

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas



* 5 3 0 9 5 5 7 3 9 2 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**PCA-4248: UN ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DEL PAF
CON ACTIVIDAD TERAPEUTICA POTENCIAL EN EL
SHOCK SEPTICO**

TESIS DOCTORAL

M^a del Mar Gómez Rodríguez

1993

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**PCA-4248: UN ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DEL PAF
CON ACTIVIDAD TERAPEUTICA POTENCIAL EN EL
SHOCK SEPTICO**

Directores:

Dr. Mariano Sánchez-Crespo

Dr. Carlos Sunkel Letelier

Prof. Investigación C.S.I.C.

Dtor. Dpto. Investigación ALTER

S.A.

TESIS DOCTORAL

M^a del Mar Gómez Rodríguez

1993



S. A. DE PRODUCTOS QUÍMICO-FARMACÉUTICOS

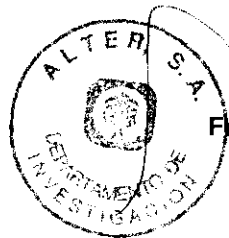
Los doctores **D. Mariano Sánchez-Crespo**, Doctor en Medicina y Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y **D. Carlos Sunkel Letelier**, Doctor en Ciencias Químicas y Director del Departamento de Investigación de Laboratorios ALTER S.A.

CERTIFICAN: Que Doña M^ª del Mar Gómez Rodríguez, Licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha llevado a cabo bajo su dirección los trabajos necesarios para la realización de la presente tesis doctoral.

Y para que conste, firman la presente en Madrid, a 10 de Noviembre de 1993.

Directores de la tesis doctoral.

Fdo. Dr. M. Sánchez-Crespo



Fdo. Dr. C. Sunkel Letelier

Tutor: Fdo. Dra. T. Portolés Pérez

Doctorando: Fdo. M.M. Gómez Rodríguez

ABREVIATURAS

AA: Acido araquidónico.

ADP: Difosfato de adenosina.

AMPc: 3',5' Fosfato cíclico de adenosina.

ATP: Trifosfato de adenosina.

Bmax: Unión máxima.

BSA: Albúmina bovina sérica.

[Ca²⁺]_i: Concentración de calcio citosólico.

CMC: Carboximetilcelulosa.

DAG: Diacilglicerol.

1,4-DHPs: 1,4-Dihidropiridinas.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

ED₅₀: Dosis efectiva 50%.

ED₈₀: Dosis efectiva 80%.

EDTA: Acido etilendiamino tetraacético.

EGTA: Acido etilenglicol-bis-(β-aminometiléter) N,N,N',N'-tetraacético.

EPF: Factor temprano del embarazo.

E.S: Error standard.

fMLP: N-formil-metionil-leucil-fenilalanina.

GMPc: Monofosfato cíclico de guanidina.

GP: sn-Glicero-3-fosfato.

GPC: sn-Glicero-3-fosfocolina.

GTP: Guanosina 5-trifosfato.

HMTC: Valor hematocrito.

HEPES: Acido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico.

IC₅₀: Concentración que provoca una inhibición 50%.

IgE: Inmunoglobulina E.

IL-1: Interleuquina 1.

IL-6: Interleuquina 6.

IP₃: Inositol trifosfato.

K_D: Constante de disociación.

K_i: Constante de inhibición.

Liso-PAF: 1-O-hexadecil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina

LPS: Lipopolisacárido de E. Coli.

LTB₄: Leucotrieno B₄.

LTC₄: Leucotrieno C₄.

LTD₄: Leucotrieno D₄.

LTE₄: Leucotrieno E₄.

O₂⁻: Anión superóxido.

PAF: Factor activador de plaquetas. 1-O-hexadecil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina

PC: Fosfatidilcolina

PEG: Polietilenglicol.

PGE₂: Prostaglandina E₂.

PGs: Prostaglandinas.

PHA: Fitohemaglutinina.

PIs: Fosfoinosítidos.

PKC: Proteína kinasa C.

PLA₂: Fosfolipasa A₂.

PLC: Fosfolipasa C.

PMNs: Leucocitos polimorfonucleares.

P.P.P.: Plasma pobre en plaquetas.

P.R.P.: Plasma rico en plaquetas.

TNF: Factor de necrosis tumoral α .

TXA₂: Tromboxano A₂.

INDICE

INDICE

I	INTRODUCCION	11
1	EL FACTOR ACTIVADOR DE LAS PLAQUETAS ES UN AUTACOIDE DE NATURALEZA FOSFOLIPIDICA.	12
1.1	PRODUCCION DEL FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS: MECANISMO DE ACTIVACION - INACTIVACION.	14
1.2	BIOSINTESIS DE NOVO.	16
1.3	OTRAS RUTAS METABOLICAS.	16
2	ACTIVIDADES FISIOLÓGICAS Y FARMACOLÓGICAS DEL PAF.	18
2.1	CELULAS DIANA.	19
2.1.1	PLAQUETAS.	19
2.1.2	LEUCOCITOS.	21
	<u>Polimorfonucleares.</u>	22
	<u>Macrófagos y monocitos.</u>	23
	<u>Linfocitos.</u>	23
2.1.3	EFFECTO SOBRE OTROS TIPOS CELULARES.	24

2.2	SOBRE ORGANOS AISLADOS.	24
2.2.1	APARATO RESPIRATORIO.	24
2.2.2	SISTEMA CARDIOVASCULAR.	25
2.2.3	APARATO DIGESTIVO.	25
2.2.4	OTROS TEJIDOS.	26
2.3	EFFECTOS FARMACOLOGICOS DEL PAF SOBRE ANIMAL DE EXPERIMENTACION: ANALOGIAS CON MODELOS PATOLOGICOS EXPERIMENTALES.	27
2.3.1	PAPEL DEL PAF EN LAS REACCIONES INFLAMATORIAS.	27
2.3.2	ASMA Y ANAFILAXIA SISTEMICA.	28
2.3.3	EL PAF EN LAS ALTERACIONES CARDIOVASCULARES.	29
2.3.4	EL PAF EN EL SHOCK ENDOTOXICO.	31
2.3.5	EL PAF EN OTROS ESTADOS PATOLOGICOS.	32
	<u>Rechazo de 6rganos trasplantados.</u>	33
	<u>Alteraciones en el sistema nervioso central.</u>	33
	<u>Etapas tempranas del embarazo.</u>	34
3	RECEPTORES DEL PAF.	35
3.1	AGONISTAS DEL PAF - ACETER.	36
3.1.1	MODIFICACIONES EN LOS SUSTITUYENTES.	37
3.1.2	ISOMEROS DE POSICION.	38
3.1.3	CAMBIOS EN EL ESQUELETO DE GLICERINA.	39
3.2	ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL PAF.	39
3.2.1.	ANTAGONISTAS DE ORIGEN NATURAL.	39

3.2.2	ANTAGONISTAS SINTETICOS.	40
	<u>Análogos de PAF.</u>	41
	<u>Antagonistas no relacionados estructuralmente con PAF.</u>	42
3.3	MODELO DEL RECEPTOR DEL PAF.	43
4	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.	47
II	MATERIALES Y METODOS	50
1	TAMPONES Y SOLUCIONES.	51
2	REACTIVOS.	55
3	DESCRIPCION QUIMICA DEL PCA-4248.	58
3.1	ESTRUCTURA QUIMICA.	58
3.2	FORMULA ESTRUCTURAL.	58
3.3	PESO MOLECULAR.	58
3.4	NOMBRE QUIMICO.	58
3.5	CLAVE DE LABORATORIO.	58
3.6	ASPECTO.	58
3.7	PUNTO DE FUSION.	58
3.8	SOLUBILIDAD A TEMPERATURA AMBIENTE.	59
3.9	ESTABILIDAD.	59

3.10	SINTESIS.	59
4	ESTUDIOS EN CELULAS AISLADAS.	61
4.1	ENSAYOS SOBRE PLAQUETAS.	61
4.1.1.	OBTENCION DE LAS CELULAS.	61
	<u>Preparación de plasma rico en plaquetas.</u>	61
	<u>Preparación de plaquetas filtradas.</u>	61
	<u>Obtención de plaquetas lavadas de conejo.</u>	62
4.1.2	AGREGOMETRIA Y LIBERACION DE ATP.	62
	<u>Agregación por distintos agonistas en plasma rico</u> <u>en plaquetas humano.</u>	63
	<u>Agregación inducida por PAF en plaquetas lavadas</u> <u>de conejo.</u>	64
4.1.3	ESTUDIOS DE UNION AL RECEPTOR.	64
	<u>Estudios sobre plaquetas lavadas de conejo.</u>	64
	<u>Estudios sobre plaquetas filtradas humanas.</u>	65
4.1.4	MEDIDA DE LA MOVILIZACION DE Ca ²⁺	66
4.2	ESTUDIOS EN CELULAS POLIMORFONUCLEARES.	68
4.2.1	OBTENCION DE LAS CELULAS.	68
	<u>Preparación de polimorfonucleares de conejo.</u>	68
	<u>Obtención de polimorfonucleares humanos.</u>	69
4.2.2	ENSAYOS DE UNION AL RECEPTOR.	69
	<u>Estudios de unión al receptor de polimorfonucleares</u> <u>de conejo.</u>	69

<u>Estudios de unión al receptor en polimorfonucleares</u>	
<u>humanos.</u>	70
4.3 ENSAYOS EN MACROFAGOS ALVEOLARES DE COBAYA.	70
4.3.1 OBTENCION DE LAS CELULAS.	70
4.3.2 ESTUDIOS DE UNION AL RECEPTOR.	71
4.3.3 ESTUDIOS DE PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO.	72
5 ESTUDIOS "IN VIVO".	73
5.1 AGREGACION "EX VIVO" EN P.R.P. DE CONEJO.	73
5.2 MODELOS DE HIPOTENSION EN RATA ANESTESIADA.	74
5.2.1 HIPOTENSION INDUCIDA POR PAF.	74
5.2.2 HIPOTENSION INDUCIDA POR ENDOTOXINA BACTERIANA.	75
5.3 MODELOS DE SHOCK EN RATON.	77
5.3.1 MORTALIDAD INDUCIDA POR PAF.	77
5.3.2 MORTALIDAD INDUCIDA POR ENDOTOXINA BACTERIANA.	77
5.4 ANALISIS ESTADISTICO.	78
III RESULTADOS	79
1 EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE PAF EXOGENO	
"IN VITRO".	80
1.1 AGREGACION Y SECRECION DE ATP EN PLAQUETAS DE CONEJO	

	INDUCIDA POR PAF.	80
1.2	AGREGACION Y LIBERACION DE ATP SOBRE PLASMA RICO EN PLAQUETAS (P.R.P.) HUMANO INDUCIDA POR PAF.	83
1.3	AGREGACION INDUCIDA POR OTROS AGENTES AGREGANTES SOBRE PLASMA RICO EN PLAQUETAS (P.R.P.) HUMANO.	86
1.4	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA MOVILIZACION DE Ca^{2+} EN PLAQUETAS INDUCIDA POR PAF.	87
1.5	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO EN MACROFAGOS ALVEOLARES DE COBAYA ESTIMULADOS POR PAF.	91
2	ESTUDIOS DE UNION DEL PCA-4248 AL RECEPTOR DEL PAF EN DISTINTAS CELULAS.	92
2.1	INTERACCION DEL PCA-4248 CON EL RECEPTOR DE PAF EN PLAQUETAS DE CONEJO.	92
2.2	INTERACCION DEL PCA-4248 SOBRE EL RECEPTOR DEL PAF EN PLAQUETAS HUMANAS.	96
2.3	INTERACCION DEL PCA-4248 CON EL RECEPTOR PARA EL PAF EN POLIMORFONUCLEARES DE CONEJO.	98
2.4	INTERACCION DEL PCA-4248 CON EL RECEPTOR PARA EL PAF EN POLIMORFONUCLEARES HUMANOS.	99
2.5	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE EL RECEPTOR DE PAF EN MACROFAGOS ALVEOLARES DE COBAYA.	101

