa el plasma con una pipeta Pasteur y se guarda a 4 °C. Se realiza la prueba APTT-XL (ThromboScreen®, Pacific Hemostasis) en las 2 h siguientes. Si esto no es posible, debe congelarse el plasma a -20 °C.

** Realización de la prueba APTT-XL:*

Se añaden 100 µL de plasma al tubo del coagulómetro y se preincuba a 37 °C durante 2 min. A continuación se añaden 100 µL de reactivo APTT-XL, previamente atemperado a 37 °C. Se incuba a 37 °C durante 2 min.

Se añaden 100 µL de la solución de cloruro cálcico 0.02 M suministrada con el juego de reactivos, previamente atemperada a 37°C. Se pone en funcionamiento el cronómetro del coagulómetro. Se registra el tiempo de formación del coágulo (tiempo de coagulación). Esta medición se realiza por duplicado.

II.5.6. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN LA RATA CON SHOCK ENDOTÓXICO.

Soluciones a preparar:

- Solución de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, serotipo 0127:B8 (Sigma), 25 mg/kg: se pesan 125 mg de LPS y se disuelven en 5 mL de suero fisiológico.

- Citrato sódico 3.8%: se pesan 3.8 g de citrato trisódico trihidrato y se disuelven en 100 mL de suero fisiológico. Esta solución se prepara semanalmente.

Animales:

Se utilizan ratas Sprague-Dawley machos, con un peso de 180-220 g, mantenidas en ayunas y con agua *ad libitum*.

Método:

Se administra la endotoxina (LPS 0127:B8, 25 mg/kg, 1 mL/kg i.v.) por una de las venas caudales. Los productos a estudiar se administran i.v. 5 min antes del LPS.

Las ratas son exsanguinadas 2 h después de la administración del LPS y la sangre obtenida se mezcla con citrato sódico en tubos de plástico, en una relación de 9 volúmenes de sangre y uno de anticoagulante.

Se centrifuga a 1000 g durante 15 min. A continuación se separa el plasma con una pipeta Pasteur y se guarda a 4°C hasta el momento de su utilización.

Tanto los parámetros bioquímicos (bilirrubina, creatinina, glucosa, lactato, urea, colesterol y proteínas) como las actividades enzimáticas (fosfatasa ácida (ACP), aspartato-aminotransferasa (AST), alanina-aminotransferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH)) se valoran utilizando juegos comerciales de reactivos (Boehringer Mannheim) y un analizador automático (Technicon RA-1000).

II.6. Shock hipovolémico

El modelo de shock hemorrágico es una técnica muy utilizada que consiste en la extracción progresiva de sangre del animal anestesiado. La hipovolemia da lugar a una disminución del gasto cardíaco e hipotensión.

Este modelo puede realizarse básicamente de dos formas: extrayendo volúmenes variables de sangre para obtener un valor concreto de presión arterial, o bien extrayendo volúmenes fijos. Nosotros hemos utilizado este segundo método (que, además, ha permitido obtener valores de presión muy homogéneos).

En un estudio previo se utilizaron dos volúmenes diferentes de extracción, eligiendo finalmente el de 3 mL para probar los diferentes tratamientos. En estos estudios posteriores se valoraron tanto la evolución de la presión arterial como la mortalidad provocada por el shock hipovolémico.

II.6.1. TÉCNICA DE SHOCK HIPOVOLÉMICO HEMORRÁGICO EN LA RATA ANESTESIADA.

Soluciones a preparar:

- Uretano 13%: ver II.1.1.

Animales:

Se utilizan ratas Sprague-Dawley machos, de 230-250 g, mantenidas en ayunas 24 horas y con agua *ad libitum*.

Método:

Los animales se anestesian con uretano al 13%, administrado por vía i.p. en un volumen de 10 mL/kg.

Se mide la presión arterial a partir de la arteria carótida izquierda mediante un transductor de presión conectado a un polígrafo. Se expone y se cateteriza una vena femoral para la administración de los productos a ensayar.

Se incide el abdomen y se aparta el paquete intestinal con el fin de exponer la arteria ilíaca. En dicha arteria se inserta una cánula conectada a una jeringa, mediante la cual se realizará la extracción de sangre. La hemorragia se provoca mediante extracciones sucesivas de 1.5 mL de sangre a intervalos de 5 min, hasta que se haya extraído el volumen deseado.

II.6.2. VALORACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL Y LA MORTALIDAD EN LA RATA CON SHOCK HIPOVOLÉMICO HEMORRÁGICO.

Método:

Mediante la jeringa conectada a la arteria ilíaca, se extraen 1.5 mL de sangre. A los 5 min se extraen otros 1.5 mL.

Cinco minutos después de esta última extracción, se administra el producto a estudiar en forma de bolus (1 mL/kg). La presión arterial se monitoriza continuamente y se calcula el porcentaje de variación de la presión con respecto a los valores basales. Los animales que sobreviven 120 min después de la administración del producto son sacrificados.

III. RESULTADOS

III.1. Antagonismo del PAF

III.1.1. *INVITRO*.

III.1.1.1. Agregación plaquetaria inducida por PAF en plasma rico en plaquetas de conejo.

El UR-12460 es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria inducida por PAF (15 nM) en plasma rico en plaquetas de conejo, con un valor de CI_{50} del orden de 10^{-8} M. El WEB-2086 y el YM-461 son antagonistas menos potentes en esta prueba. Sin embargo, otros antagonistas del PAF tienen una potencia incluso algo superior a la observada con el UR-12460 (tabla 7).

	CI_{50} μ M	límites fiduciales 95%
UR-12460	0.040	0.030-0.053
WEB-2086	0.091	0.071-0.12
WEB-2170	0.012	0.011-0.023
YM-461	0.88	0.78-0.98
TCV-309	0.014	0.012-0.017
CV-6209	0.012	0.010-0.014
L-659,989	0.010	0.009-0.012

Tabla 7.- Valores de CI_{50} en la prueba de agregación inducida por PAF 15 nM. Los compuestos se incuban durante 4 min antes de añadir el PAF. Los valores se calculan por regresión lineal a partir de una curva experimental con no menos de 4 puntos, siendo cada punto la media del porcentaje de inhibición a una dosis determinada obtenida a partir de 1 a 3 experimentos independientes.

III.1.1.2. Agregación plaquetaria inducida por PAF en plasma rico en plaquetas humano.

El UR-12460 inhibe la agregación plaquetaria inducida por PAF (28 μM) en plasma rico en plaquetas humano, con un valor de CI_{50} del orden de 10^{-8} M, similar al resultado obtenido con plasma de conejo (tabla 8). El TCV-309 y el L-659,989 son antagonistas más potentes, con una CI_{50} del orden de 10^{-9} . Otros productos, como el WEB-2086 o el YM-461 tienen una potencia inferior a la del UR-12460.

	CI_{50} μM	límites fiduciales 95%
UR-12460	0.074	0.053-0.103
WEB-2086	0.11	0.10-0.12
WEB-2170	0.090	0.072-0.113
YM-461	0.50	0.40-0.63
TCV-309	0.0036	0.0030-0.0043
CV-6209	0.012	0.009-0.015
L-659,989	0.0067	0.0064-0.0070

Tabla 8.- Valores de CI_{50} en la prueba de agregación inducida por PAF 28 μM . Los compuestos se incuban durante 4 min antes de añadir el PAF. Los valores se calculan por regresión lineal a partir de una curva experimental con no menos de 4 puntos, siendo cada punto la media del porcentaje de inhibición a una dosis determinada obtenida a partir de 1 a 3 experimentos independientes.

III.1.1.3. Agregación plaquetaria inducida por PAF en plaquetas lavadas de conejo.

El UR-12460 inhibe la agregación plaquetaria inducida por PAF (0.5 nM) en plaquetas lavadas de conejo, con un valor de CI_{50} del orden de 10^{-9} M (tabla 9). La CI_{50} es comparable al de los antagonistas WEB-2170 y CV-6209. El WEB-2086 y el YM-461 presentan una actividad menor. La potencia del UR-12460 y del resto de antagonistas probados, es superior a la demostrada en la agregación del plasma rico en plaquetas. Esto podría explicarse por la ausencia de proteínas plasmáticas en la suspensión de plaquetas lavadas.

	CI_{50} μ M	límites fiduciales 95%
UR-12460	0.0018	0.0016-0.0021
WEB-2086	0.0092	0.0091-0.0093
WEB-2170	0.0012	0.0009-0.0014
YM-461	0.096	0.088-0.110
CV-6209	0.0011	0.0007-0.0018

Tabla 9.- Valores de CI_{50} en la prueba de agregación inducida por PAF 0.5 nM. Los compuestos se incuban durante 4 min antes de añadir el PAF. Los valores se calculan por regresión lineal a partir de una curva experimental con no menos de 4 puntos, siendo cada punto la media del porcentaje de inhibición a una dosis determinada obtenida a partir de 1 a 3 experimentos independientes.

III.1.1.4. Agregación plaquetaria inducida por PAF en sangre total de perro.

El UR-12460 inhibe la agregación plaquetaria inducida por PAF (0.75 nM) en sangre total de perro con un valor de CI_{50} del orden de 10^{-8} M, similar al WEB-2086 pero inferior al CV-6209 (tabla 10).

	CI_{50} μ M	límites fiduciales 95%
UR-12460	0.029	0.013-0.066
WEB-2086	0.013	0.012-0.016
CV-6209	0.0049	0.0038-0.0063

Tabla 10.- Valores de CI_{50} en la prueba de agregación inducida por PAF 0.75 nM. Los compuestos se incuban durante 2 min antes de añadir el PAF. Los valores se calculan por regresión lineal a partir de una curva experimental con no menos de 4 puntos, siendo cada punto la media del porcentaje de inhibición a una dosis determinada obtenida a partir de 1 a 3 experimentos independientes.

III.1.2. *INVIVO*.

III.1.2.1. Hipotensión inducida por PAF en la rata anestesiada.

El UR-12460 inhibe la hipotensión inducida por la administración de PAF (0.5 µg/kg, i.v.) en la rata anestesiada, con un valor de DI_{50} de 0.021 mg/kg (tabla 11). Esta potencia es similar a la de los antagonistas WEB-2170 y YM-461 y superior a la del WEB-2086 y L-659,989. Los compuestos TCV-309 y CV-6209 presentan una potencia mayor, con valores de DI_{50} del orden de 5-8 µg/kg.

	DI_{50} mg/kg i.v.	límites fiduciales 95%
UR-12460	0.021	0.015-0.031
WEB-2086	0.17	0.12-0.27
WEB-2170	0.051	0.039-0.067
YM-461	0.035	0.023-0.053
TCV-309	0.0054	0.0039-0.0075
CV-6209	0.0078	0.0056-0.011
L-659,989	0.13	0.08-0.20

Tabla 11.- Valores de DI_{50} en la prueba de hipotensión inducida por PAF 0.5 µg/kg i.v. Los compuestos se administran i.v. 3 min antes del PAF. Los valores se calculan por regresión lineal a partir de una curva experimental con no menos de 4 puntos, siendo cada punto la media del porcentaje de inhibición a una dosis determinada obtenida a partir de 2 a 3 experimentos independientes.

III.1.2.2. Mortalidad inducida por PAF en el ratón.

El UR-12460 inhibe la mortalidad inducida por la administración de PAF (100 µg/kg, i.v. + propanolol 1 mg/kg, i.v.) en el ratón, con un valor de DI_{50} de 0.0090 mg/kg para la vía i.v. y 0.30 mg/kg para la vía oral (tabla 12). Los compuestos más potentes por vía i.v. son el TCV-309 y el BB-882, con valores del orden de 2-3 µg/kg. Por vía oral, el UR-12460 es uno de los compuestos más potentes, sólo superado por el WEB-2170 y el BB-882.

	DI_{50} mg/kg i.v.	límites fiduciales 95%	DI_{50} mg/kg p.o.	límites fiduciales 95%
UR-12460	0.0090	0.008-0.011	0.30	0.16-0.54
WEB-2086	0.084	0.042-0.167	0.97	0.38-2.5
WEB-2170	0.0070	0.0052-0.0094	0.065	0.033-0.128
YM-461	0.0059	0.0018-0.0195	0.99	0.58-1.71
TCV-309	0.0028	0.0021-0.0038	0.64	0.52-0.79
CV-6209	0.022	0.010-0.046	37	19-73
L-659,989	0.34	0.10-1.17	0.87	0.41-1.84
BB-882	0.0021	0.0010-0.0042	0.088	0.047-0.164
SCH-37370	1.11	0.93-1.32	31	18-53

Tabla 12.- Valores de DI_{50} en la prueba de mortalidad inducida por PAF 100 µg/kg i.v. Los compuestos se administran 1 h antes (p.o.) o 5 min antes (i.v.) de la administración del PAF. Los valores se calculan por regresión lineal a partir de una curva experimental con no menos de 4 puntos.

III.1.2.3. Broncoespasmo inducido por PAF en el cobayo.

El UR-12460 inhibe el broncoespasmo inducido por PAF (50 ng/mL, i.v.) en el cobayo anestesiado, con un valor de DI_{50} de 8.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. (tabla 13). Esta potencia es algo menor que la presentada por los otros dos antagonistas estudiados: el WEB-2086 y el CV-6209.

	DI_{50} $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.	límites fiduciales
UR-12460	8.7	3.0-23.0
WEB-2086	4.2	2.0-8.8
CV-6209	4.4	2.4-8.0

Tabla 13.- Valores de DI_{50} en la prueba de broncoespasmo inducido por PAF 50 ng/mL i.v. Los compuestos se administran i.v. 30 min después del PAF. Los valores se calculan por regresión lineal a partir de una curva experimental con no menos de 4 puntos.

III.1.2.4.- Parámetros hematológicos en la rata anestesiada.

Al administrar un bolus de PAF (5 µg/kg, 1 mL/kg i.v.) se producen algunas alteraciones a nivel hematológico. A los 5 min tras la inyección de PAF se detecta una cierta tendencia hacia la leucopenia, mientras que a los 45 min podría hablarse de cierta leucocitosis. Sin embargo, en nuestras condiciones no hemos observado que estas variaciones sean estadísticamente significativas. Los niveles de plaquetas, por otra parte, no muestran variaciones ni a los 5 ni a los 45 min tras la administración del PAF, lo cual es lógico puesto que, como ya se ha comentado, las plaquetas de rata no tienen receptores específicos para el PAF.

El valor hematócrito aumenta de forma considerable, llegando a ser un 25% superior a los valores iniciales a los 5 min. Este aumento se mantiene todavía a los 45 min, representando entonces casi un 15% con respecto al valor inicial. La administración de UR-12460 inhibe la hemoconcentración tanto a los 5 como a los 45 min de forma significativa ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente). El otro antagonista probado, el UR-11353, se muestra muy efectivo a los 5 min mientras que su efecto no es significativo a los 45 min (fig. 10).