3	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA ACTIVIDAD DE PAF EXOGENO "IN VIVO".	102
3.1	AGREGACION "EX VIVO" DE PLAQUETAS DE CONEJOS TRATADOS CON PCA-4248.	102
3.2	EFFECTO SOBRE LA HIPOTENSION Y LA HEMOCONCENTRACION INDUCIDA POR PAF EN RATA ANESTESIADA.	104
3.3	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA MORTALIDAD EN RATON INDUCIDA POR PAF.	108
4	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA ACTIVIDAD DE PAF ENDOGENO "IN VITRO".	111
4.1	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO INDUCIDA POR PAF, TNF, LPS Y fMLP.	111
4.2	PRODUCCION DE PAF INDUCIDA POR LPS Y TNF EN MACROFAGOS.	113
4.3	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO INDUCIDA POR PAF, TNF Y FMLP EN MACROFAGOS ACTIVADOS POR LPS.	114
4.4	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO POR PAF Y fMLP EN MACROFAGOS ACTIVADOS POR TNF.	116
4.5	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO POR LPS, TNF Y fMLP EN MACROFAGOS ACTIVADOS	

	POR PAF.	116
4.6	EFFECTO DE TNF Y LPS SOBRE LA UNION DE PAF A SU RECEPTOR EN MACROFAGOS ALVEOLARES. EFFECTO DEL PCA-4248.	120
5	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PAF ENDOGENO "IN VIVO".	123
5.1	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA HIPOTENSION EN RATA INDUCIDA POR LPS.	123
5.2	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LEUCOPENIA Y TROMBOCITOPENIA EN RATA INDUCIDA POR LPS.	127
5.3	EFFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA MORTALIDAD EN RATON INDUCIDA POR LPS.	129
IV	DISCUSION	132
	CONCLUSIONES	145
V	BIBLIOGRAFIA	148

RESUMEN

El factor activador de plaquetas (PAF) es un mediador fosfolipídico implicado en muchos procesos fisiológicos y patológicos, entre los que se pueden mencionar el asma, la anafilaxia, alteraciones cardiovasculares y el shock séptico. El PAF actúa sobre las células a través de receptores específicos en la membrana celular.

Desde hace varios años la síntesis y el desarrollo de compuestos antagonistas del receptor del PAF ha supuesto para la investigación farmacobiológica un interesante tema de estudio. El objetivo de esta tesis doctoral fue estudiar la actividad de una molécula de nueva síntesis con estructura 1,4 dihidropiridínica. El PCA-4248 es un derivado del núcleo de 1,4-DHPs, carente de la actividad sobre el sistema cardiovascular que generalmente se asocia a este tipo de moléculas, pero que posee actividad antagonista del receptor del PAF.

Los resultados presentados en esta tesis demostraron que el PCA-4248 es capaz de antagonizar los efectos del PAF en células aisladas y en modelos animales que trataban de reproducir algunas de las situaciones patológicas en que parece estar implicado este mediador. Se demostró que la actividad del PCA-4248 era debida a la capacidad del compuesto para unirse de manera específica, competitiva y reversible al receptor del PAF de distintos tipos de células procedentes de especies animales diferentes.

Por último, la relación que existe entre el PAF y otros mediadores, fundamentalmente citoquinas y metabolitos de ácido araquidónico, en distintas situaciones patológicas, nos llevó a profundizar en el estudio de la actividad del compuesto sobre estas interacciones "in vitro" e "in vivo". Los resultados obtenidos mostraron que el PCA-4248 resultó activo en los modelos dependientes de la cooperación de PAF-citoquinas, presentando además de su actividad antagonista del receptor del PAF, capacidad para antagonizar algunos efectos del factor de necrosis tumoral.

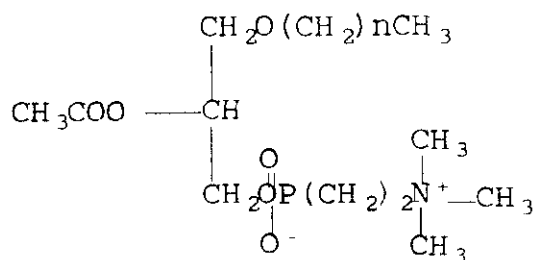
I INTRODUCCION

1 EL FACTOR ACTIVADOR DE LAS PLAQUETAS ES UN AUTACOIDE DE NATURALEZA FOSFOLIPIDICA.

La existencia de un factor activador de plaquetas como mediador de fase fluída de las reacciones anafilácticas, se propuso por primera vez en la segunda mitad de los años 60, cuando se observó que la adición de antígeno a células sensibilizadas de conejo provocaba la activación de los leucocitos^{1,2,3}, y la liberación posterior de histamina de las plaquetas. En 1972 se descubrió que el leucocito implicado era el basófilo, la clase de anticuerpo responsable de la sensibilización la IgE, y se propuso el nombre de factor activador de las plaquetas para el mediador soluble⁴, cuyo acrónimo sobre las iniciales en inglés es PAF. En 1979, tres grupos independientes de investigadores propusieron la estructura del PAF como: 1-O-alkil-2-acetil-sn-gliceril-3-fosfocolina^{5,6,7}, y en 1980 se confirmó esta estructura por espectrometría de masas del PAF obtenido de basófilos de conejo⁸ (Fig.1).

En la actualidad, existe aún controversia sobre la composición de la cadena unida al carbono en posición 1 del glicerol. Así, mientras algunos autores describieron la existencia exclusiva de 1-O-hexadecil-PAF, otros describen también la existencia de especies moleculares 16:0, 17:0, 18:0, 18:1, 15:0 y 22:2⁹.

El PAF no es un autacoide que se acumule en las células, sino que se produce en respuesta a la estimulación. Entre las células capaces de producirlo se deben mencionar: macrófagos, células endoteliales, polimorfonucleares, monocitos y plaquetas.



Donde $n=16, 17, 18 \dots$

FIGURA 1. Estructura del PAF.

A partir de la definición de la estructura del PAF se propusieron vías de síntesis y catabolismo. Una clave importante para el estudio del metabolismo del PAF fue la identificación de liso-PAF en los tejidos, compuesto con propiedades estructurales únicas para ser considerado precursor y producto del catabolismo, y carente de actividad biológica.

La diversidad de efectos ejercidos por el PAF sobre una gran variedad de células diana, sugirieron la existencia de vías metabólicas de cuya regulación depende la concentración de PAF en los tejidos. Estas vías son:

- 1 El denominado ciclo de activación - inactivación.
- 2 Biosíntesis de novo.
- 3 Otras rutas metabólicas.

1.1 PRODUCCION DEL FACTOR ACTIVADOR DE LAS PLAQUETAS: CICLO DE ACTIVACION - INACTIVACION.

La idea que el liso-PAF es precursor y producto del catabolismo del PAF se basa en dos hechos experimentales:

- La demostración en un gran número de tipos celulares de una acetiltransferasa específica para PAF, cuya activación coincide con la estimulación celular y la producción de PAF.
- La observación de que la inhibición de la actividad PLA₂ reduce la formación de liso-PAF y de PAF¹⁰.

La actividad de la PLA₂ se modula por varios factores: los niveles de Ca²⁺, una proteína de la familia de las lipocortinas¹¹, la cantidad de ácidos grasos disponibles y la presencia de metabolitos de ciclooxigenasa y lipoxigenasa. Por otro lado, la actividad de la acetiltransferasa es controlada por los niveles de iones calcio en el citosol¹². Por último, reacciones de fosforilación/defosforilación modulan la actividad de las lipocortinas y de la acetiltransferasa

Paralelamente a la formación de PAF, se produce la inactivación por una actividad acetilhidrolasa citosólica y extracelular, especialmente abundante en el plasma¹³. La actividad acetilhidrolasa se diferencia de la PLA₂ en varios aspectos: es independiente de calcio, es específica para cadenas cortas de ácido graso en la posición sn-2 y se localiza fundamentalmente en el citosol¹⁴. Esta reacción da lugar a la formación de liso-PAF. El liso-PAF formado se metaboliza por la transferencia de un radical de ácido graso de cadena larga en posición sn-2 por la acción de una aciltransferasa. Los 1-O-alkil-2-O-acil-GPC resultantes se reincorporan a la membrana completando el ciclo¹⁵ (Fig.2).

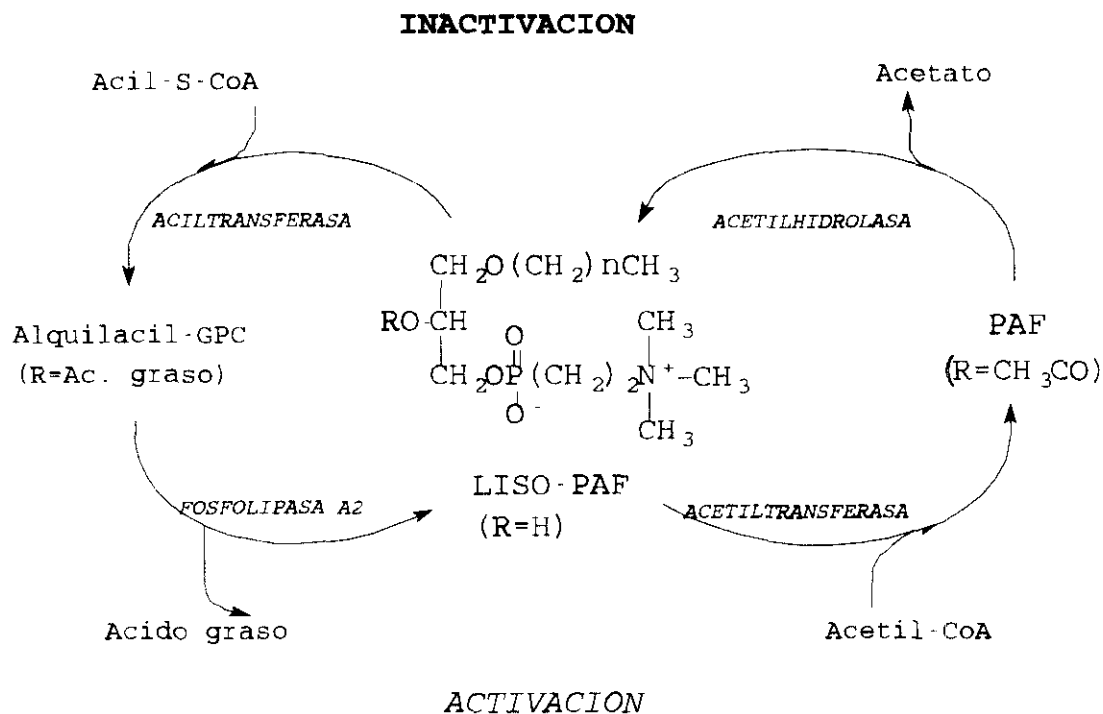


FIGURA 2. Ciclo de activación - inactivación del PAF

En estudios realizados en distintos tipos de células, se observó que el AA es uno de los ácidos grasos que se incorpora mayoritariamente en el ciclo. Esto hecho implica que 1-O-alkil-2-O-araquidonil-GPC sería el precursor de PAF y AA¹⁶. Esto representaría un importante punto de contacto entre dos familias de mediadores lipídicos. Sin embargo, publicaciones más recientes¹⁷ indican la existencia de una transacilasa CoA independiente con actividad de fosfolipasa y acetiltransferasa. Esta enzima intercambiaría araquidonato entre los fosfoglicéridos de etanolamina y colina y éste sería el mecanismo que iniciaría la producción de PAF. Estos experimentos indicarían que la generación de ambos tipos de mediadores no estarían regulados por un paso limitante común que es la activación de la PLA₂¹⁸, al menos en

polimorfonucleares humanos.