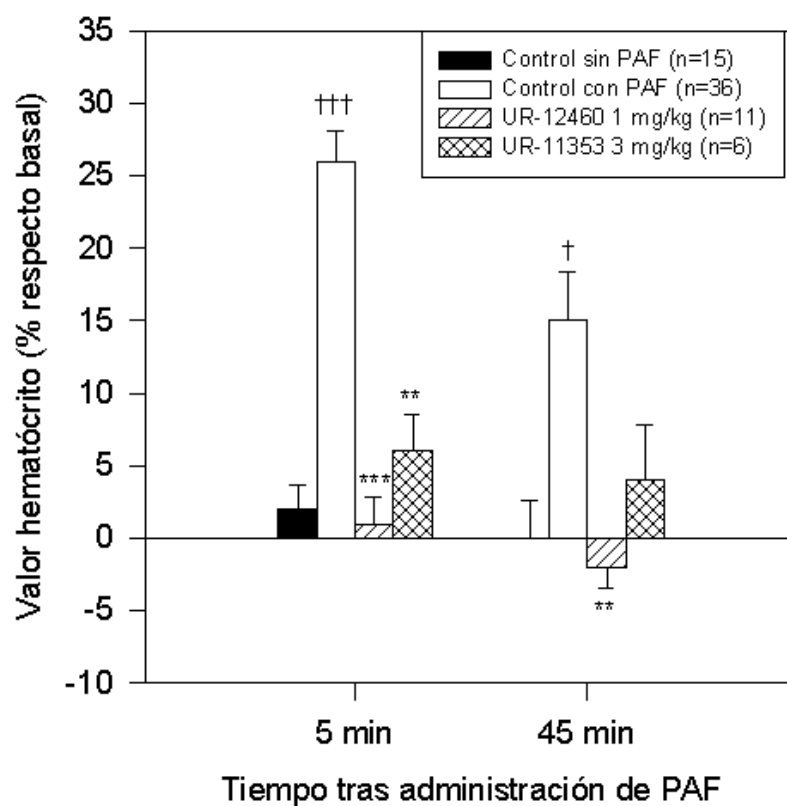


Figura 10.- Variación del valor hematócrito respecto al valor basal (considerado como 0) tras la administración de PAF 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. Los compuestos se administran i.v. 10 min antes del PAF. $\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$ vs. control sin PAF; $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$ vs. control con PAF (test de Dunn).

III.2. Shock anafiláctico

III.2.1. ACTIVO.

III.2.1.1. Mortalidad inducida por seroalbúmina bovina en el ratón sensibilizado.

El UR-12460 es activo en esta prueba, tanto administrado por vía i.v. como p.o. El antialérgico ketotifeno, utilizado como patrón de referencia, es bastante superior por vía i.v. a los antagonistas del PAF probados, exceptuando el YM-461 y el CV-6209. Administrados p.o., todos los compuestos estudiados presentan unos valores similares, con un rango entre 0.7 y 2.7 mg/kg (tabla 14).

	DI ₅₀ mg/kg i.v.	DI ₅₀ mg/kg p.o.
UR-12460	0.51	2.72
WEB-2086	1.22	0.71
WEB-2170	0.28	1.58
YM-461	0.087	1.09
TCV-309	0.46	1.71
CV-6209	0.11	NP
L-659,989	NP	0.73
SCH-37370	5.5	2.56
Ketotifeno	0.087	0.94

Tabla 14.- Valores de DI₅₀ en la prueba de shock anafiláctico activo inducido por la administración de BSA. Los compuestos se administran 5 min (i.v.) o 20 min (p.o.) antes de administrar la BSA. Los valores se calculan por regresión lineal a partir de una curva experimental con no menos de 4 puntos, siendo cada punto la media del porcentaje de inhibición a una dosis determinada obtenida a partir de 1 a 3 experimentos independientes. (NP: no probado).

Existe una buena correlación entre este test y la prueba de mortalidad por PAF en el ratón (ver III.1.2.2) cuando los productos se administran por vía i.v. (fig. 11).

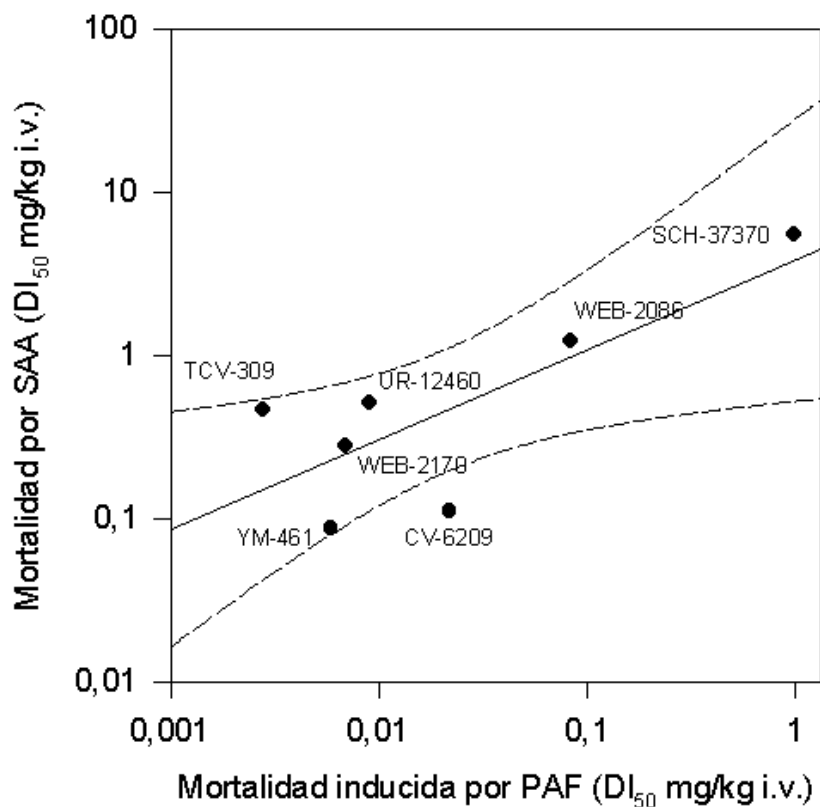


Figura 11.- Correlación entre la actividad de los antagonistas del PAF en la prueba de mortalidad por shock anafiláctico y la prueba de mortalidad inducida por PAF en ratón ($p < 0.001$, $r^2 = 0.607$). La mortalidad se provoca por la administración de propanolol 1 mg/kg i.p. + BSA 1 mg/kg i.v. en ratones sensibilizados, o por la administración de PAF 100 μ g/kg i.v., 5 min antes de la administración de los antagonistas del PAF por vía i.v. Las líneas de puntos indican los intervalos de confianza al 95% de la recta de regresión. SAA: shock anafiláctico activo.

III.2.1.2. Mortalidad, hipotensión y alteraciones respiratorias inducidas por ovoalbúmina en el cobayo sensibilizado.

La administración de UR-12460 y WEB-2086 inhibe la mortalidad inducida por ovoalbúmina de forma dosis-dependiente (tabla 15).

	n	muertos/vivos	% supervivencia
Control	38	30/8	21
UR-12460 1 mg/kg	13	7/6	46
UR-12460 3 mg/kg	12	6/6	50
UR-12460 10 mg/kg	14	4/10	71**
WEB-2086 0.3 mg/kg	7	4/3	43
WEB-2086 1 mg/kg	7	2/5	71*

Tabla 15.- Porcentaje de supervivencia a los 45 min en la prueba de shock anafiláctico activo inducido por la administración de ovoalbúmina en cobayo sensibilizado. Los compuestos se administran p.o. 60 min antes de administrar la ovoalbúmina. Tres minutos antes de la administración de ovoalbúmina se inyectan 15 µg/kg i.v. de mepiramina. * p<0.05 vs. control; ** p<0.01 vs. control (test de Fisher).

La administración de ovoalbúmina produce una respuesta hipertensora momentánea, que alcanza un máximo a los 5 min. Posteriormente comienza una fase de hipotensión que dura casi hasta el final del experimento, momento en que parece que la presión arterial se normaliza de nuevo. La administración de UR-12460 1 mg/kg p.o. no produce variaciones sobre este perfil. En cambio, el WEB-2086 a esa dosis inhibe de forma significativa la fase hipotensora (fig. 12). Al aumentar la dosis de UR-12460 hasta 10 mg/kg tampoco se aprecian cambios significativos (datos no mostrados).

La administración de ovoalbúmina produce una disminución inmediata del flujo espiratorio máximo, que se recupera a los 30 min. También en este caso, sólo el WEB-2086 presenta cierto efecto (fig. 13). El UR-12460 no es efectivo ni siquiera a la dosis de 10 mg/kg (datos no mostrados).

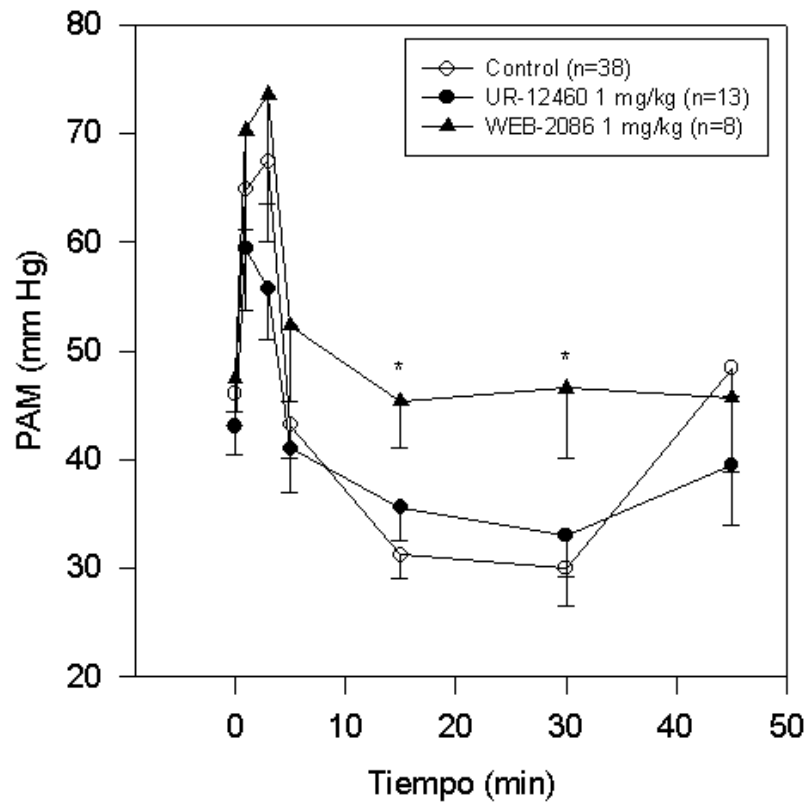


Figura 12.- Variación de la presión arterial (PAM) tras la administración de ovoalbúmina en el cobayo sensibilizado. Los compuestos se administran p.o. 60 min antes de la reexposición al antígeno. * $p < 0.05$ vs. control (test de Bonferroni).

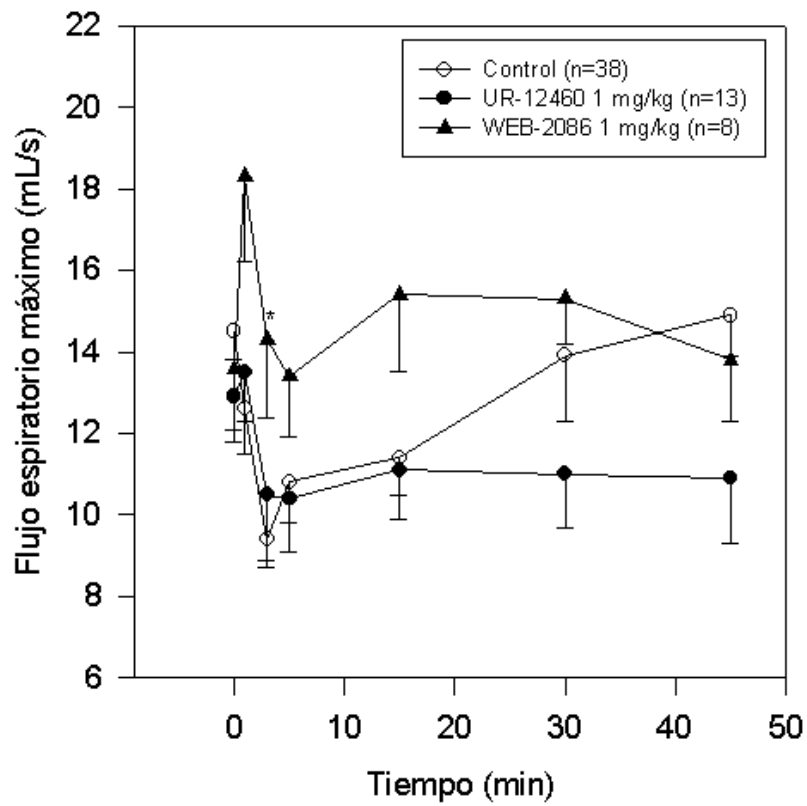


Figura 13.- Variación del flujo espiratorio máximo tras la administración de ovoalbúmina en el cobayo sensibilizado. Los compuestos se administran p.o. 60 min antes de la reexposición al antígeno. * $p < 0.05$ vs. control (test de Bonferroni).

III.2.2. PASIVO.

III.2.2.1. Anafilaxia pasiva cutánea en la rata.

El UR-12460 no se ha mostrado activo en este test. El antihistamínico y antialérgico ketotifeno, utilizado como patrón de referencia, muestra una inhibición cercana al 50% (tabla 16).

	Dosis (mg/kg p.o.)	Inhibición (%)	n	Inhibición total (%)
UR-12460	20	-30.6	3	
		33.5	5	
		-10.4	5	
		16.7	4	
		-30.4	5	-4.2
Ketotifeno	2	42.6	5	
		55.2	5	48.9

Tabla 16.- Porcentajes de inhibición vs. control en la prueba de anafilaxia pasiva cutánea inducida por la administración de ovoalbúmina (10 mg/mL, 0.5 mL i.v.) en rata sensibilizada. Los compuestos se administran p.o. 1 h antes de la inyección del antígeno. En la columna "Inhibición (%)" se indican los porcentajes de inhibición de experimentos individuales, calculados con respecto a sus controles correspondientes. En la columna "n" se indica el número de animales de cada experimento individual. En la columna "Inhibición total (%)" se muestra el promedio de todos los experimentos realizados.

III.3. Isquemia-reperfusión

III.3.1. SHOCK POR OCLUSIÓN DE LAS ARTERIAS ESPLÁCNICAS.

III.3.1.1. Hipotensión en la rata anestesiada.

La oclusión de las arterias esplácnicas provoca un aumento rápido de la presión arterial (entre un 40 y un 60% a los 2 min, con respecto a los valores iniciales). Esta hipertensión remite rápidamente, de forma que hacia los 10 min de la oclusión, la presión vuelve a niveles normales y se mantiene estable hasta el momento de la extracción de las pinzas hemostáticas. En ese instante, la presión disminuye bruscamente, llegando a ser de aproximadamente un 40% inferior al valor basal. Posteriormente aumenta de nuevo hasta los 60 min para disminuir después de forma progresiva, lo que conduce normalmente a la muerte del animal.

En el protocolo reversor, los compuestos se administran en forma de bolus i.v. a la dosis de 1 mg/kg a los 2 min de la desoclusión. A los 5 min del bolus se inicia una infusión de 1 mg/kg/h durante 30 min. La administración de UR-12460 y WEB-2086 muestra una tendencia a la recuperación de la presión arterial, aunque de forma no estadísticamente significativa (fig. 14).

En el protocolo preventivo los compuestos se administran en forma de bolus i.v. a la dosis de 1 mg/kg 10 min antes de la desoclusión. Inmediatamente se inicia una infusión de 1 mg/kg/h hasta el final del experimento. La administración de UR-12460 y WEB-2086 no inhibe la hipotensión. Los valores finales del UR-12460 que se observan en la figura son engañosos ya que corresponden a los animales que han sobrevivido (9 de los 14 iniciales) (fig. 15).

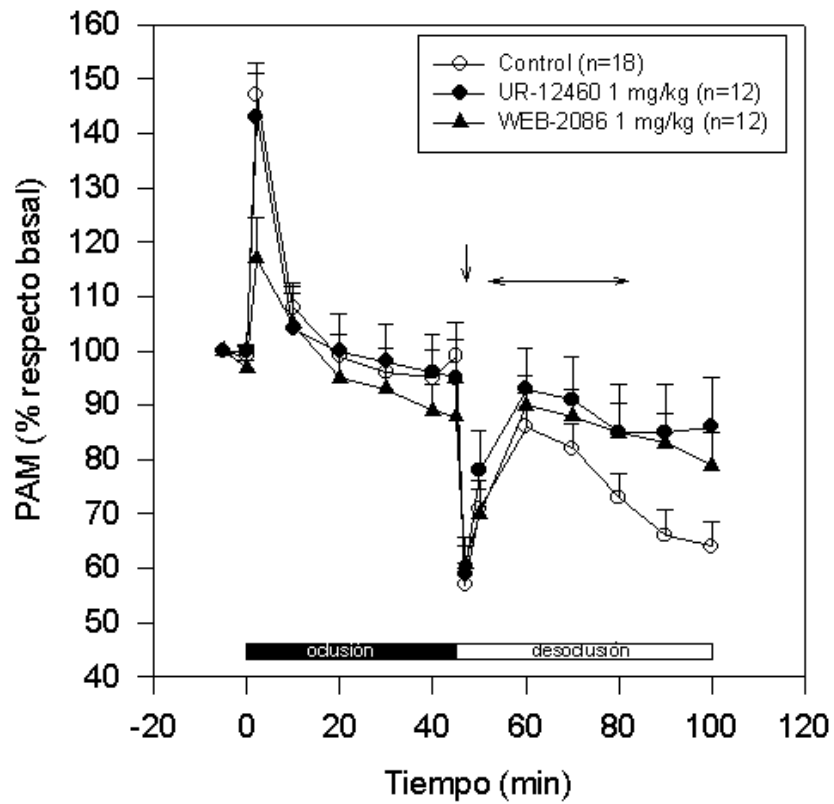


Figura 14.- Variación de la presión arterial media (PAM) tras la oclusión de las arterias esplácnicas (de 0 a 45 min). Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. (2 min post-desocclusión, indicado como ↓) seguido de infusión continua (inicio a los 5 min post-bolus y duración 30 min, indicado como ←—→). Las diferencias entre los tratamientos y el grupo control no son estadísticamente significativas (test de Bonferroni).

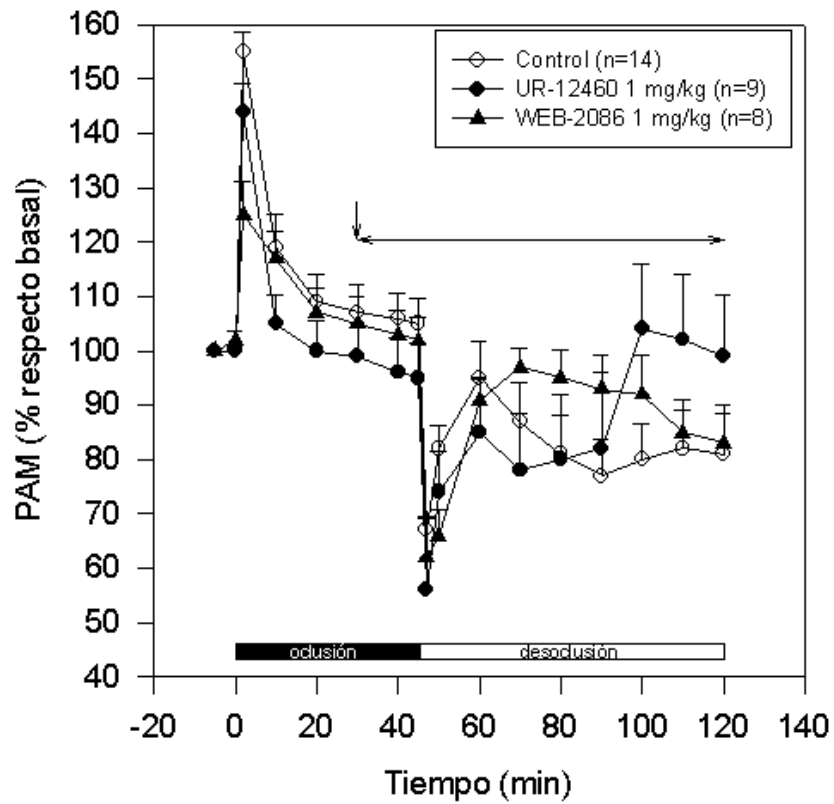


Figura 15.- Variación de la presión arterial media (PAM) tras la oclusión de las arterias esplácnicas (de 0 a 45 min). Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. (10 min pre-desocclusión, indicado como ↓) seguido de infusión continua hasta el final del experimento (indicado como ←—→). Las diferencias entre los tratamientos y el grupo control no son estadísticamente significativas (test de Bonferroni).

III.3.1.2. Mortalidad en la rata anestesiada.

La reperfusión de las arterias esplácnicas en nuestro modelo produce una mortalidad progresiva en el grupo control. Un 50% de los animales han muerto ya a los 55 min post-reperfusión (estudios del efecto reversor) y a los 85 min en el protocolo preventivo.

Para valorar la mortalidad se han elegido unos intervalos de tiempo diferentes según el protocolo. En el protocolo reversor, se valora hasta los 100 min post-reperfusión, que corresponden aproximadamente a 30 min desde el final de la infusión del producto o vehículo. En el protocolo preventivo, dado que la infusión se mantiene hasta la muerte del animal, no hemos puesto ningún límite de tiempo para valorar la mortalidad.

En el estudio del efecto reversor, la administración de los tratamientos aumenta el porcentaje de supervivencia de forma muy significativa ($p < 0.01$, test *log-rank*). Cuando se analizan los tratamientos por separado (test de Mantel-Haenszel), el UR-12460 1 mg/kg + 1 mg/kg/h muestra un aumento significativo ($p < 0.05$), mientras que el del WEB-2086 a la misma dosis es muy significativo ($p < 0.01$) (fig. 16).

En el estudio preventivo, la dosis de 1 mg/kg + 1 mg/kg/h no se ha mostrado efectiva en ninguno de los dos tratamientos, aunque hay tendencia a disminuir la mortalidad por parte de ambos (fig. 17). Al aumentar la dosis a 3 mg/kg + 3 mg/kg/h, sólo el WEB-2086 ha mostrado significación estadística (fig. 18).

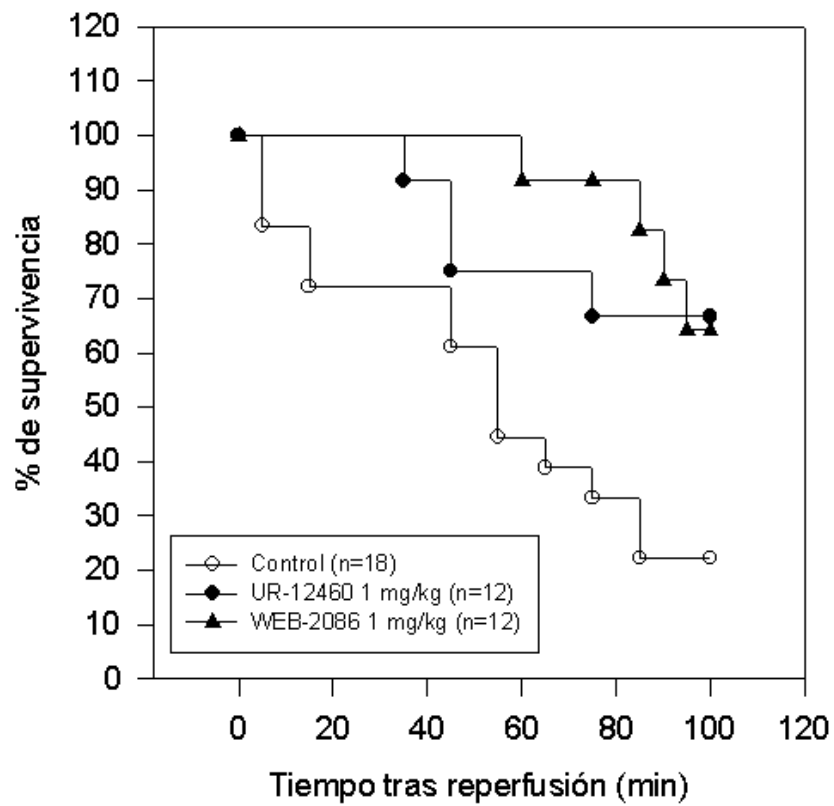


Figura 16.- Evolución de la tasa de supervivencia tras la oclusión de las arterias esplánicas durante 45 min. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. (2 min post-desoclusión) seguido de infusión continua (inicio a los 5 min de administrar el bolus y duración 30 min). La diferencia entre la curva del grupo control y la del UR-12460 es significativa ($p < 0.05$), y entre la del control y la del WEB-2086 es muy significativa ($p < 0.01$) (test de Mantel-Haenszel).

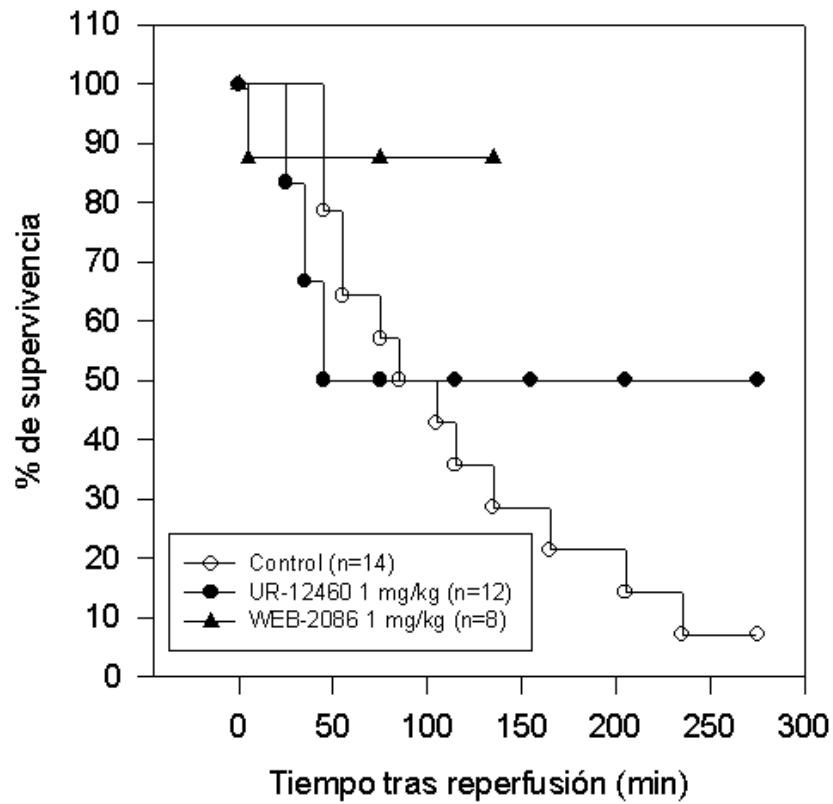


Figura 17.- Evolución de la tasa de supervivencia tras la oclusión de las arterias esplánicas durante 45 min. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. (10 min pre-desoclusión) seguido de infusión continua hasta el final del experimento. No hay diferencias significativas entre la curva del grupo control y la de los tratamientos (test log-rank). *Nota:* en algunos de los experimentos realizados con el WEB-2086 los animales son sacrificados. Por este motivo, se han introducido en el programa Prism™ (GraphPad) algunos datos como "mayor de" en vez de como valores concretos de tiempo. Esto origina una gráfica que aparentemente queda "cortada" antes de los 150 min.

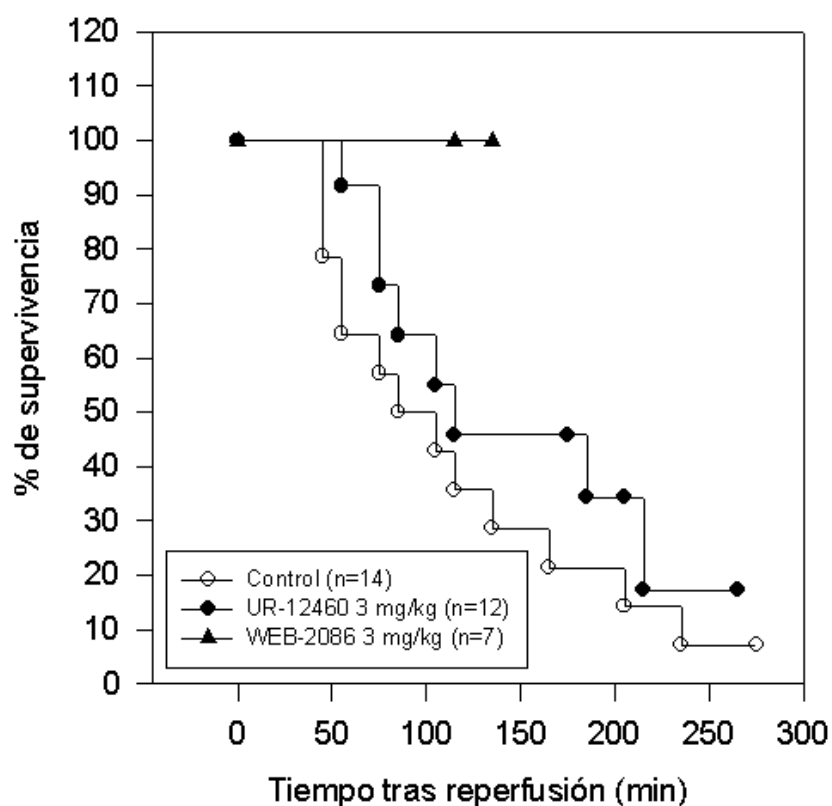


Figura 18.- Evolución de la tasa de supervivencia tras la oclusión de las arterias esplánicas durante 45 min. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. (10 min pre-oclusión) seguido de infusión continua hasta el final del experimento. La diferencia entre la curva del grupo control y la del WEB-2086 es estadísticamente significativa (test de Mantel-Haenszel). *Nota:* en algunos de los experimentos realizados con el WEB-2086 los animales son sacrificados. Por este motivo, se han introducido en el programa Prism™ (GraphPad) algunos datos como "mayor de" en vez de como valores concretos de tiempo. Esto origina una gráfica que aparentemente queda "cortada" antes de los 150 min.