1.2 BIOSÍNTESIS DE NOVO.

Además de el ciclo de activación-inactivación anteriormente descrito, se ha demostrado una vía de biosíntesis de PAF por la transferencia de fosfocolina a los 1-O-alkil-2(R)-cetilgliceroles¹⁹(Fig.3). Esta vía empezó a recibir atención cuando se produjeron las siguientes observaciones:

- El hexadecanol marcado puede incorporarse a la vía biosintética del alquilgliceroles²⁰.
- La transformación de alquil-liso-GP en alquilacetil-GP por la acción de una acetilCoA acetiltransferasa.
- El alquilacetil-GP se defosforila para generar un alquilacetil-G²¹.

En el caso en que la acilación ocurriera por una aciltransferasa específica de araquidonato se obtendría 1-O-alkil-2-araquidonil-GPC. Este mecanismo puede constituir una fuente alternativa de lípidos de membrana y sería el nexu entre ambas vías de biosíntesis.

1.3 OTRAS RUTAS METABOLICAS.

Aparte de la acetilhidrolasa descrita en el ciclo de activación-inactivación, el PAF no se degrada directamente por ninguna de las rutas catabólicas comunes a los éteres lipídicos. El liso-PAF, sin embargo, es substrato de una monoxigenasa tetrahidropterina alquil-GPC dependiente, responsable de la rotura de las uniones éter de los O-alkil-éteres. El resultado de esta reacción enzimática sería la eliminación del liso-PAF del medio y la obtención de aldehídos grasos de cadena larga y GPC.

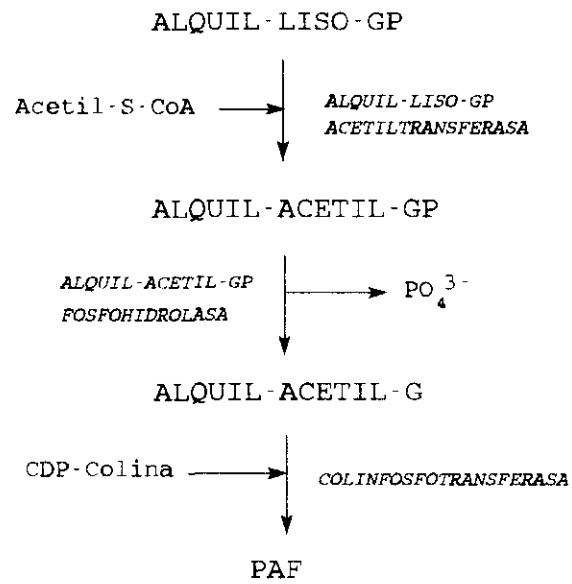


FIGURA 3. Biosíntesis de novo.

2 ACTIVIDADES FISIOLÓGICAS Y FARMACOLÓGICAS DEL PAF.

En la actualidad, se considera a este autacoide como un mediador en la comunicación celular, que exhibe un amplio rango de actividades biológicas en distintos tipos de células y órganos (Fig.4), y parece estar implicado en una serie de situaciones fisiopatológicas.

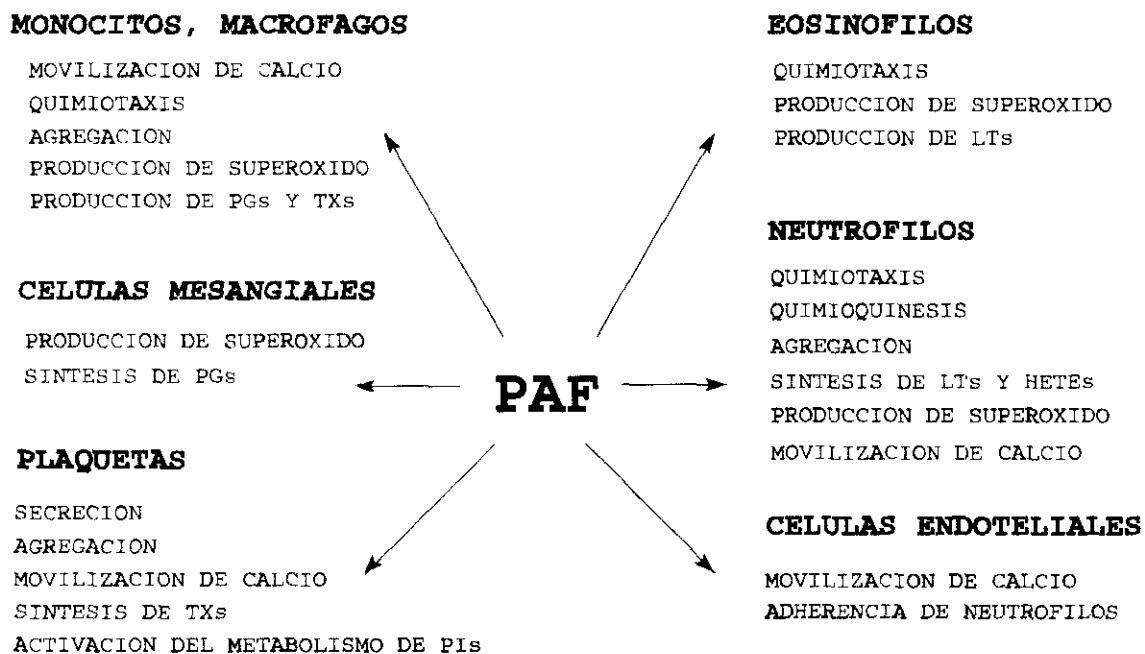


FIGURA 4. Efectos del PAF sobre distintas células diana.

La definición del perfil de acciones biológicas de este mediador ha precisado estudios en distintas preparaciones:

- 1 Células aisladas.
- 2 Organos en perfusión.
- 3 Modelos experimentales de distintas patologías.

2.1 CELULAS DIANA.

Entre las distintas células diana destacan: plaquetas, leucocitos, macrófagos, etc.

2.1.1 PLAQUETAS.

La observación de que el PAF se liberaba de las plaquetas cuando se estimulaban con ionóforo A23187, trombina, colágeno o con el propio PAF, sugirió que éste mediador podía participar en lo que se ha denominado la tercera vía de activación plaquetaria²². Pero en condiciones fisiológicas lo usual es que las plaquetas reaccionen frente al PAF procedente de otras células de su entorno, especialmente leucocitos.

El PAF induce sobre las plaquetas agregación, cambio de forma, degranulación, desensibilización, aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, fosforilación de proteínas, estimulación del metabolismo de PIs y AA, formación de metabolitos de ácido araquidónico y aumento de los niveles de AMPc.

La capacidad de respuesta de las plaquetas frente al PAF varía entre las diferentes especies animales. Induce agregación de plaquetas de humanos, conejos, perros, gatos, caballos y cobayas a unas concentraciones en el rango nanomolar. Sin embargo, las plaquetas de ratón o rata no responden al PAF²³. Esta incapacidad de las plaquetas de rata y ratón para responder a PAF, se debe a la ausencia de receptores de alta afinidad para PAF en estas

especies²⁴.

El grado de estimulación de las plaquetas por PAF es dependiente de la dosis. A bajas concentraciones (0.2-10 nM) provoca una agregación monofásica y reversible de las plaquetas humanas. Mientras que a concentraciones mayores (10-100 nM) induce una primera fase de agregación, que va seguida de una segunda onda que se acompaña de la liberación del contenido de sus gránulos.

El primer fenómeno fisiológico que se puede apreciar en respuesta al PAF es el cambio de forma y éste parece ser independiente de la presencia de cationes divalentes y del metabolismo de AA²⁵. En plaquetas de conejo, el PAF aumenta la entrada de Ca²⁺ extracelular en forma dependiente del tiempo, la temperatura y la concentración. Esta actividad es independiente de ADP y de la producción de metabolitos de la cicloxigenasa²⁶. Sin embargo, aunque no se conocen bien los mecanismos que regulan la agregación y la secreción, ambos mecanismos son dependientes del flujo de Ca²⁺²⁷.

El papel del Ca²⁺ en la transducción de la señal iniciada por PAF, está íntimamente relacionado con las primeras fases de la activación plaquetaria. El PAF provoca una desaparición rápida de PIs causada por la activación de la PLC en plaquetas humanas, de conejo y de caballo. Ello da lugar a la aparición simultánea de DAG y ácido fosfatídico, que se comporta como un ionóforo del Ca²⁺. El aumento de la concentración de ácido fosfatídico es la causa de la movilización de Ca²⁺ unido a membrana. Por otro lado, el incremento en los niveles de DAG permite la activación de la PKC, que se encarga de la fosforilación de proteínas y especialmente de la cadena ligera de miosina plaquetaria que, como resultado final, causa la liberación de serotonina en las plaquetas activadas²⁸.

Aunque el mecanismo subyacente entre la estimulación inicial y la respuesta final no se conoce bien, se sabe que hay dos vías de activación en plaquetas claramente identificadas:

- Formación de endoperóxidos de PGs y TXA₂, ambos metabolitos de AA por la vía de la cicloxigenasa.

- Secreción de ADP, acumulado en los gránulos densos, que se regula mediante un mecanismo de "feed-back".⁰

Se ha comprobado que el PAF es capaz de activar las plaquetas y en presencia de inhibidores de la ciclooxigenasa (aspirina o indometacina) y también de enzimas que secuestran el ADP (apirasa). Por esta razón, se ha propuesto que el PAF puede ser el mediador de la llamada tercera vía de activación²⁹. Esta teoría ha sido ampliamente discutida por la existencia de resultados contradictorios, que indicaban que la activación por PAF parecía estar mediada por la ciclooxigenasa y ADP. Sin embargo, se comprobó que sólo a concentraciones bajas de PAF existe un sinergismo positivo con otros agonistas.

La interacción de PAF con su receptor plaquetario lleva a la activación de distintas rutas metabólicas. Estas rutas incluyen la activación de una GTPasa que inhibe la adenilato ciclasa produciendo una disminución de AMPc y por tanto un aumento del Ca^{2+} intracelular. En segundo lugar, activa las fosfolipasas de membrana, dando como resultados la formación de metabolitos de ácido araquidónico y un aumento de DAG e IP_3 . El aumento de IP_3 dará lugar al aumento de Ca^{2+} intracelular y el DAG activará la PKC. En último caso, la PKC a través de la fosforilación de distintas proteínas, será la causante de la activación plaquetaria. El PAF induce, además, la apertura de un canal de Ca^{2+} no dependiente de voltaje. Es importante destacar, que al parecer, la respuesta del PAF requiere la activación de las diversas rutas mencionadas y que una sola de ellas no llevaría a la activación de las plaquetas³⁰.