III.3.1.3. Parámetros hematológicos en la rata anestesiada.

El proceso de isquemia y reperfusión esplácnica produce una serie de cambios a nivel hematológico. Una hora tras la desoclusión arterial se observa leucopenia y trombocitopenia. Los antagonistas estudiados, a la dosis de 3 mg/kg + 3 mg/kg/h, no inhiben la leucopenia pero sí la trombocitopenia de forma significativa (figs. 19 y 20).

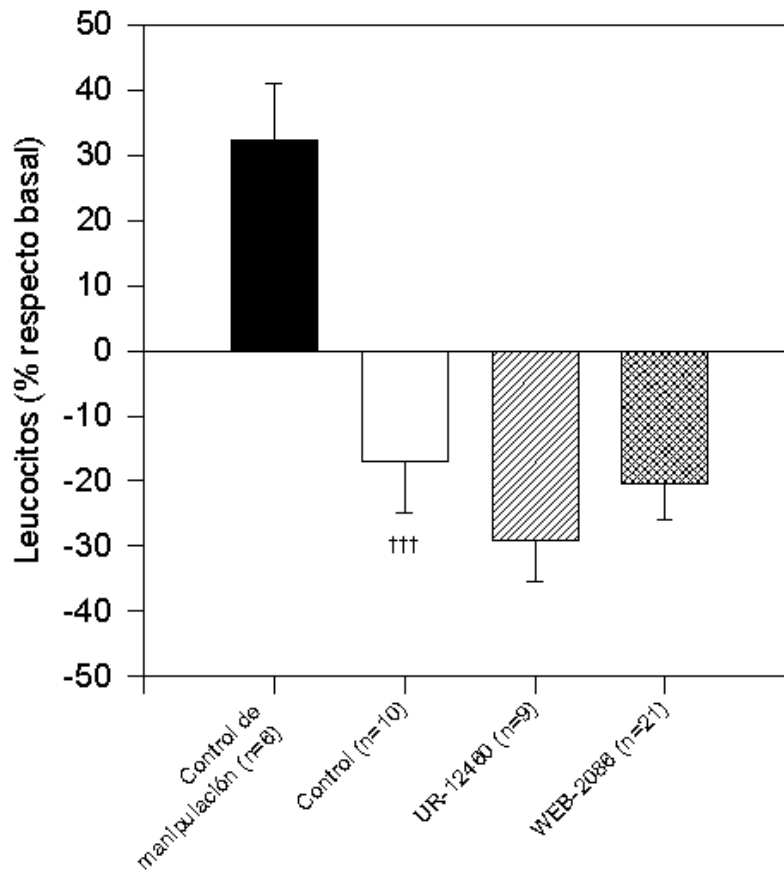


Figura 19.- Variación del número de leucocitos en sangre 1 h tras la desoclusión de las arterias esplánicas en la rata anestesiada. Los compuestos se administran 10 min antes de la desoclusión mediante un bolus i.v. de 3 mg/kg, seguido de una infusión continua a 3 mg/kg/h hasta el final del experimento. Los controles de manipulación sufren los mismos procedimientos que las ratas del grupo control, excepto la oclusión de las arterias esplánicas. ††† $p < 0.001$ vs. control de manipulación (test de Bonferroni).

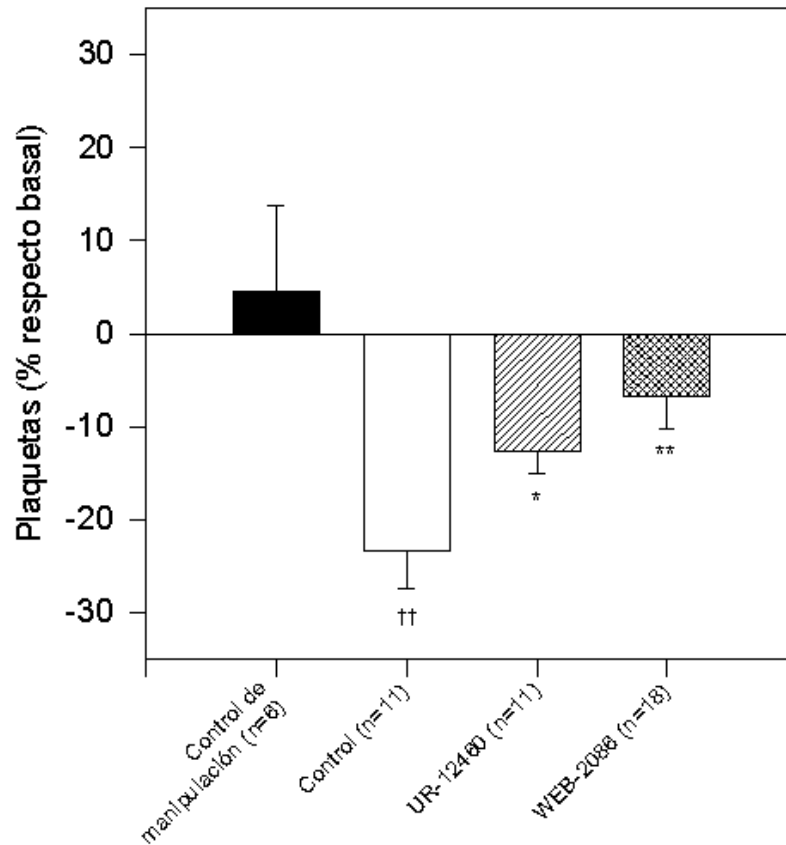


Figura 20.- Variación del número de plaquetas en sangre 1 h tras la desoclusión de las arterias esplácnicas en la rata anestesiada. Los compuestos se administran 10 min antes de la desoclusión mediante un bolus i.v. de 3 mg/kg, seguido de una infusión continua a 3 mg/kg/h hasta el final del experimento. Los controles de manipulación sufren los mismos procedimientos que las ratas del grupo control, excepto la oclusión de las arterias esplácnicas. †† $p < 0.01$ vs. control de manipulación; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control (t de Bonferroni).

III.3.2. ISQUEMIA-REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA.

III.3.2.1. *In vitro*

Como ya se comentó en el apartado de modelos experimentales, se ha puesto a punto un método de isquemia-reperfusión *in vitro* que permite valorar el área de infarto macroscópico, además de otros parámetros hemodinámicos.

Antes de comprobar en este modelo la eficacia de los antagonistas del PAF estudiados, se ha profundizado un poco más en el mismo, realizando tres protocolos diferentes que identificamos como 10/10, 15/15 y 20/20, cifras que indican los minutos de isquemia y los de perfusión a los que son sometidos los corazones aislados. Cada uno de estos protocolos se ha hecho por duplicado: en unos casos se añade sangre diluida al 50% (controles con sangre) y en otros no (controles sin sangre). Con estos experimentos se pretende valorar:

- Diferencias dentro de un mismo protocolo entre los corazones que han recibido sangre y los que no han recibido.
- Relación causa-efecto entre los distintos protocolos con sangre diluida y elección del protocolo más adecuado para probar los tratamientos.

La dilución de la sangre de rata con Krebs-Henseleit da lugar a los valores hematológicos que se muestran a continuación, expresados como la media \pm error estándar (n=25). Entre paréntesis se indican los valores de la sangre normal.

Leucocitos ($\times 10^9/L$):	5.3 \pm 0.3	(8.8 \pm 0.5)
Hematócrito (%):	22.0 \pm 0.7	(35.7 \pm 1.1)
Plaquetas ($\times 10^9/L$):	461 \pm 25	(731 \pm 24)
Neutrófilos ($\times 10^9/L$):	2.3 \pm 0.2	(3.5 \pm 0.2)

En las siguientes gráficas se muestra la variación de los parámetros valorados (área de infarto, frecuencia cardíaca, flujo coronario, presión sistólica y telediastólica, presión del ventrículo izquierdo y producto frecuencia/presión) con respecto a los tiempos de isquemia-reperusión y con respecto a la administración o no de sangre diluida.

Los corazones perfundidos con Krebs-Henseleit y sometidos a isquemia-reperusión tienen un área de infarto de un 15% con respecto al total del corazón, independientemente de la duración del protocolo. En cambio, en el caso de los corazones perfundidos con sangre, hay un claro aumento de la lesión a medida que se alarga el tiempo de isquemia-reperusión. Además, las diferencias entre controles sin sangre y controles con sangre son muy evidentes, siendo extremadamente significativas en los protocolos 15/15 y 20/20 (fig. 21).

El flujo coronario en la reperusión disminuye de forma proporcional a la duración del protocolo, tanto en los controles con sangre como en los controles sin sangre, pero siempre lo hace de manera más marcada en los controles con sangre (fig. 22). La frecuencia cardíaca de los corazones durante la reperusión permanece casi inalterada con respecto a los valores basales, excepto en el caso de los controles con sangre sometidos al protocolo 20/20, en los que la frecuencia es prácticamente cero (fig. 23). La presión sistólica también disminuye, aunque lo hace de forma muy similar en los controles sin sangre de los tres protocolos. Sin embargo, la adición de sangre empeora notablemente la bajada de presión, sobre todo para los dos protocolos más largos (fig. 24). La presión telediastólica es un parámetro que ha presentado bastante más variación que los otros, por lo que resulta un poco difícil interpretar los resultados. Se aprecia un aumento de la presión dependiente de la duración del protocolo, pero no se observan grandes diferencias entre la presencia o no de sangre en el perfusado (fig. 25). La presión desarrollada por el ventrículo izquierdo o, dicho de otra manera, la fuerza de contracción del corazón, disminuye en la reperusión en los controles sin sangre, aunque con diferencias poco evidentes. La adición de sangre produce disminuciones mucho más marcadas, de nuevo dependientes de la duración del protocolo (fig. 26). Por último, el producto frecuencia-presión - indicador del consumo de oxígeno por parte del miocardio - disminuye de manera análoga al parámetro anterior, con pocas diferencias entre los controles sin sangre y con diferencias muy marcadas entre los controles con sangre (fig. 27).

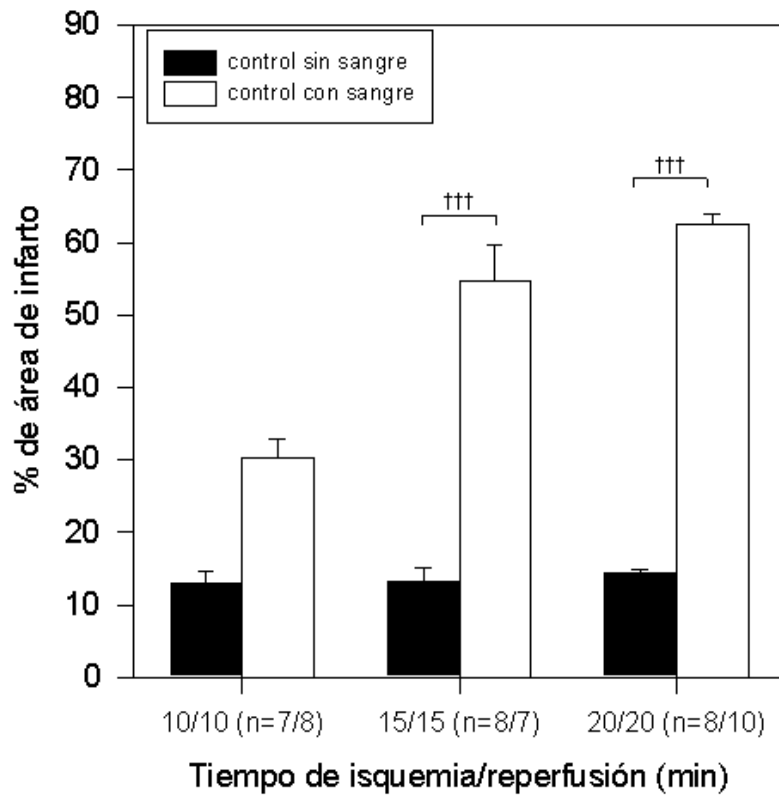


Figura 21.- Porcentaje de área de infarto con respecto a la totalidad del miocardio después de 10, 15 ó 20 min de ischemia y 10, 15 ó 20 de reperfusion en corazón aislado de rata. El grupo control sin sangre recibe sólo líquido nutritivo (Krebs-Henseleit), mientras que el grupo control con sangre recibe además sangre diluída al 50%. ††† $p < 0.001$ (test t de Student).

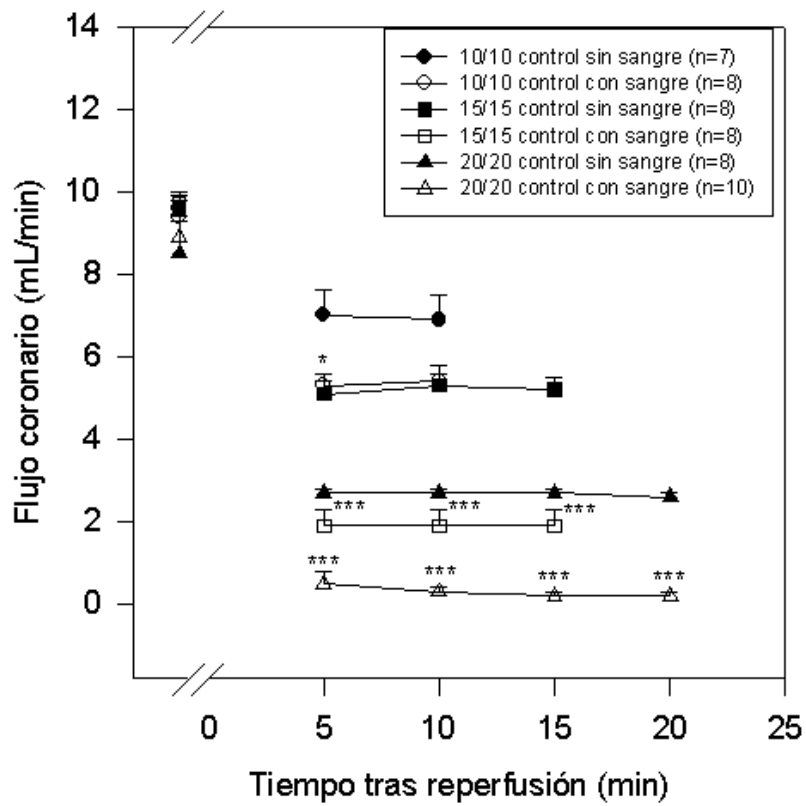


Figura 22.- Valoración del flujo coronario en la reperfusion después de 10, 15 ó 20 min de isquemia en corazón aislado de rata. Los grupos control sin sangre reciben sólo líquido nutricional (Krebs-Henseleit), mientras que los grupos control con sangre reciben además sangre diluida al 50%. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control sin sangre (test t de Student).

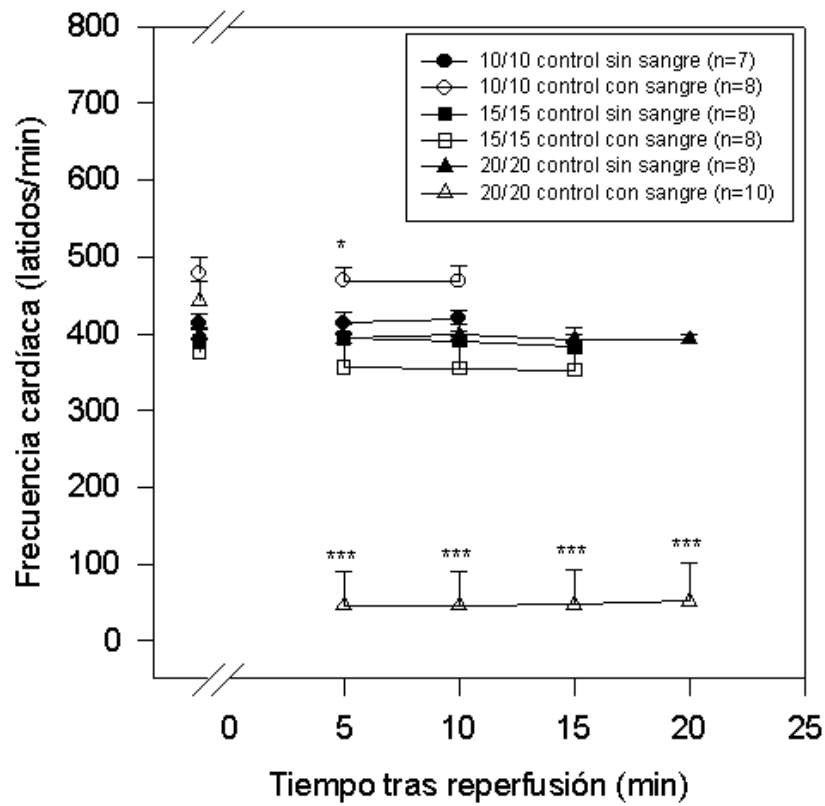


Figura 23.- Valoración de la frecuencia cardíaca en la reperfusión después de 10, 15 ó 20 min de isquemia en corazón aislado de rata. Los grupos control sin sangre reciben sólo líquido nutricio (Krebs-Henseleit), mientras que los grupos control con sangre reciben además sangre diluída al 50%. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control sin sangre (test t de Student).

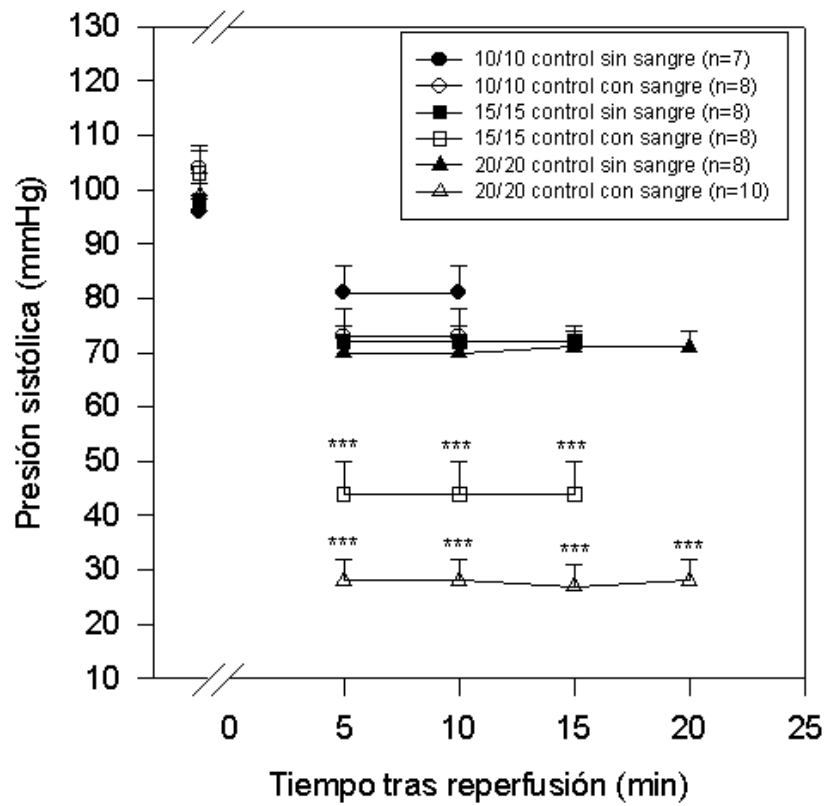


Figura 24.- Valoración de la presión sistólica en la reperfusion después de 10, 15 ó 20 min de isquemia en corazón aislado de rata. Los grupos control sin sangre reciben sólo líquido nutricio (Krebs-Henseleit), mientras que los grupos control con sangre reciben además sangre diluída al 50%. *** $p < 0.001$ vs. control sin sangre (test t de Student).

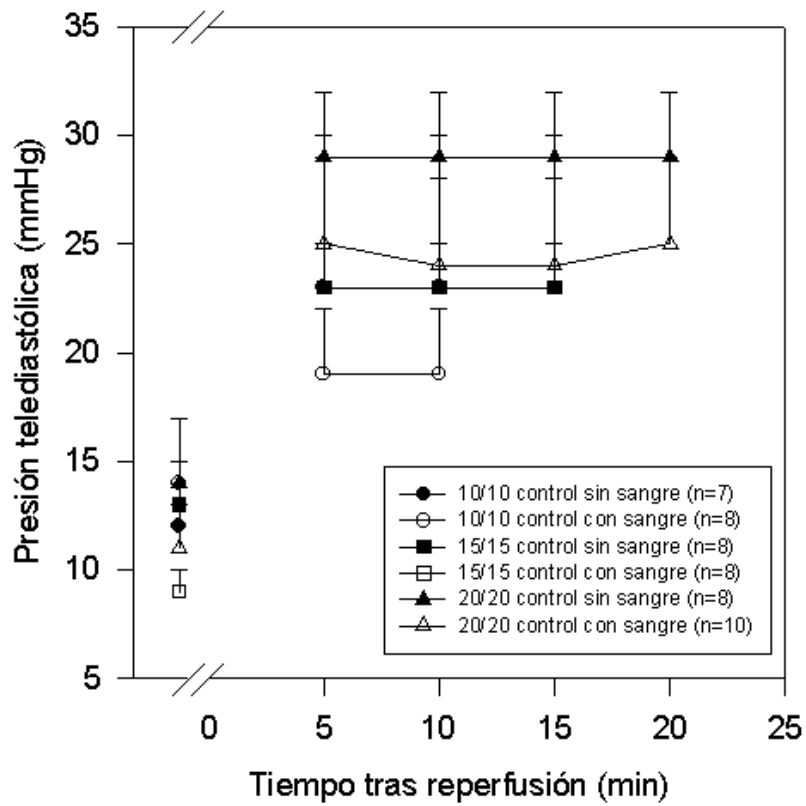


Figura 25.- Valoración de la presión telediastólica en la reperusión después de 10, 15 ó 20 min de isquemia en corazón aislado de rata. Los grupos control sin sangre reciben sólo líquido nutricio (Krebs-Henseleit), mientras que los grupos control con sangre reciben además sangre diluida al 50%.

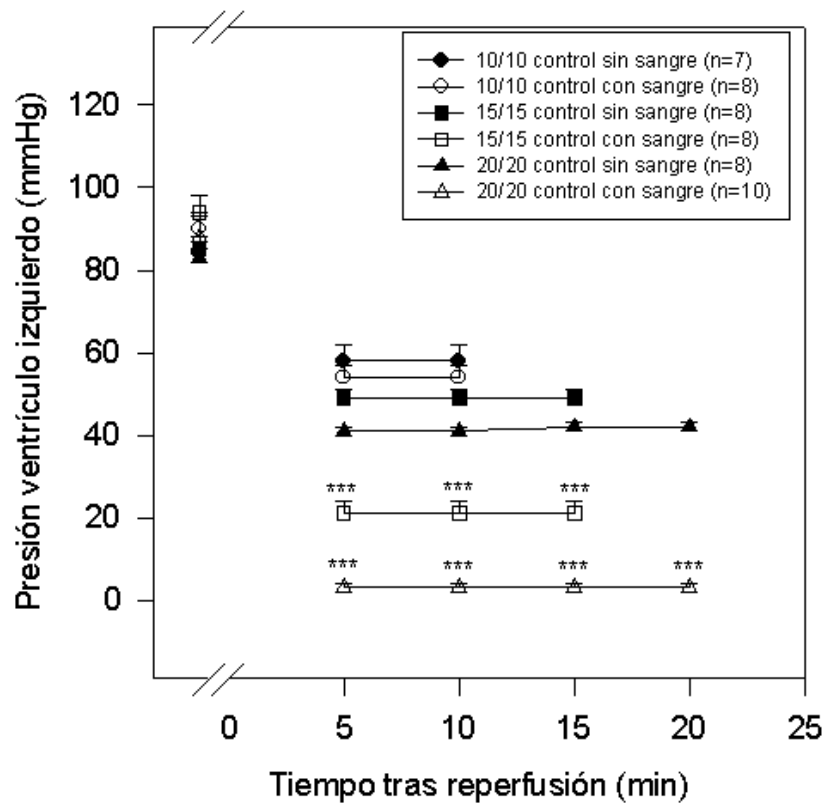


Figura 26.- Valoración de la presión del ventrículo izquierdo en la reperfusion después de 10, 15 ó 20 min de isquemia en corazón aislado de rata. Los grupos control sin sangre reciben sólo líquido nutricio (Krebs-Henseleit), mientras que los grupos control con sangre reciben además sangre diluída al 50%. *** $p < 0.001$ vs. control sin sangre (test t de Student).

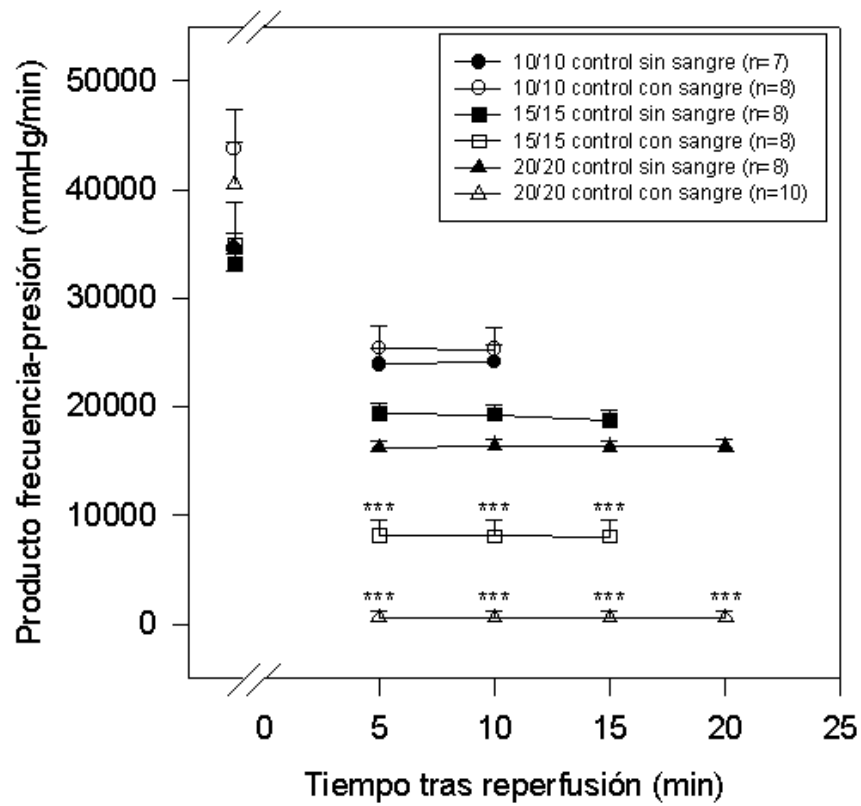


Figura 27.- Valoración del producto frecuencia-presión en la reperfusion después de 10, 15 ó 20 min de isquemia en corazón aislado de rata. Los grupos control sin sangre reciben sólo líquido nutricio (Krebs-Henseleit), mientras que los grupos control con sangre reciben además sangre diluída al 50%. *** $p < 0.001$ vs. control sin sangre (test t de Student).

III.3.2.1.1. Valoración de parámetros hemodinámicos en el corazón aislado de rata.

Después de realizar las pruebas descritas anteriormente se elige el protocolo 20/20, con adición de sangre diluida en el perfusado, para probar el efecto de los compuestos a estudiar.

Este protocolo de isquemia-reperfusión al que son sometidos los corazones aislados, unido a la perfusión de sangre diluida, da lugar a importantes alteraciones hemodinámicas que ya se han descrito en el capítulo anterior. El flujo coronario, la frecuencia cardíaca, la presión sistólica, la presión del ventrículo izquierdo, y el producto presión-frecuencia, disminuyen de forma muy marcada en los animales control, mientras que la presión telediastólica aumenta.

El UR-12460 inhibe de forma extremadamente significativa la aparición de estas alteraciones (excepto la presión telediastólica, que continúa elevada) de forma dosis-dependiente. Como patrón se ha utilizado la mercaptopropionilglicina (MPG), un análogo sintético de bajo peso molecular del glutatión, un importante antioxidante endógeno. Como se comentará en la discusión, los radicales libres de oxígeno pueden jugar un papel muy importante en la lesión inducida por isquemia/reperfusión. La MPG se muestra muy efectiva, inhibiendo incluso la elevación de la presión telediastólica (figs. 28-33).