2.1.2 LEUCOCITOS.

Se sabe que los PMNs humanos y de diversas especies animales pueden liberar PAF o liso-PAF cuando se estimulan adecuadamente^{31,32}. Monocitos³³, macrófagos¹⁰ y eosinófilos³⁴ también lo liberan cuando se activan con ionóforo de Ca^{2+} (A 23187), partículas de zimosan o IgE.

Polimorfonucleares.

El PAF produce en los polimorfonucleares varias respuestas como degranulación, agregación, quimiotaxis, quimioquinesis, aumento de la explosión oxidativa, aumento de la adherencia celular y estimulación del metabolismo de AA³⁵.

El proceso de degranulación de los **neutrófilos** por PAF depende de la temperatura, de la generación de energía por glicolisis y de la disponibilidad de grupos sulfhidrilo. La presencia de Ca²⁺ extracelular y citocalasina B aumenta el proceso de degranulación, mientras que antagonistas de calmodulina inhiben el proceso de forma dosis dependiente³⁶. Esta agregación requiere la presencia de Ca²⁺ y Mg²⁺ extracelular, y es independiente de los metabolitos de la cicloxigenas; sin embargo, metabolitos de la lipoxigenasa como LTB₄ podrían aumentar la respuesta³⁷.

La quimioquinesis inducida por PAF se produce con bajas concentraciones, mientras la quimiotaxis requiere concentraciones más altas, los metabolitos de cicloxigenasa no influyen en el proceso, mientras que los productos de la lipoxigenasa son inhibidores³⁸.

Por último, el PAF provoca la producción de anión superóxido en neutrófilos pretratados con citocalasina B. La respuesta no depende de la concentración³⁶. No se ha observado que exista sinergismo con el LTB₄, ni desensibilización de las células para responder a LTB₄ o fMLP, después de una primera exposición a PAF. Por tanto, este mediador parece ser un estímulo específico para la producción de anión superóxido³⁹.

Los **eosinófilos** son células sensibles a la estimulación por PAF. El PAF produce el movimiento al azar y dirigido, y la respuesta es dependiente de la dosis y de mayor intensidad que la observada con otros factores, como LTB₄, fMLP, histamina o factores quimiotácticos de eosinófilos⁴⁰. Se ha demostrado que el PAF está relacionado con la acumulación de eosinófilos en los lugares de inflamación. Así, inyecciones peritoneales de PAF al cobaya

producen la acumulación de eosinófilos en las vías respiratorias⁴¹.

Los eosinófilos pulmonares de los casos de neumonía eosinofílica poseen núcleos hipersegmentados y son de baja densidad. Tradicionalmente, se había aceptado que el factor quimiotáctico de eosinófilos y ciertas linfoquinas, eran las que daban lugar a características de este tipo, pero recientemente se ha comprobado que los quimioatrayentes, histamina y PAF inducen también hipersegmentación y baja densidad nuclear⁴².

Macrófagos y monocitos.

El PAF desencadena la combustión oxidativa en macrófagos, con la consiguiente síntesis de prostanoïdes (PGE y TXB₂), aumento de consumo de glucosa y agregación en monocitos.

El PAF desencadena la agregación de monocitos circulantes en forma dosis-dependiente. En humanos, este proceso requiere cationes divalentes y glicolisis⁴³. A pesar de que la explosión oxidativa se inicia directamente por el PAF, la respuesta está modulada por los metabolitos del AA, siendo los metabolitos de la lipoxigenasa activadores y los de la cicloxigenasa inhibidores⁴⁴. Al igual que en las plaquetas, el PAF induce la entrada de Ca²⁺ extracelular y la movilización del intracelular⁴⁵.

Linfocitos

Hasta hace poco tiempo, se pensaba que los linfocitos no eran capaces de sintetizar PAF, pero hallazgos recientes indican que esto podría no ser cierto. En primer lugar, los linfocitos son capaces de producir liso-PAF cuando se estimulan con ionóforo de calcio A23187⁴⁶. En segundo lugar, secretan grandes cantidades de PAF cuando se estimula el receptor Fc⁴⁷, y por último, células leucémicas de tipo T y B liberan PAF cuando se estimulan

con PHA, A23187 y acetil CoA⁴⁸.

Sobre el papel funcional del PAF en los linfocitos, se supone que controla la proliferación de las células T, ya que en células estimuladas inicialmente con LPS y, posteriormente con una concentración baja de PAF se induce un aumento en la síntesis de IL-1⁴⁹. Además, se ha observado que el PAF causa un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, que podría influir en la proliferación dependiente de calcio.

2.1.3 EFECTO SOBRE OTROS TIPOS CELULARES.

Las **células endoteliales** son también capaces de sintetizar PAF, pero en este caso no se libera, sino que permanece asociado a las células y sólo una pequeña parte sale al exterior. El PAF asociado a las células sirve como señal para que otras células, sobre todo PMNs, se unan al endotelio. Por otro lado, el PAF es capaz de producir en células endoteliales un aumento transitorio de la concentración del calcio citosólico⁵⁰. El PAF sirve también como señal celular en la comunicación entre **células hepáticas** sinusoidales y del parénquima. En cultivos primarios de **células mesangiales**, el PAF induce la liberación de tromboxanos y prostaglandinas. Este efecto está asociado con el cambio de forma y la producción de especies reactivas de oxígeno.

2.2 EFECTOS SOBRE ORGANOS AISLADOS.

2.2.1 APARATO RESPIRATORIO

Se ha observado que inyecciones de PAF a conejos a la dosis de $\mu\text{g}/\text{kg}$ causan una alteración aguda de los sistemas cardiovascular y pulmonar. Así, se desarrolla hipertensión pulmonar, aumento de la resistencia y disminución de la complianza⁵¹. Además estas

alteraciones ocurren con aparición de broncoconstricción, que se desarrolla asociada a la liberación de histamina, TXA₂ y prostaglandinas. Otra característica común en todos estos procesos es la acumulación de macrófagos en los espacios alveolares, cambios degenerativos en el epitelio alveolar y en las células endoteliales, y acumulación de plaquetas y PMNs en la luz de los capilares alveolares⁵².

Por otro lado, los pulmones aislados de cobayas sensibilizadas liberan PAF cuando se perfunden con antígeno por las vías respiratorias⁵³. De los hechos descritos se deduce que el pulmón es un órgano diana del PAF. Puesto que este mediador se libera también por las células que infiltran el pulmón, se puede inferir que juega un papel importante en los procesos inflamatorios pulmonares.

2.2.2 SISTEMA CARDIOVASCULAR.

El PAF induce alteraciones cardíacas similares a las observadas en la anafilaxia cardíaca. Los efectos sobre el corazón aislado son depresivos y dependientes de la dosis, pero con características bifásicas. En algún caso los metabolitos de la cicloxigenasa juegan un papel en la mediación de estas respuestas⁵⁴.

Por otro lado, el PAF induce vasodilatación arterial en el sistema circulatorio periférico, que es la responsable del efecto hipotensor observado "in vivo"⁵⁵.

2.2.3 APARATO DIGESTIVO.

El PAF es uno de los agentes ulcerogénicos más potentes en la rata. Este efecto no está mediado por plaquetas o productos de la vía de la cicloxigenasa, ni tampoco por los receptores de histamina o adrenérgicos⁵⁶. Sin embargo, va acompañado de una reducción del número de PMNs circulantes y un aumento de la adherencia de éstos al endotelio⁵⁷.

Por otra parte, el PAF a concentraciones nanomolares, induce una contracción lenta y persistente del íleo de cobaya, mientras que a concentraciones mayores provoca una contracción rápida que va seguida de una relajación. También en otras regiones del intestino, como duodeno, yeyuno y colon produce contracciones en forma dosis-dependiente. El hecho de que exista una desensibilización en todas las regiones del intestino para una segunda estimulación por PAF, pero no por otros agentes, parece indicar que la contracción muscular inducida por el PAF es a través de un receptor propio⁵⁸.

Resultados similares se han obtenido utilizando el PAF para reproducir los procesos de enterocolitis necrosante causados por la administración de LPS o TNF⁵⁹. Esta respuesta parece estar mediada por metabolitos de la lipoxigenasa, puesto que inhibidores de esta actividad enzimática, alivian la situación, mientras que inhibidores de la ciclooxigenasa la agravan. En este modelo, el PAF también podría contribuir al desarrollo de las lesiones por sus acciones sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

2.2.4 OTROS TEJIDOS.

El PAF estimula el metabolismo de fosfoinosítidos y la disminución de los niveles de AMPc en el hígado. También altera la glicogenolisis hepática⁶⁰, puesto que estos efectos no se inhiben por la acción de antagonistas α o β adrenérgicos. La acción del PAF sobre estos procesos parece ser distinta a la de agentes como la angiotensina o vasopresina⁶¹. Sin embargo, podría estar relacionada con productos de la ciclooxigenasa, ya que los inhibidores son capaces de suprimir los efectos inducidos por este mediador⁶².

La estimulación de tejido renal con ionóforo de calcio produce la liberación de PAF, el cual ejerce acciones directas sobre las funciones renales, como son la reducción del flujo sanguíneo renal, de la filtración glomerular y de la excreción urinaria de sodio⁶³. También se ha podido determinar en este tejido que la administración de PAF da lugar a la producción

de prostaglandinas.

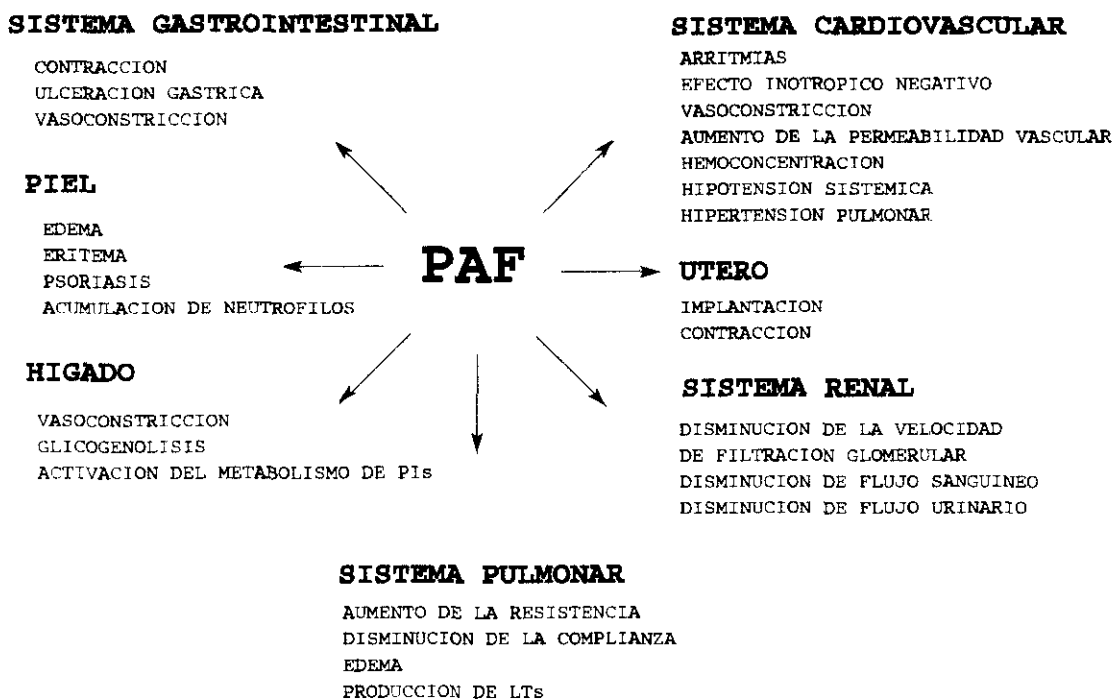


FIGURA 5. Efectos del PAF "in vivo".