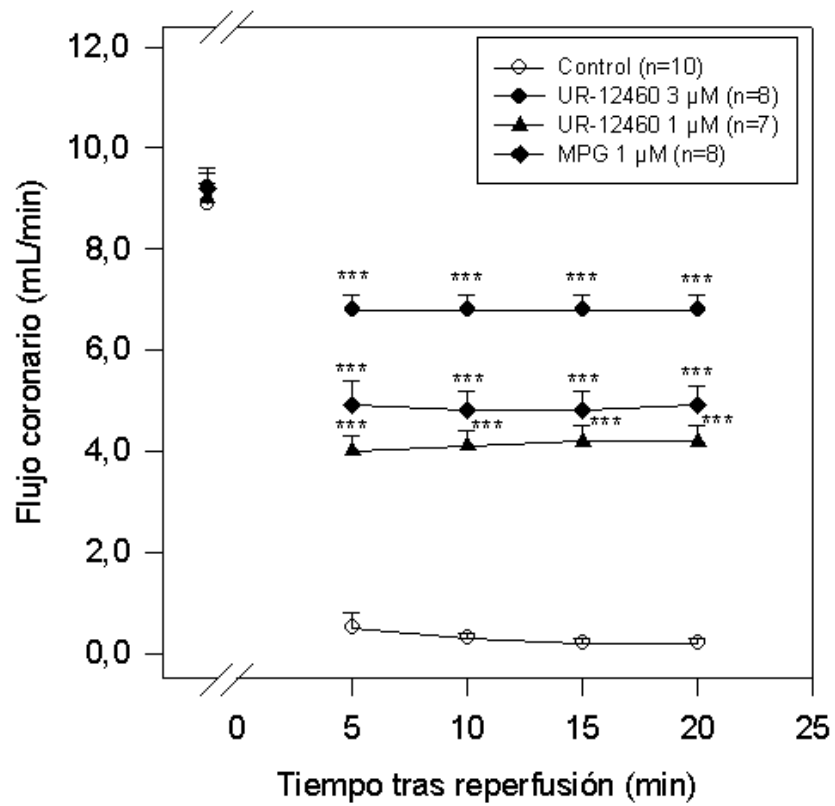


Figura 28.- Valoración del flujo coronario en la reperfusion después de 20 min de isquemia en corazón aislado de rata con adición de sangre en el perfusado. Los compuestos se administran disueltos en el líquido nutritivo (Krebs-Henseleit). *** $p < 0.001$ vs. control (test de Bonferroni).

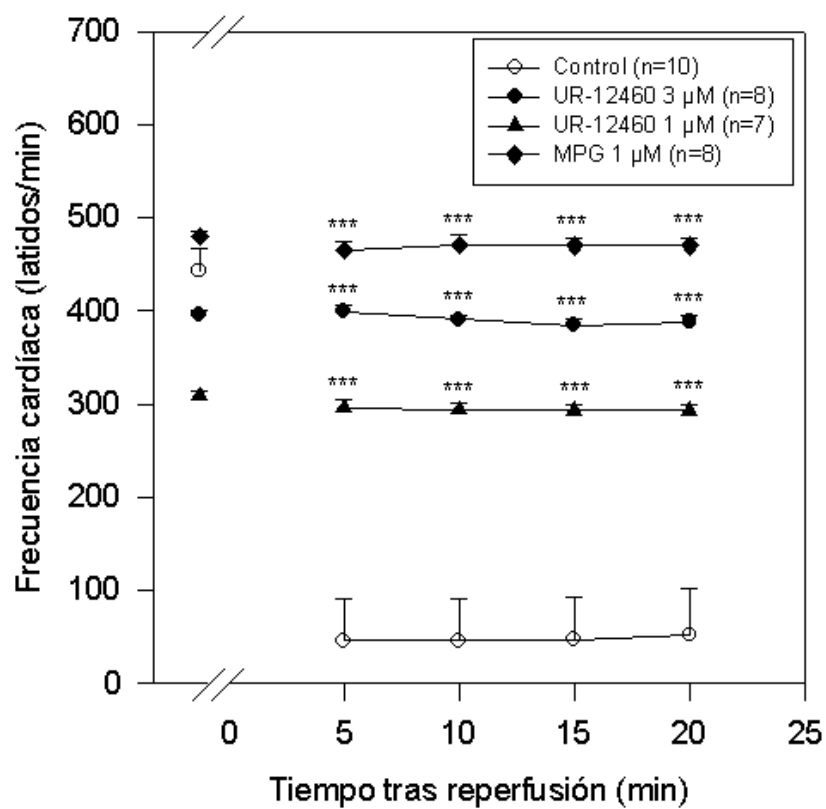


Figura 29.- Valoración de la frecuencia cardíaca en la reperfusion después de 20 min de isquemia en corazón aislado de rata con adición de sangre en el perfusado. Los compuestos se administran disueltos en el líquido nutritivo (Krebs-Henseleit). *** $p < 0.001$ vs. control (test de Bonferroni).

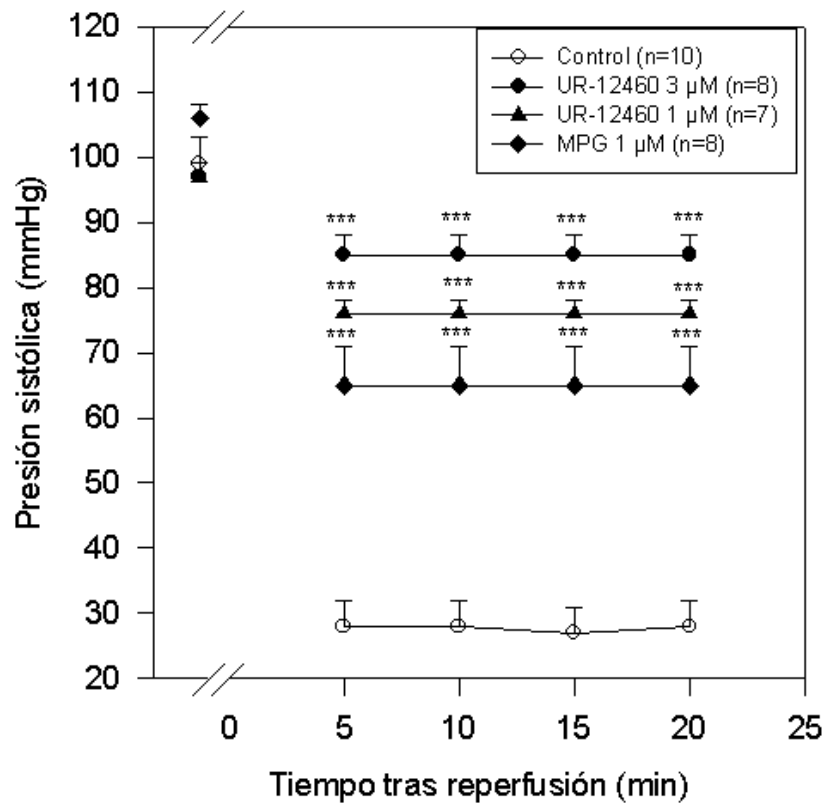


Figura 30.- Valoración de la presión sistólica en la reperfusion después de 20 min de isquemia en corazón aislado de rata con adición de sangre en el perfusado. Los compuestos se administran disueltos en el líquido nutricio (Krebs-Henseleit). *** $p < 0.001$ vs. control (test de Bonferroni).

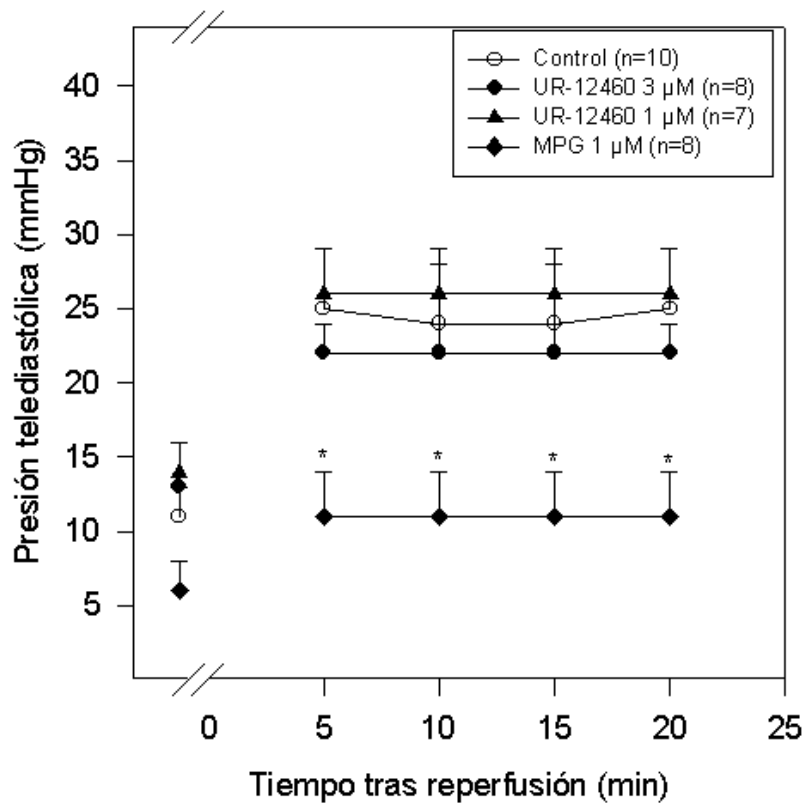


Figura 31.- Valoración de la presión telediastólica en la reperfusion después de 20 min de isquemia en corazón aislado de rata con adición de sangre en el perfusado. Los compuestos se administran disueltos en el líquido nutritivo (Krebs-Henseleit). * $p < 0.05$ vs. control (test de Bonferroni).

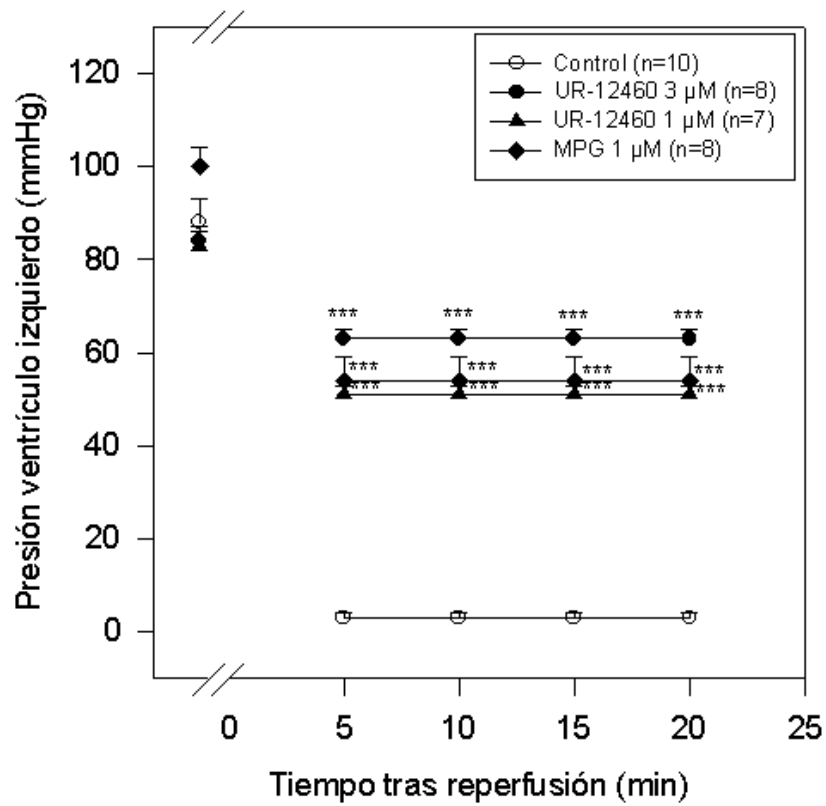


Figura 32.- Valoración de la presión del ventrículo izquierdo en la reperfusion después de 20 min de isquemia en corazón aislado de rata con adición de sangre en el perfusado. Los compuestos se administran disueltos en el líquido nutritivo (Krebs-Henseleit). *** $p < 0.001$ vs. control (test de Bonferroni).

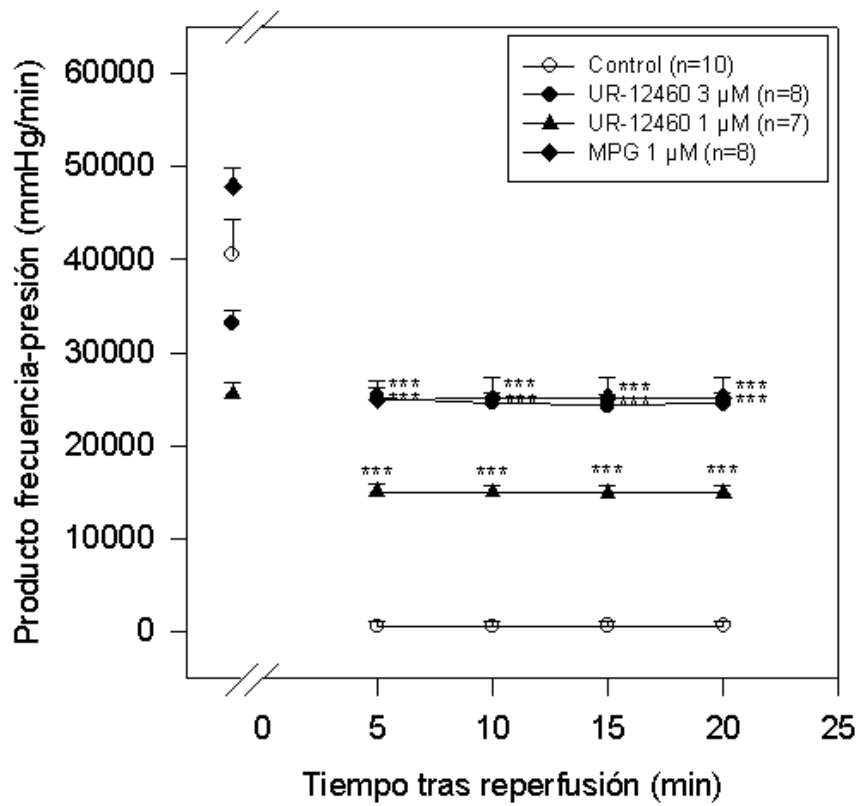


Figura 33.- Valoración del producto frecuencia-presión en la reperfusion después de 20 min de isquemia en corazón aislado de rata con adición de sangre en el perfusado. Los compuestos se administran disueltos en el líquido nutritivo (Krebs-Henseleit). *** $p < 0.001$ vs. control (test de Bonferroni).

III.3.2.1.2. Valoración del área de infarto en el corazón aislado de rata.

Los 20 min de isquemia y los 20 min de reperfusión, añadiendo sangre diluida al perfusado, dan lugar a un área de infarto que corresponde a un 62% del total de miocardio ventricular. La administración de UR-12460 en el perfusado reduce de forma dosis-dependiente y extremadamente significativa la extensión del infarto, con porcentajes del 38 y del 47% respectivamente para las dosis de 3 y 1 μM . La MPG también reduce el infarto de forma extremadamente significativa, con un porcentaje del 35% (fig. 34).