2.3 EFECTOS FARMACOLOGICOS DEL PAF SOBRE EL ANIMAL DE EXPERIMENTACION: ANALOGIAS CON MODELOS PATOLOGICOS EXPERIMENTALES.

2.3.1 PAPEL DEL PAF EN REACCIONES INFLAMATORIAS.

Son numerosas las razones que inducen a considerar al PAF como un importante mediador de las reacciones inflamatorias:

-
- En primer lugar, distintos tipos de células inflamatorias producen PAF.
 - En segundo lugar, la administración de este mediador reproduce muchos de los efectos observados en las reacciones inflamatorias, especialmente, de las reacciones inflamatorias agudas, porque induce la agregación de plaquetas, aumenta la permeabilidad vascular²⁴, induce la formación de edema y juega un papel importante en la acumulación de células inflamatorias en el sitio de la inflamación⁶⁴.

Por el contrario, existen pocas evidencias que lo impliquen en las reacciones inflamatorias crónicas, puesto que éstas se caracterizan por la infiltración de células mononucleares y por la proliferación de fibroblastos, células del músculo liso y células de la pared vascular.

2.3.2 ASMA Y ANAFILAXIA SISTEMICA.

La implicación del PAF en el asma se basa en su capacidad para inducir: broncoconstricción, inflamación pulmonar e hipersensibilidad y en las analogías existentes entre sus efectos y los inducidos por el antígeno. Otros posibles mediadores de la inflamación como son la histamina o los metabolitos del ácido araquidónico, son capaces de inducir broncoconstricción e inflamación pulmonar, pero no hiperreactividad bronquial⁶⁵.

No existe un modelo perfecto para estudiar el asma; sin embargo, el modelo de shock anafiláctico en cobayas ha sido usado ampliamente. La inyección del antígeno a cobayas activamente sensibilizados, reproduce algunas de las características clínicas del asma. En estos modelos, tiene lugar un aumento de la resistencia pulmonar y un descenso del umbral para la respuesta, que van acompañadas por alteraciones hematológicas, como descenso del recuento de plaquetas y leucocitos circulantes. Las semejanzas que existen entre estas alteraciones inducidas por PAF y las que ocurren durante el shock anafiláctico sistémico,

sugieren que este mediador puede participar en la patogenia del asma.

La inyección intravenosa de ng de PAF desencadena una marcada broncoconstricción asociada a hipotensión sistémica. A pesar de que esta broncoconstricción depende de la presencia de plaquetas circulantes, no parece que en ella estén implicados los productos de la ciclooxigenasa ya que ni la aspirina, ni la indometacina, modifican el proceso⁶⁶. Por el contrario, la administración de PAF en aerosol provoca una broncoconstricción independiente de plaquetas y de la liberación de histamina que requiere la producción de derivados de la ciclooxigenasa, ya que es inhibida por aspirina⁶⁷. Esto indica que dependiendo de la ruta de administración utilizada, el fosfolípido estimula diferentes tipos celulares y la producción de segundos mensajeros para dar lugar a los efectos broncopulmonares ya mencionados.

Otra posible implicación del PAF en el asma, se relaciona con su capacidad de potenciar la broncoconstricción inducida por otros agentes. En el asma se produce hiperreactividad bronquial no específica relacionada con la inflamación del pulmón. Cuando el PAF se administra bien por vía sistémica o por inhalación, se produce un aumento de la reactividad respiratoria que suele durar hasta siete días⁶⁸. La magnitud y la duración del fenómeno son muy parecidas a los que presentan los pacientes asmáticos frente al antígeno⁶⁹. El mecanismo de acción no está muy claro, pues compuestos de muy diferentes características como ketotifén, hidrocortisona o teofilina son capaces de anular los efectos. Se ha postulado que el mecanismo podría ser el resultado de un efecto no espasmogénico del PAF que implique la formación de edema, la infiltración de plaquetas, eosinófilos y el daño del epitelio.

2.3.3 EL PAF EN LAS ALTERACIONES CARDIOVASCULARES.

El PAF produce diversos efectos farmacológicos sobre distintos componentes de sistema cardiovascular, lo que exige hacer una descripción diferenciada sobre corazón, circulación sistémica, circulación pulmonar y microcirculación.

En corazón es destacable la vasoconstricción coronaria y el efecto inotrópico negativo producido por PAF. Además, a concentraciones mayores de 1pM, produce una disminución del flujo coronario, arritmias ventriculares y un bloqueo aurículo-ventricular. En experimentos llevados a cabo en corazón aislado, se analizó el líquido de perfusión y se midieron en él cantidades significativas de LTC₄, LTD₄ y LTE₄. Estos hechos sugieren que al menos parte de los efectos observados son consecuencia de la capacidad del PAF para dar lugar a la formación de peptidoleucotrienos. Por otro lado, el PAF que se sintetiza rápidamente por los granulocitos frente a un estímulo hipóxico, parece ser también un importante mediador de algunos fenómenos que se producen en la isquemia miocárdica⁷⁰.

Sobre la circulación sistémica, el PAF es el causante de la hipotensión arterial y de una disminución de las resistencias periféricas. Este efecto es dependiente de la dosis y es irreversible con dosis altas. Estos hechos han sido observados en ratas, conejos y cerdos, pero existen discrepancias para explicar su mecanismo. El PAF no es capaz de producir la relajación de arterias aisladas, por esto se piensa que en este fenómeno, están implicados factores de relajación del endotelio. Algunos estudios han explicado el estado de shock como una consecuencia de la hipertensión pulmonar y de un fallo en el ventrículo derecho del corazón, lo que provoca que el ventrículo izquierdo no pueda llenarse bien y, en consecuencia, la aparición de una disminución del rendimiento cardíaco y el colapso circulatorio⁷¹.

Los efectos más importantes a nivel de la circulación pulmonar son: el aumento de la presión pulmonar, la acumulación de proteínas plasmáticas y la hemoconcentración. Estos efectos no son bloqueados por inhibidores de ciclooxigenasa, por bloqueantes de canales de calcio, ni por antihistamínicos, lo que hace pensar que son efectos directos del PAF⁷². El efecto del PAF sobre la microcirculación, está íntimamente relacionado con su papel en los procesos de inflamación aguda, a la que anteriormente nos hemos referido.

Recientemente se ha implicado al PAF en la aterogénesis y se ha descrito aumento de la actividad PAF-acetilhidrolasa en el plasma de pacientes con hipertensión⁷³.

2.3.4 EL PAF EN EL SHOCK ENDOTOXICO.

El shock séptico es la respuesta del organismo frente a bacterias Gram-negativas. Se caracteriza por la aparición de: hipotensión sistémica, hipertensión pulmonar, aumento de la permeabilidad vascular, broncoconstricción y ulceración gastrointestinal. Todos estos síntomas se reproducen por la inyección intravenosa de lipopolisacárido bacteriano (LPS). El tiempo de retraso observado entre la administración de LPS y la aparición de los síntomas sugirió la posibilidad de que el LPS produjera la liberación de mediadores endógenos. En un principio se pensó en los metabolitos del ácido araquidónico, pero estudios realizados con inhibidores de 5-lipoxigenasa demostraron que éstos influyen ligeramente en la evolución del proceso⁷⁴, y en consecuencia se pensó en otros mediadores.

En la actualidad, se considera el shock endotóxico como un proceso complejo en el que participan diversos mediadores humorales y celulares con efectos sinérgicos o aditivos entre los que se incluyen: aminas vasoactivas, péptidos generados durante la activación del complemento, eicosanoides, citoquinas como la IL-1 y el TNF, y lípidos bioactivos como el PAF.

La posible participación del PAF en el shock se basa en varios hechos:

- La administración de PAF a los animales de experimentación mimetiza el estado de shock⁶³.
- Se han detectado niveles elevados de PAF en el plasma y en tejidos de animales tratados con LPS⁷⁵.
- La utilización de antagonistas de PAF parece mostrar un efecto protector sobre los animales en estado de shock⁷⁶.

También el TNF mimetiza algunos de los efectos que producen las inyecciones de LPS, y se ha observado aumento de su concentración en plasma⁷⁷ en el shock endotóxico.

Aparentemente, y como hipótesis de trabajo se puede aceptar que los efectos biológicos del LPS dependen de la producción de TNF y de PAF; y además son notables las relaciones entre ambos mediadores. Resultados obtenidos recientemente⁷⁸, indican que la estimulación de diversos tipos celulares bien por PAF o TNF puede inducir la liberación del otro mediador de forma recíproca.

Al igual que el TNF y el PAF, la IL-1 se libera por los macrófagos estimulados por LPS y, a su vez, la producción de eicosanoides también es modulada por IL-1, TNF y PAF.

Esta liberación recíproca de PAF y citoquinas ha llevado a proponer la existencia de ciclos positivos de "feed-back", en los que el PAF y el TNF tendrían un papel esencial en las fases iniciales que van a desencadenar la liberación de otras citoquinas y factores de crecimiento que, a su vez, entrarán a formar parte en otras fases del ciclo⁷⁹. Sobre estas bases, la estrategia de tratamiento del shock séptico debe ser multifactorial e incluir la utilización de anticuerpos monoclonales anti-TNF e IL-1, inhibidores de 5-lipoxigenasa y antagonistas del PAF⁸⁰.

2.3.5 EL PAF EN OTROS ESTADOS PATOLOGICOS.

Otras situaciones patológicas en las que el PAF podría estar implicado son las siguientes:

- Rechazo de órganos transplantados.
- Alteraciones del sistema nervioso central.
- Las primeras etapas del embarazo.

Rechazo de organos transplantados.

La primera indicación de que el PAF podía estar implicado en el rechazo de órganos es su implicación en las reacciones hiperagudas de rechazo. Estas son reacciones causadas por anticuerpos preformados, en las que están implicadas la activación del complemento y la agregación intravascular de plaquetas. Sin embargo, este tipo de reacción no es la que ocurre en los pacientes que presentan rechazo. La mayoría de estos pacientes presentan un proceso que no es de tipo humoral sino mediado por células. En este caso, se observa infiltración de linfocitos y monocitos, siendo poco conocido el papel que juegan las plaquetas, que se acumulan en la zona del trasplante. El rechazo implica acumulación de linfocitos y proliferación de linfocitos. Para que ocurra la proliferación, los linfocitos deben recibir dos señales de los macrófagos: la presentación del antígeno y la producción de IL-1. Por esta razón, se pensó que el PAF podría estar implicado en la proliferación de linfocitos, pues los macrófagos son sensibles al PAF y en su presencia aumenta la producción de IL-1⁵⁰. Por tanto, IL-1 y PAF podrían estar relacionados con la amplificación de la respuesta. Además, se sabe que los macrófagos liberan PAF y éste aumenta la concentración de Ca²⁺ intracelular en distintos tipos de células, por lo tanto podría activar la proliferación de linfocitos por una vía dependiente de los niveles de Ca²⁺. Experimentalmente, se ha observado que la utilización de antagonistas del PAF en combinación con ciclosporina produce un aumento en la supervivencia de los trasplantes.