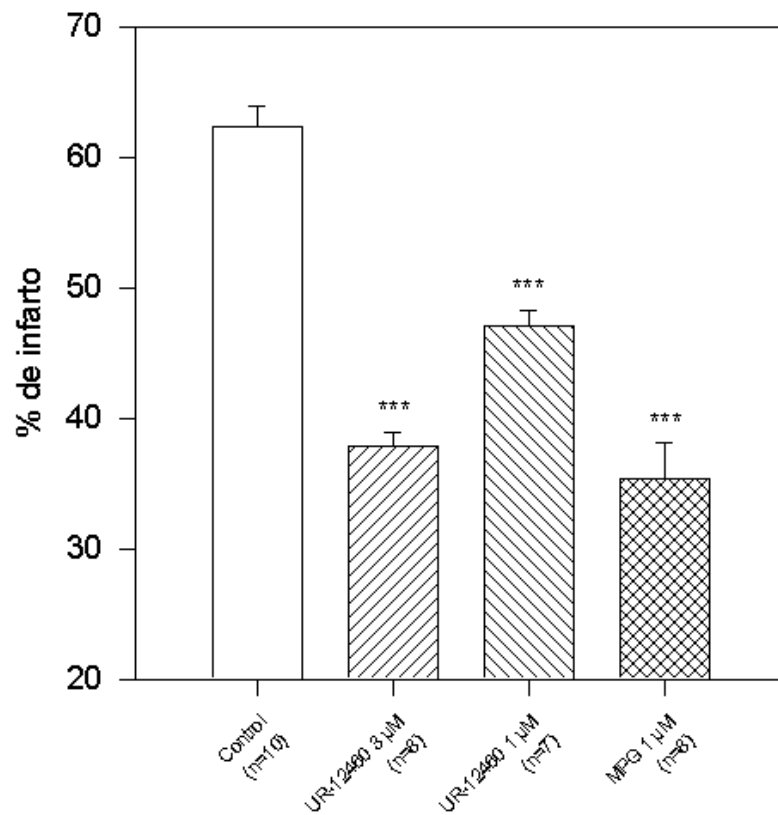


Figura 34.- Porcentaje de infarto con respecto a la totalidad del miocardio después de 20 min de isquemia y 20 de reperfusión en corazón aislado de rata con adición de sangre en el perfusado. Los compuestos se administran disueltos en el líquido nutricio (Krebs-Henseleit). *** $p < 0.001$ vs. control (test de Bonferroni).

III.3.2.1.3. Valoración de la lactato deshidrogenasa (LDH) en el perfusado de corazón aislado de rata.

En el perfusado recogido 1 min después de la reperfusión es donde se halla la máxima actividad de LDH, normalizándose posteriormente los valores. La administración de UR-12460 1 μ M no inhibe este aumento de actividad LDH. La MPG sí que tiene un ligero efecto inhibitor, aunque no llega a ser significativo (fig. 35).

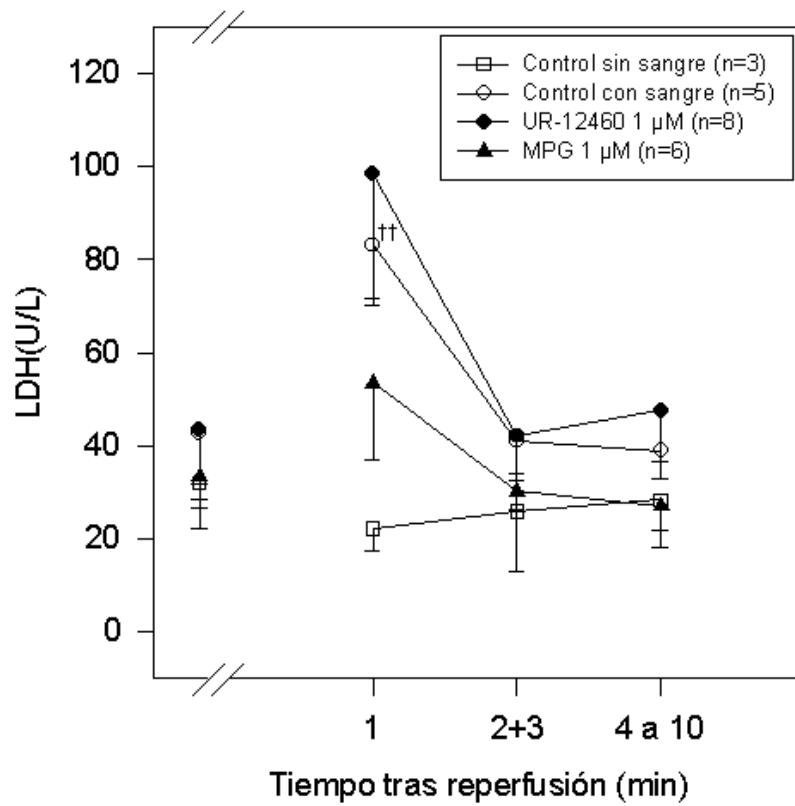


Figura 35.- Variación de la actividad LDH en el perfusado de corazón aislado después de 20 min de isquemia y 20 de reperfusion en corazón aislado de rata con adición de sangre en el perfusado. Los compuestos se administran disueltos en el líquido nutricio (Krebs-Henseleit). †† $p < 0.01$ vs. control sin sangre (test de Bonferroni).

III.3.2.1.4. Valoración de la actividad mieloperoxidasa (MPO) en el corazón aislado de rata.

La valoración de la actividad MPO en tejido miocárdico de corazones aislados sometidos a isquemia-reperusión no ha permitido ver ninguna diferencia entre el grupo control sin sangre y el grupo control con sangre. Tampoco se observan diferencias entre estos grupos y los grupos tratados con UR-12460 o con MPG.

III.3.2.2. *In vivo*.

Para los estudios en rata anestesiada se han utilizado dos protocolos diferentes. La valoración del área de infarto se ha hecho con un protocolo idéntico al de los estudios *in vitro*, es decir: 20 min de isquemia y 20 de reperusión (con la diferencia importante de que *in vitro* se realiza una isquemia global y que en este caso la isquemia se efectúa sobre una zona de riesgo que equivale aproximadamente al 50% del ventrículo izquierdo). Para los estudios electrocardiográficos y hemodinámicos, el protocolo es mucho más corto (6 min isquemia, 10 min reperusión), pues se trata de valorar fenómenos que, particularmente en el caso de las arritmias ventriculares, son de aparición muy rápida.

III.3.2.2.1. Estudio electrocardiográfico y hemodinámico en la rata anestesiada.

En nuestro modelo de isquemia-reperusión miocárdica en la rata tienen lugar fenómenos de taquicardia ventricular (TV) y fibrilación ventricular (FV) que producen la muerte del 83% de los animales controles. El UR-12460, administrado i.v., incrementa el porcentaje de supervivencia significativamente a la dosis de 10 mg/kg + 10 mg/kg/h. El WEB-2086 a la misma dosis no produce ningún efecto. El antioxidante mercaptopropionilglicina (MPG) también aumenta el porcentaje de supervivencia. La quinidina, un antiarrítmico de clase I clásico usado

como patrón de referencia, inhibe al 100% la mortalidad a la dosis de 3 mg/kg + 3 mg/kg/h, y es efectivo incluso a 1 mg/kg + 1 mg/kg/h.

Las arritmias inducidas por la oclusión coronaria son fundamentalmente TV (67% en el grupo control). Solamente el UR-12460 a 10 mg/kg + 10 mg/kg/h disminuye la aparición de TV de forma significativa (23%), mientras que el MPG muestra cierta tendencia. La quinidina no inhibe la aparición de la TV de la oclusión.

La TV de la oclusión comienza a los 318 ± 8 s de realizar la ligadura, y tiene una duración de 7.7 ± 2.4 s. Ningún tratamiento retrasa la aparición de la TV, mientras que la duración se reduce significativamente sólo en el caso del UR-12460 10 mg/kg + 10 mg/kg/h. En el momento de iniciar la desoclusión, la mayoría de animales han vuelto ya al ritmo sinusal.

Las arritmias de la reperfusión son más graves que las inducidas por la isquemia. Un 78% de los controles presentan TV, y no hay ningún tratamiento que reduzca significativamente esta incidencia. Sólo el UR-12460 10 mg/kg + 10 mg/kg/h la reduce en cierto grado (46%). La TV aparece a los 17 ± 6 s y tiene una duración media de 27 ± 7 s. Ninguno de los tratamientos retrasa y/o acorta estos tiempos de forma significativa. El MPG a 30 mg/kg + 30 mg/kg/h aumenta incluso la duración de la TV, pero esto se explica porque el porcentaje de FV es bastante bajo y la mayoría de arritmias de la reperfusión son atribuibles a TV.

Los animales control presentan un 94% de FV en la reperfusión. Sólo el UR-12460 10 mg/kg + 10 mg/kg/h y la quinidina 3 mg/kg + 3 mg/kg/h disminuyen significativamente esta incidencia. El inicio de la FV tiene lugar a los 62 ± 20 s, siendo estas arritmias irreversibles en la mayoría de los casos (88%). Ningún tratamiento modifica el tiempo de inicio de la FV. Sólo la quinidina 3 mg/kg + 3 mg/kg/h es capaz de producir una reversión significativa de la FV (el 100%).

Todos los resultados comentados anteriormente se resumen en la tabla 17.

producto	ISQUEMIA										REPERFUSIÓN			
	Taquicardia ventricular					Taquicardia ventricular					Fibrilación ventricular			
	dosis i.v. (mg/kg + mg/kg/h)	supervivencia (%)	incidencia (%)	inicio (s)	duración (s)	incidencia (%)	inicio (s)	duración (s)	incidencia (%)	inicio (s)	duración (s)	incidencia (%)	inicio (s)	rev (%)
Control de manipulación	-- (n=5)	100	0	--	--	0	--	--	0	--	0	--	--	--
Control	-- (n=18)	17 ^{††}	67 [†]	318±8 (n=12)	7.7±2.4 (n=18)	78 [†]	17±6 (n=14)	27±7 (n=17)	94 [†]	62±20 (n=17)	1:			
UR-12460	10+10 (n=13)	62 [*]	23 [*]	297±19 (n=3)	1.5±0.8 [*] (n=13)	46	28±9 (n=6)	13±8 (n=13)	54 [*]	19±9 (n=6)	2:			
	3+3 (n=10)	40	30	327±11 (n=3)	2.0±1.3 (n=10)	100	30±11 (n=10)	58±16 (n=10)	100	57±17 (n=10)	4			
WEB-2086	10+10 (n=5)	20	60	328±10 (n=3)	3.4±2.0 (n=5)	100	2±1 (n=3)	41±13 (n=3)	100	49±12 (n=3)	2:			
Quinidina	3+3 (n=8)	100 ^{***}	63	327±6 (n=5)	3.3±1.2 (n=8)	75	18±6 (n=6)	54±19 (n=8)	50 [*]	60±9 (n=4)	10C			
	1+1 (n=5)	40	20	--	1.6±1.4 (n=5)	60	21±11 (n=3)	40±24 (n=5)	80	44±13 (n=4)	5:			
MPG	30+30 (n=7)	43	43	331±16 (n=3)	3.3±1.5 (n=7)	100	24±11 (n=7)	66±18 [*] (n=7)	57	127±39 (n=4)	2:			
	10+10 (n=7)	57	29	308±12 (n=2)	2.3±1.8 (n=7)	86	37±9 (n=6)	35±25 (n=7)	71	105±25 (n=5)	4			

Tabla 17.- Valores de supervivencia y características de las arritmias durante la isquemia (6 min) y la reperusión (10 min) miocárdica en rata anestesiada. Los valores de supervivencia, incidencia y reversión de la FV se expresan como porcentaje, mientras que los de tiempo de inicio y duración se expresan como la media ± error estándar de n animales. Los compuestos se administran 10 min antes de la isquemia en forma de bolus i.v., seguido de infusión continua hasta el final del experimento. † p<0.05, †† p<0.01 vs. control de manipulación, * p<0.05, *** p<0.001 vs. control (test de Fischer y test t de Student).

La evolución de las presiones sistólica, diastólica y media durante el experimento se muestran en la figura 36. La anestesia y la intervención quirúrgica producen una disminución bastante considerable de la presión arterial (unos 50 mmHg, aproximadamente). Esta presión permanece bastante estable durante la oclusión, pero cae bruscamente en el momento de la desoclusión en el grupo control, coincidiendo la inmensa mayoría de las veces con la muerte de los animales.

Como ya se ha comentado, los niveles de mortalidad son bastante elevados en algunos grupos. En estos casos, los animales que sobreviven suelen presentar valores de presión y frecuencia cardíaca bastante normales, que pueden falsear la interpretación del resultado. Por este motivo se han omitido los puntos de las gráficas que corresponden a una n menor de 4.

La quinidina a la dosis i.v. de 3 mg/kg + 3 mg/kg/h y el UR-12460 a 10 mg/kg + 10 mg/kg/h, inhiben la bajada de presión que se produce tras la desoclusión coronaria.

La figura 37 muestra la evolución de la frecuencia cardíaca y del índice frecuencia-presión. Este último parámetro, calculado a partir de la frecuencia y de la presión arterial media, permanece estable en los grupos tratados con quinidina y con UR-12460. La frecuencia cardíaca, por su parte, presenta cierta variabilidad entre los grupos. Se puede apreciar, sin embargo, que hay una ligera disminución en el grupo tratado con UR-12460, que se estabiliza al final del experimento, y que los animales tratados con quinidina experimentan una recuperación notable de su ritmo cardíaco. La anestesia y la intervención quirúrgica no parecen influir de forma importante sobre este parámetro.