Alteraciones del sistema nervioso central.

Algunos estudios han demostrado que el PAF induce diferenciación neuronal en líneas celulares como la NG 108-15. Este efecto depende del tiempo de incubación y de la concentración. Cuando la concentración utilizada era menor que la que causaba la diferencia-

ción máxima el autacoide era citotóxico. Este hallazgo hizo pensar que el PAF podría ser uno de los factores que participan en los procesos de degeneración neuronal irreversible asociada con daños de la médula espinal. Los mecanismos bioquímicos responsables de este efecto no se conocen, pero se piensa que quizás estén relacionados con el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular⁸¹, pues se ha demostrado en hipocampo de rata que el PAF es capaz de movilizar el Ca^{2+} intracelular⁸². Estos estudios han alcanzado recientemente un nuevo impulso tras el aislamiento del mRNA del receptor del PAF en el encéfalo, cuya localización preferente incluye hipotálamo, corteza cerebral y bulbo raquídeo⁸³.

El PAF en las etapas tempranas del embarazo.

Se ha visto que el PAF y las enzimas implicadas en su metabolismo⁸⁴ están presentes en el líquido amniótico humano. De hecho, el embrión de mamíferos sintetiza PAF en las seis primeras horas de fertilización, y ello que provoca la activación intravascular de las plaquetas. En ratones, algunos primates y en humanos este hecho da lugar a trombocitopenia⁸⁵. Además, en embriones en cultivo, su capacidad para producir PAF disminuye con el paso del tiempo, y se piensa que este hecho está relacionado con la incapacidad para el desarrollo de los embriones en cultivo. En mamíferos, el éxito de una implantación requiere la activación rápida de blastocitos, y de esta forma es posible que el PAF liberado cause la activación de las plaquetas que a su vez liberan factores capaces de activar de los blastocitos y favorecer la implantación.

Se ha relacionado el PAF con el EPF (factor temprano de embarazo). El PAF sintético es capaz de inducir en una hora, aproximadamente, la expresión del EPF en ratones hembra en cualquier estado de su ciclo del extro, excepto en el metaextro. Se ha identificado el PAF con lo que en un principio se llamó "factor de óvulo", que está considerado como la primera sustancia que se libera por el óvulo fertilizado.

3 RECEPTORES DEL PAF

La existencia de receptores para el PAF ha sido demostrada por varios hechos:

- En primer lugar, sólo el estereoisómero (R) del PAF es activo y estimula la agregación y la degranulación de plaquetas y neutrófilos⁸⁶.
- En segundo lugar, el PAF es capaz de desencadenar sus efectos biológicos a concentraciones muy bajas (del orden de 0.1 nM). Además, se ha observado que ocurre una desensibilización en los tejidos cuando se exponen por segunda vez al PAF.
- Por último, compuestos considerados como antagonistas del PAF son capaces de inhibir sus efectos.

La presencia de receptores para el PAF se mostró por primera vez con experimentos de unión de [³H]PAF⁸⁷. Se encontraron receptores de alta afinidad en plaquetas de conejo, caninas y humanas, en monocitos, en PMNs de humanos y en membranas plasmáticas de células de distintos tejidos. La afinidad y el número de receptores varía con el tejido y es específico para las distintas especies animales. El perfil de receptores se correlaciona bastante bien con los efectos que ejerce el PAF sobre distintos tejidos y distintas especies. Así, se observa que las plaquetas de conejo son mucho más sensibles al PAF que las plaquetas humanas y se ha observado que estas últimas tienen un número menor de sitios de unión por célula. También se ha observado que las plaquetas de rata son totalmente refractarias a la acción del PAF y esto coincide con su ausencia de receptores⁸⁸.

Los primeros intentos de aislar el receptor del PAF en membranas de plaquetas revelaron que era una proteína de aproximadamente 160 KDa y con un punto isoeléctrico de

8.0. Estudios más recientes han permitido la clonación del receptor del PAF y el análisis de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos ha mostrado que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, aunque su estructura tridimensional aún no ha sido determinada⁸⁹. La obtención del cDNA del receptor del PAF de leucocitos humanos ha mostrado un 83% de homología de secuencia con el receptor de pulmón de cobaya⁹⁰. Estos abordajes moleculares han permitido la realización de estudios funcionales en células COS-7 transfectadas que expresan el receptor del PAF, que han mostrado la formación de IP₃ al añadir el ligando y la implicación de una proteína G⁹¹.

La unión de [³H]PAF a membranas de plaquetas de conejo está regulada por cationes monovalentes, divalentes y GTP. La unión [³H]PAF se inhibe de manera específica por la presencia de iones Na⁺ y también en menor extensión por Li⁺, sin embargo, se potencia por la presencia de K⁺, Cs⁺ y Rb⁺ y de cationes divalentes como Mg²⁺, Ca²⁺ y Mn²⁺. Por otro lado, la presencia de GTP causa también inhibición de la unión del PAF a su receptor⁹². Estas observaciones sugieren que el receptor está asociado al sistema de la adenilato ciclasa a través de una proteína inhibitoria que regula los nucleótidos de guanina.

3.1 AGONISTAS DEL PAF-ACETER.

Después de la determinación de la estructura del PAF se empezaron a sintetizar análogos de este fosfolípido con varios objetivos:

- Saber cuáles eran los requerimientos estructurales que daban cuenta de la actividad biológica del PAF.
- Comprobar si se podían obtener agonistas del PAF que mantuvieran los efectos favorables, pero no los potencialmente nocivos.
- Descubrir antagonistas específicos del receptor del PAF para el tratamiento de los procesos patológicos en los que estaba implicado.

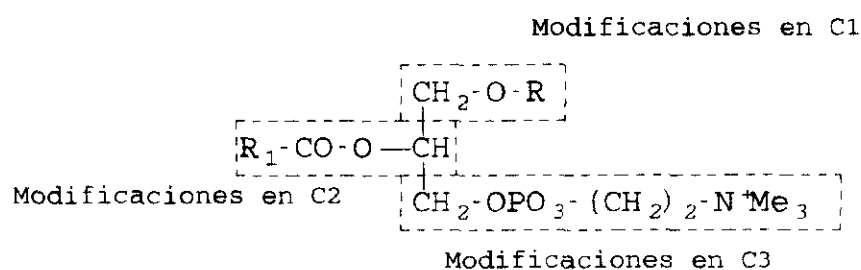


FIGURA 6. Modificaciones en el esqueleto glicérido.

Se llevó a cabo la síntesis de distintos agonistas variando los sustituyentes del esqueleto glicérido (Fig.6).

3.1.1 MODIFICACIONES EN LOS SUSTITUYENTES.

* Modificaciones en el C-1: Se observó que la unión éter que une la cadena alifática a la estructura glicérida del PAF es un requerimiento absoluto, ya que la sustitución de éste por un grupo éster o un átomo de azufre hace desaparecer casi totalmente la actividad. Modificaciones en la longitud de la cadena alifática (y por tanto en la lipofilia), su grado de saturación e inclusión de sustituyentes mostraron los siguientes resultados:

- Sólo las cadenas con 16 y 18 carbonos tienen una actividad parecida a la del PAF⁹³.

- La existencia de uno o dos dobles enlaces refuerza la actividad del agonista⁹⁴.
- La inserción de sustituyentes como grupos fenilos o derivados clorados o fluorados se traduce en una disminución de la actividad del agonista⁹⁵.

Estos resultados sugieren que el papel principal de la cadena en posición sn-1 era aportar la hidrofobicidad necesaria para la actividad de los agonistas.

* Modificaciones en el C2: El interés de realizar cambios en C2 partió del hecho de que la enzima que hidroliza el grupo acetilo transforma el PAF en liso-PAF que es un metabolito inactivo⁹⁶. Por otro lado, es un hecho comprobado que la quiralidad de este carbono es fundamental, pues los isómeros (S) carecen de actividad. Por último, estudios realizados sobre la longitud de la cadena y su volumen demuestran que ambos factores son definitivos y que sólo presentan actividad máxima cuando los sustituyentes poseen un radio de Van der Waals de unos 6-7 Å^{97,98}.

* Modificaciones en C3: Han llevado a la conclusión que es crítica la distancia entre el grupo fosforilo y la cabeza polar positiva, pues al aumentar la distancia entre ambos desaparece la actividad. Además, la presencia del grupo fosfato es fundamental, por su capacidad para soportar una carga negativa⁹⁹.

3.1.2 ISOMEROS DE POSICION.

Se ha investigado la actividad de los distintos isómeros de posición (C1/C2 y C2/C3) y sus enantiómeros. Cabría esperar que la posición o distribución de los tres sustituyentes en el PAF fuera fundamental para su actividad. Sin embargo, existe muy poca diferencia en actividad entre los distintos isómeros de posición, y parece que sólo la quiralidad del carbono dos es fundamental para la actividad del PAF.

3.1.3 CAMBIOS EN EL ESQUELETO DE GLICERINA.

Los cambios realizados sobre el propio esqueleto glicérido demostraron que la longitud del esqueleto era también fundamental para la actividad¹⁰⁰.

3.2 ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL PAF.

Existen muchos compuestos que son antagonistas de alguna de las acciones biológicas del PAF, pero no lo hacen de una manera específica. Entre ellos podríamos citar algunos como: cromoglicato, MK-771, naxolona, ticlopidina o atropina. También muchos inhibidores de la fosfolipasa A₂, de tromboxano y de los leucotrienos. Pero nos vamos a referir sólo a aquellos antagonistas específicos del receptor del PAF. Para hacer un breve resumen de los compuestos existentes en la actualidad, los clasificaremos inicialmente en: naturales y sintéticos.

3.2.1 ANTAGONISTAS DE ORIGEN NATURAL.

Lignanos o terpenos obtenidos de plantas y algunos compuestos procedentes de hongos o bacterias son los que componen este grupo (Fig.7).

Los ginkólidos BN-52020, BN-52021, BN-52023 y BN-52024 son una familia de terpenos hexacíclicos obtenidos del extracto de las hojas del árbol *Ginkgo biloba* que demostraron una actividad significativa como antagonistas de PAF¹⁰¹. Estudios realizados en pacientes (fase III) han demostrado que BN-52021 es efectivo en el tratamiento del shock séptico¹⁰².

La kadsurenona, un neolignano aislado de la planta *Piper futokasura* parece ser un inhibidor específico del PAF¹⁰³. Estructuras derivadas de éste como las kadsurinas han

demostrado tener una actividad menor.

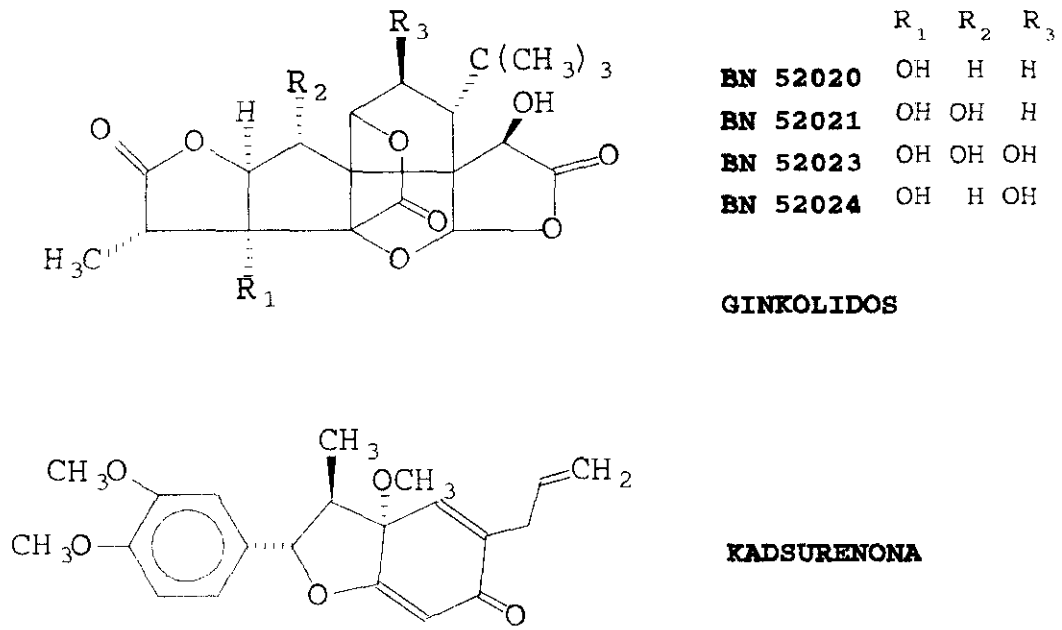


FIGURA 7. Antagonistas de origen natural.

El último grupo de derivados naturales lo constituyen el FR-49175, aislado del *Penicillium terlikowskii*, y FR-900452 aislado del *Streptomyces phaeofaciens*¹⁰⁴.

3.2.2 ANTAGONISTAS SINTETICOS.

Inicialmente, la mayoría de estos compuestos eran de estructura semejante a la del PAF pero existen en la actualidad muchos antagonistas sintéticos cuya estructura no está relacionada con la del autacoide.

Análogos de PAF.

El primero que se describió fue el compuesto CV-3988 de Takeda¹⁰⁵. Es un producto capaz de inhibir la agregación plaquetaria inducida por PAF a concentraciones micromolares,

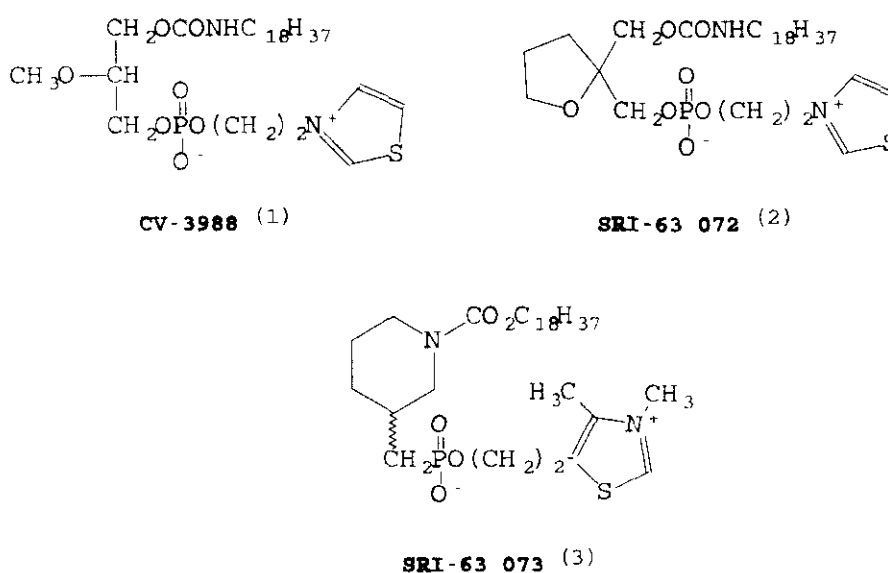


FIGURA 8. Antagonistas relacionados estructuralmente con el PAF.

mientras que no presenta efecto alguno sobre la agrogación inducida por AA y ADP. También se ha mostrado su actividad "in vivo" en la hipotensión inducida por PAF. Por lo general, estos compuestos son activos "in vitro" e "in vivo" cuando se administran por vía intravenosa, pero no por vía oral. El CV-3988 sirvió de base para la síntesis de análogos del PAF, como la serie de Sandoz que incluye al SRI 63-119 y al SRI 63-072¹⁰⁶ (Fig.8).

La ciclación de partes de la estructura del PAF condujo a la segunda familia de compuestos. Entre ellos se pueden citar SRI 63-073 (Sandoz) o algunos de los compuestos de Hoffmann-La Roche. Estos compuestos presentan menor actividad que los lineales¹⁰⁷ (Fig.8).

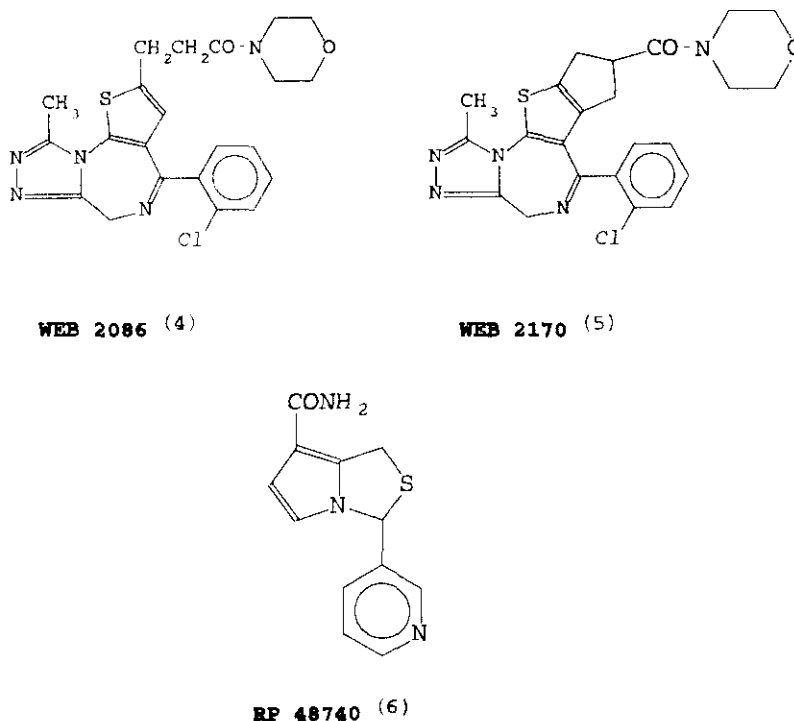


FIGURA 9. Antagonistas no relacionados estructuralmente con el PAF.

Antagonistas no relacionados estructuralmente.

El primero de los desarrollados por Rhone-Poulenc Santé fue el RP-48740 (Fig.9). Pertenece a una serie de pirrolo[1,2-c]tiazol-7-carboxamidas entre las que cabría destacar

también al RP-59227 y al RP-66681¹⁰⁸.

Otro grupo de antagonistas lo constituyen los derivados de benzodiazepina desarrollados después de observarse que algunas triazolobenzodiazepinas psicotrópicas eran ligeramente inhibitoras del PAF. La posibilidad de separar la actividad sobre el sistema nervioso central de su capacidad antagonista frente a PAF dio lugar a un importante grupo de antagonistas del PAF. Los compuestos más importantes de esta clase son: WEB-2086 Y WEB-2170¹⁰⁹ (Fig.9). Ambos han demostrado una potente actividad antagonista "in vitro" e "in vivo".

3.3 MODELO DEL RECEPTOR DEL PAF.

De los datos obtenidos de los experimentos realizados con agonistas y antagonistas se han propuestos diversos modelos de la posible conformación de los sitios de unión para el PAF en membranas¹⁰⁹.

Se ha comprobado que la actividad disminuye cuando disminuye la longitud de la cadena de ácido graso, mientras que la introducción de un grupo polar en la estructura de los antagonistas disminuye su actividad. Por tanto, la existencia de un grupo apolar lipofílico parece esencial para la actividad agonista y antagonista. Esto significa que la cadena de ácido graso del PAF entra en la membrana en una zona hidrofóbica. La entrada de la cadena y la posición relativa que pasa a ocupar la función etóxido en comparación con el entorno hidrofóbico donde se encuentra va a suponer un cambio de fluidez en la membrana y en su metabolismo. Por tanto, la activación de la membrana puede ocurrir a raíz de una transferencia electrónica entre los dobletes del oxígeno de la función éter y un lugar desconocido en la membrana que llamaremos "diana" y que será una región deficiente en electrones. Por esta razón, la sustitución de la función éter por un tioéter u otras, aunque mantengan la longitud de la cadena, impiden la transferencia electrónica e imposibilita la activación de la membrana.

La longitud y el volumen del sustituyente en posición sn-2 son los factores más

importantes. La eficacia obtenida para agonistas con cadenas cortas podría deberse a que esta cadena participa en el anclaje del PAF a la membrana. La disposición de la cadena polar con respecto a los fosfolípidos de la membrana mejoraría. Esta interpretación se confirmaría porque sólo el isómero (R) del PAF posee actividad.

La influencia de la presencia de grupos cuaternarios y la longitud de la cadena del C3 demuestran la importancia de la cabeza polar en la unión del PAF.

A partir de estas informaciones se ha propuesto el siguiente modelo de interacción en el receptor del PAF (Fig. 10). La unión del PAF influiría sobre la conformación del lugar "diana" de la membrana bien por una transferencia de carga, bien por una modificación de la fluidez en la vecindad o destruyendo las interacciones externas entre proteínas y la cabeza polar de los fosfolípidos¹¹⁰.

La activación del lugar "diana" desencadenaría dos sucesos:

- Hidrólisis de GTP y activación de la PLC, activando por tanto el metabolismo de fosfoinosítidos. El IP3 y DAG actuarían como segundos mensajeros: IP3 provocaría la movilización de calcio y el DAG la activación de la PKC.
- La internalización del complejo PAF-receptor por un mecanismo desconocido que podría ser activo o pasivo. El PAF entonces sería desactivado por la acetilhidrolasa citosólica, transformándose en liso-PAF. La eliminación del liso-PAF de la célula se realizaría a través de la aciltransferasa que llevara a cabo la acilación del grupo hidroxilo de la posición 2-R para dar lugar a alquil-acil-gliceril-fosfocolina que entraría de nuevo a formar parte de la membrana como un fosfolípido estructural.