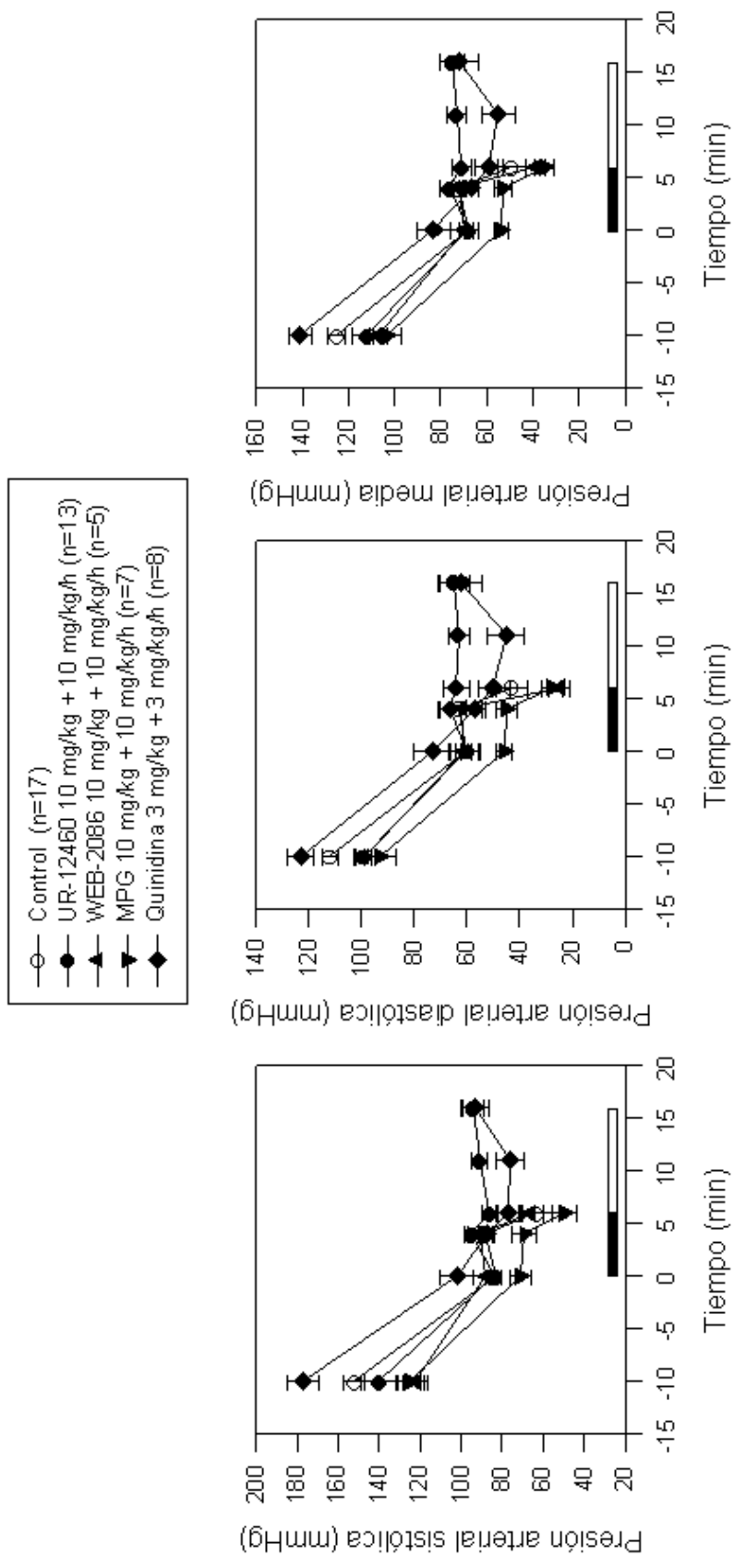


Figura 36.- Variación de la presión arterial sistólica, diastólica y media en la rata anestesiada durante la oclusión (barra negra) y desocclusión (barra blanca) de la arteria coronaria. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. 10 min antes de la oclusión, seguido de una infusión continua hasta el final del

www.nature.com/scientificreports/

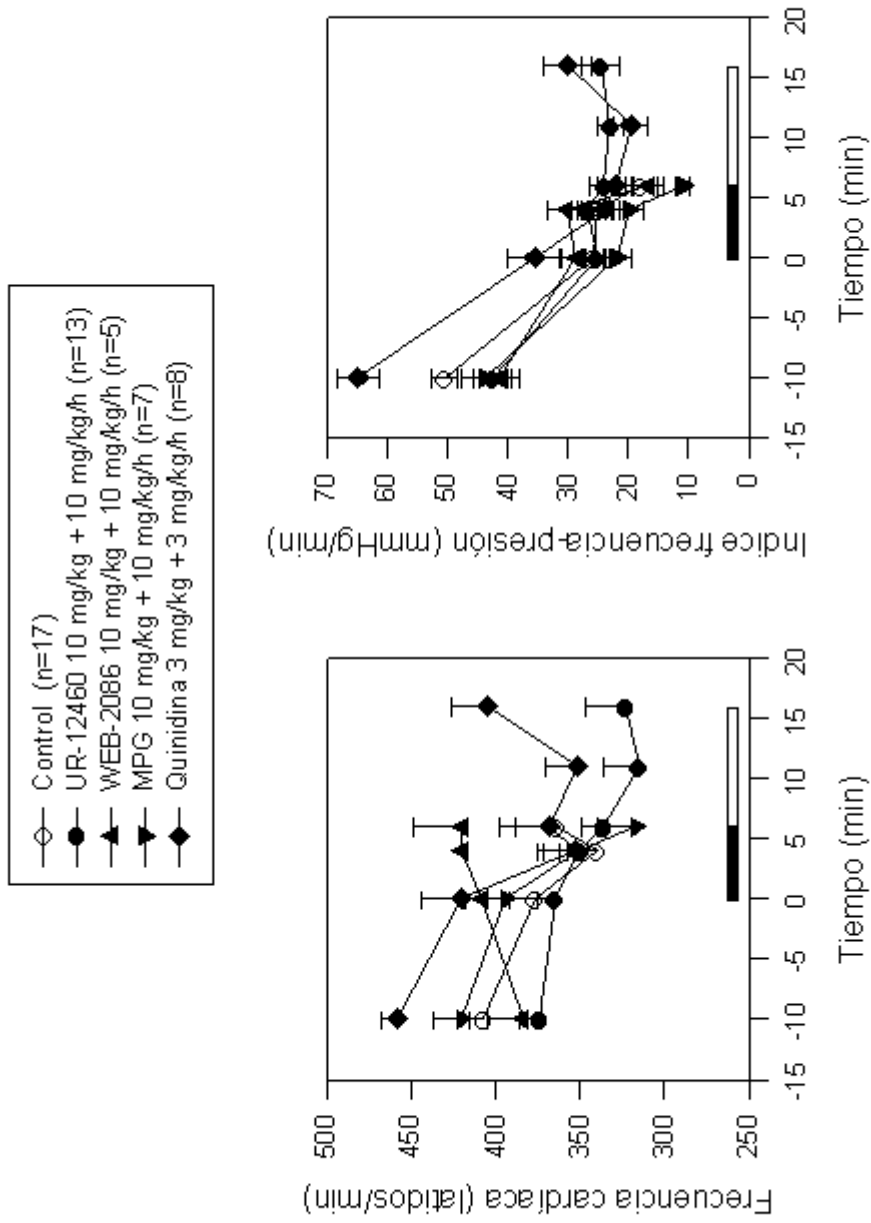


Figura 37.- Variación de la frecuencia cardiaca y del índice frecuencia-presión en la rata anestesiada durante la oclusión (barra negra) y desoclusión (barra blanca) de la arteria coronaria. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. 10 min antes de la oclusión, seguido de una infusión continua hasta el final del experimento.

III.3.2.2.2. Estudio del área de infarto en miocardio de rata.

La oclusión de la arteria coronaria descendente izquierda de la rata supone bloquear el aporte sanguíneo a una zona importante del ventrículo izquierdo, que es lo que llamamos área de riesgo. Como se aprecia en la figura 38, las áreas de riesgo en todos los grupos han sido prácticamente idénticas, lo cual dice mucho en favor de la reproducibilidad de este método.

La manipulación quirúrgica de los animales (grupo control de manipulación) induce la aparición de pequeñas zonas de infarto, que corresponden a un 19% del área de riesgo. La oclusión y reperfusión, por otra parte, produce una zona de infarto de un 66% con respecto al área de riesgo. Tanto el UR-12460 como la MPG producen una disminución significativa del infarto, con porcentajes del 51 y 44%, respectivamente.

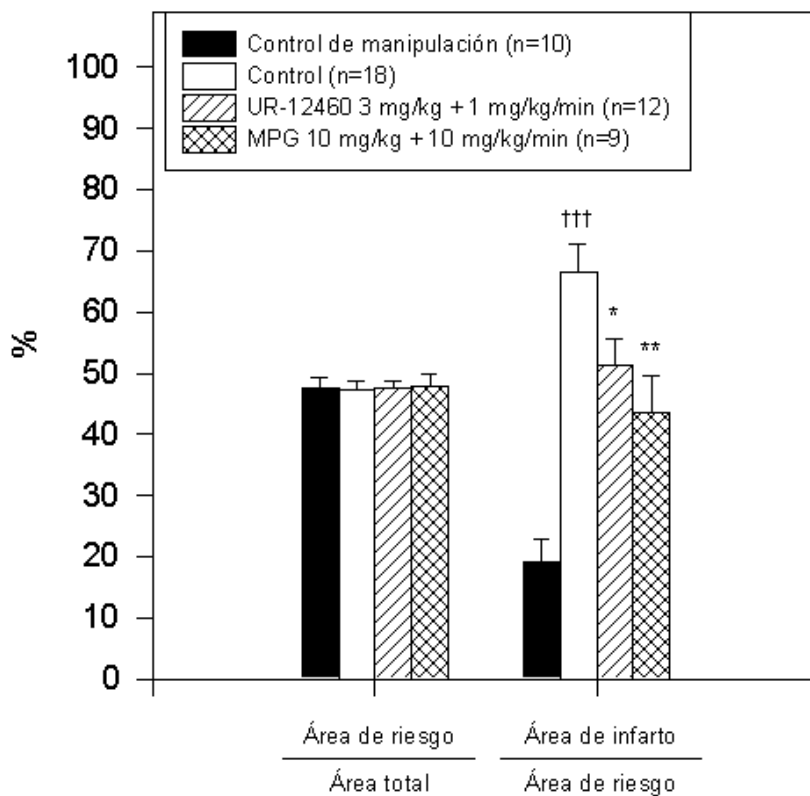


Figura 38.- Porcentaje de área de riesgo con respecto al área total del ventrículo izquierdo y porcentaje de infarto con respecto al área de riesgo después de 20 min de oclusión y 20 de desoclusión de la arteria coronaria. Los compuestos se administran en forma de bolus 5 min antes de la desoclusión, seguido de una infusión continua hasta el final del experimento. ††† $p < 0.001$ vs. control de manipulación; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control (test de Bonferroni).

III.3.2.2.3. Valoración de la lactato deshidrogenasa (LDH) en plasma.

Los niveles de LDH en ratas sometidas a isquemia-reperfusión miocárdica aumentan significativamente al compararlas con los niveles basales. Este aumento es inhibido por la administración de UR-12460 y de MPG, aunque estas inhibiciones no llegan a ser estadísticamente significativas: los valores de p son 0.06 y 0.09 vs. control, respectivamente (test t de Student) (fig. 39).

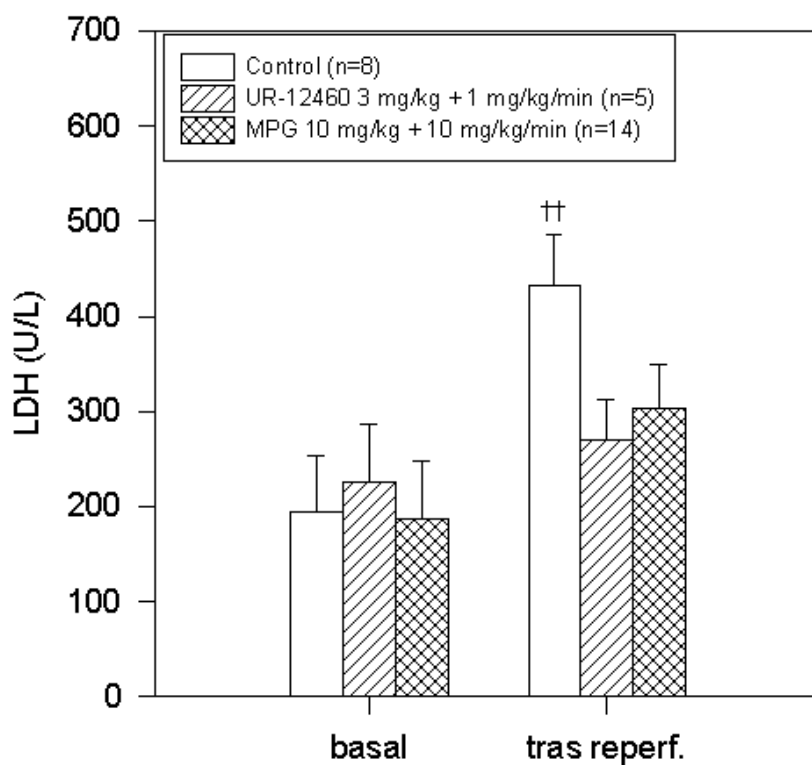


Figura 39.- Concentración basal de LDH en plasma de rata y después de 20 min de oclusión y 20 de desoclusión de la arteria coronaria. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. 5 min antes de la desoclusión, seguido de una infusión continua hasta el final del experimento. †† $p < 0.01$ vs. control basal (test t de Student).

III.3.2.2.4. Valoración de la actividad mieloperoxidasa en miocardio de rata.

Las áreas de riesgo del grupo control presentan unos niveles de actividad mieloperoxidasa (MPO) (expresada como la diferencia en absorbancia (en unidades) por minuto y por mg de proteína) muy aumentados con respecto a las áreas del grupo control de manipulación. La administración de UR-12460 y de MPG reduce de manera extremadamente significativa el aumento de la actividad MPO (fig. 40).

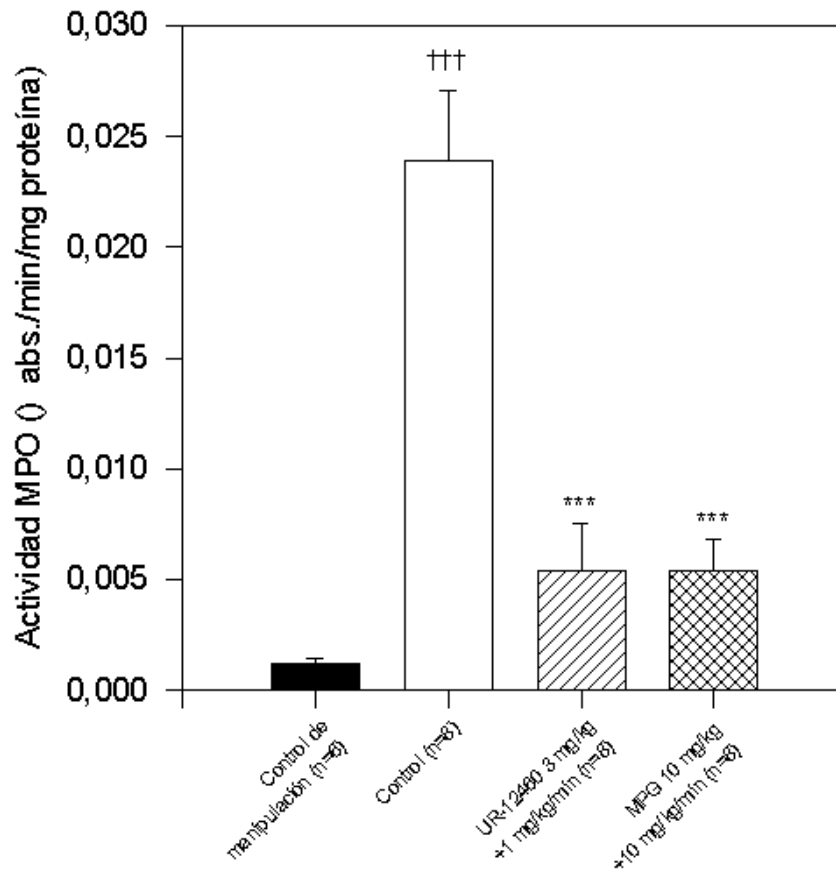


Figura 40.- Actividad MPO en las áreas de riesgo de corazón de rata después de 20 min de oclusión y 20 de desoclusión de la arteria coronaria. Los compuestos se administran en forma de bolus i.v. 5 min antes de la desoclusión, seguido de una infusión continua hasta el final del experimento. ††† $p < 0.01$ vs. control de manipulación; *** $p < 0.001$ vs. control (test de Bonferroni).