Estudios posteriores realizados en función de los mapas electrostáticos tridimensionales de varios potentes antagonistas de PAF demostraron en todos ellos la existencia de dos nubes electrostáticas de potencial negativo llamadas por los autores "cache-oreilles"¹¹¹. Estas dos paredes de potencial negativo están situadas a 180° una de otra y localizadas a una distancia

máxima entre 10-12 Å. Las moléculas presentan también un fragmento hidrofóbico. El modelo propone que estas nubes electrónicas podrían ser el factor mas importante en la interacción de estas moléculas con el receptor del PAF y que el fragmento hidrofóbico sería el tercer punto

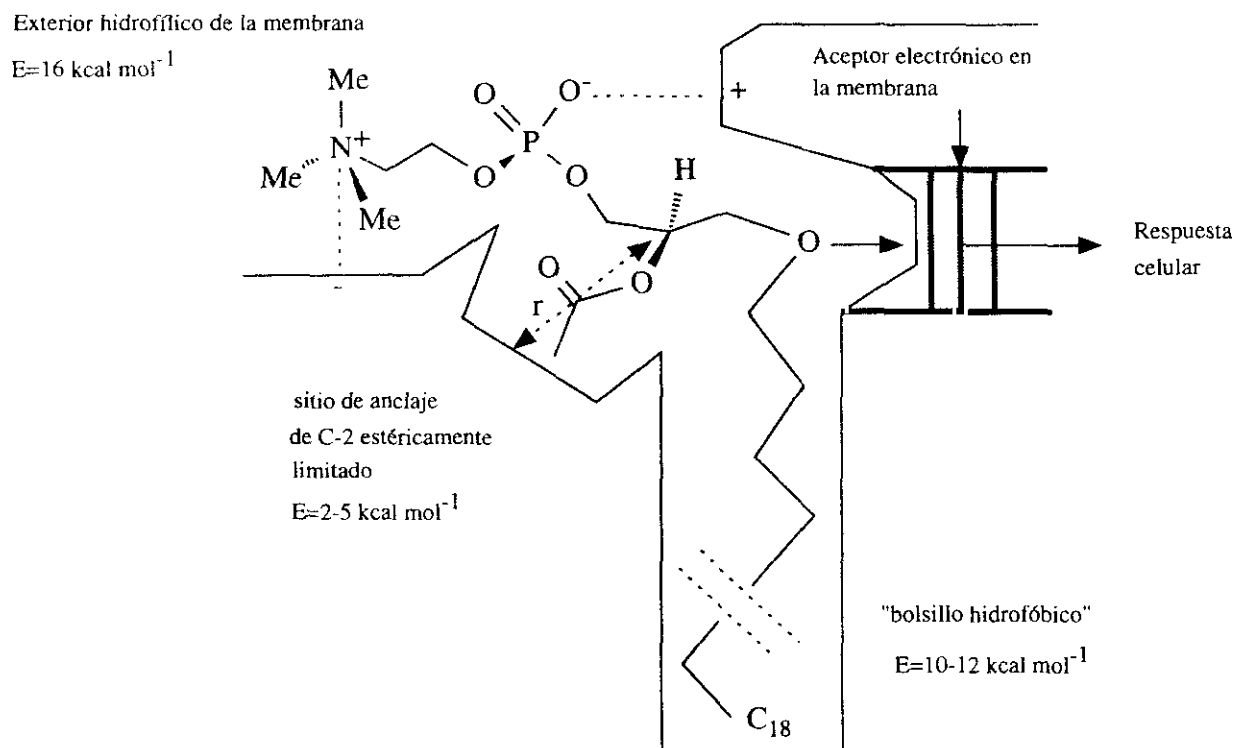


FIGURA 10. Modelo del receptor del PAF.

de anclaje de las moléculas a la membrana. En contra de lo postulado anteriormente, el par de electrones del oxígeno no parecían tener un efecto significativo en el sitio de unión. El receptor sería, por tanto, un cilindro polarizado con un diámetro de 10-12 Å. Pero este modelo

choca con la estructura del propio PAF y con la característica heterogeneidad mostrada por el receptor en distintos tipos de células.

Investigaciones recientes de relación estructura-actividad han modificado algo el modelo anterior. Las modificaciones consisten en la existencia de dos bolsillos hidrofóbicos situados en lugares opuestos. Sólo una de estas regiones es la responsable del efecto agonista. Por otro lado, las zonas de potencial negativo constituirían una región única flexible a lo largo de todo el cilindro. Este modelo no estaría en conflicto con la idea de heterogeneidad del receptor ni con el concepto de flexibilidad de un receptor de membrana¹¹².

4 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El grupo de investigación de laboratorios ALTER S.A. ha estado interesado en la modulación del anillo de las dihidropiridinas y en el estudio de la actividad asociada a este núcleo a lo largo de los últimos años. Las 1,4 dihidropiridinas han sido consideradas tradicionalmente como drogas activas en el sistema cardiovascular. Sin embargo, a partir de la síntesis de diversos derivados de esta estructura, se ha observado que algunos poseen actividad como antitrombóticos y que carecen de efecto cardiovascular¹¹³. Estos compuestos no presentan ninguna de las propiedades farmacológicas tradicionalmente asociadas a su estructura como son:

- Propiedades antagonistas frente a canales de calcio operados por voltaje.
- Inhibición no selectiva de la activación plaquetaria.
- Efectos vasodilatadores.
- Actividad cardiaca.

Sin embargo, inhibían la activación plaquetaria inducida por PAF y otros agonistas "in vitro", bloqueaban la unión del PAF a su receptor en plaquetas y eran activas frente a algunas de las acciones del PAF "in vivo", aunque a dosis relativamente altas.

Durante el "screening" de una nueva serie de moléculas se observó que las 4-alkil-1,4-dihidropiridinas con una función tioéter unida a través de un puente alquilénico al grupo carboxilato de la posición C3 del anillo, presentaban actividad como antagonistas específicos del PAF. Entre ellas las más activas parecían ser las que tenían un resto alquílico pequeño (cadena con uno o dos carbonos) unido al carboxilato de la posición C5 y un sustituyente aromático unido al átomo de S del tioéter.

El objetivo de este trabajo es el estudio de una nueva estructura de 1,4 dihidropiridina, seleccionada entre las anteriores, que muestra una actividad antagonista selectiva frente a PAF, carece de actividad sobre canales de calcio, y de los efectos cardiovasculares característicos de los antagonistas de calcio.

Aunque existen otras moléculas activas, el estudio se centrará en la molécula de clave PCA-4248, que es uno de los compuestos de la serie que muestra con actividad potencialmente más favorable para su desarrollo farmacológico. Se estudiará la capacidad del PCA-4248 [5-metoxicarbonil-2,4,6-trimetil-1,4-dihidropiridina-3-carboxilato de 2-(feniltio)etilo] para bloquear las acciones tanto de PAF exógeno como de PAF endógeno en modelos "in vitro" e "in vivo".

1. En los experimentos "in vitro", estudiaremos la capacidad del PCA-4248 para inhibir:
 - La respuesta de diversas células estimuladas por PAF.
 - La unión del PAF a su receptor en los mismos tipos celulares mencionados anteriormente.
2. En modelos "in vivo" comprobaremos:
 - El efecto del antagonista para suprimir o aliviar ciertos efectos producidos por PAF en diversos modelos animales.
3. Se centrará también el estudio en la efectividad de este antagonista en modelos dependientes de la generación de PAF endógeno por LPS y TNF.
4. Por último, se intentará definir el mecanismo de acción del PCA-4248 como antagonista del PAF.

Tal vez sea aún temprano para predecir con seguridad el futuro impacto de los antagonistas de PAF en medicina, ya que su utilidad terapéutica deberá ser evaluada en numerosas situaciones clínicas. Sin embargo, la evidencia obtenida de estudios en animales

de experimentación y de un limitado número de ensayos clínicos, apoya la hipótesis de que el PAF desempeña un papel importante en la mediación de algunas reacciones inflamatorias agudas, en el asma, en el shock séptico y en reacciones anafilácticas.

Por tanto, el desarrollo de antagonistas cada vez más específicos, potentes y con mayor duración de acción representan un atractivo e interesante tema de investigación de la farmacología y la biología celular para la industria farmacéutica.

II MATERIALES Y METODOS

1 TAMPONES Y SOLUCIONES

SOLUCION ANTICOAGULANTE (ACD)

Citrato trisódico	80mM
Acido cítrico	65mM
Glucosa	111 mM

SOLUCION SALINA TAMPONADA CON FOSFATO (PBS)

ClNa	121 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM
ClK	2.7 mM

pH = 7.4, ajustada con Na₂HPO₄ ó KH₂PO₄

TAMPON FOSFATO SALINO / LIDOCAINA

ClNa	113 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM
ClK	2.7 mM
Lidocaína clorhidrato	10 mM

pH = 7.4, ajustado con NaOH.

TAMPON HEPES / BICARBONATO

HEPES 5 mM

pH = 7.4, ajustado con NaHCO_3 al 7.5%

TAMPON HEPES/ CINH_4

HEPES 10mM

CINH_4 150mM

pH = 7.4

MEDIO TAMPONADO CON HEPES PARA PMNs

ClNa 150 mM

ClK 2.7 mM

HEPES 2 mM

Glucosa 0.1%

BSA 0.25%

pH = 7.4, ajustado con NaOH.

MEDIO PARA EL LAVADO DE PLAQUETAS

Acido cítrico 18 mM

ClK 5 mM

ClNa 103 mM

Cl_2Mg 1 mM

Cl_2Ca 2 mM

pH = 6.5, ajustado con NaOH.

TAMPON NOMINAL LIBRE DE Ca²⁺

HEPES	10 mM
ClNa	145 mM
ClK	5 mM
Cl ₂ Mg	1 mM
Glucosa	10 mM

pH = 7.4, ajustado con KOH.

SOLUCION DE TYRODE SIN Ca²⁺

ClNa	139.7 mM
ClK	2.7 mM
NaHCO ₃	12 mM
Cl ₂ Mg	0.5 mM
NaH ₂ PO ₄	1.8 mM

pH = 7.25, ajustada con NaHCO₃.

SOLUCION DE TYRODE CON Ca²⁺

ClNa	137 mM
ClK	2.7 mM
NaHCO ₃	12 mM
Cl ₂ Mg	0.5 mM
Cl ₂ Ca	2.7 mM
NaH ₂ PO ₄	1.8 mM

pH = 6.8.

SOLUCION DE TYRODE TAMPONADA CON HEPES (con Ca²⁺)

ClNa	137 mM
ClK	2.7 mM
NaHCO ₃	12 mM
Cl ₂ Mg	1 mM
Cl ₂ Ca	2 mM
NaH ₂ PO ₄	0.4 mM
HEPES	0.5 mM

pH = 7.4, ajustada con NaOH.

2 REACTIVOS

SIGMA CHEMICAL CORPORATION, St. Louis, U.S.A.

- Albúmina de suero bovino, fracción V (BSA).
- Acido araquidónico.
- Apirasa.
- ATP.
- Azida sódica.
- Azul de Trypan.
- Colorante de Wright.
- N - formil - MET - LEU - PHE (fMLP).
- HEPES.
- Indo-1-AM
- Lipopolisacárido de E. coli 0111B4 (LPS).
- Sistema Luciferasa-luciferina.
- Luminol.
- L - α - O - Hexadecil - β - acetil - γ - fosfatidilcolina (L-PAF).
- Peroxidasa (de rábano picante, tipo VI).
- PGE₁.
- Triton X-100.

CALBIOCHEM CORPORATION, La Jolla, U.S.A.

- Factor de necrosis tumoral α (TNF $_{\alpha}$).
- Isonomicina de *Streptomyces conglobatus*.

PHARMACIA-LKB BIOTECHNOLOGY AB, Uppsala, Sweden.

- Dextrano T-500.
- Ficoll - Paque.
- Sepharosa 2B

DUPONT, N.E.N., Boston, U.S.A.

- Hexadecil-2-acetil-sn-gliceril-3-fosforilcolina, 1-O-[Hexadecil-1',2'-3H(N)] ([³H] PAF).

KYOTO DAIICHI KAGAKU CO. LTD., Kyoto, Japan.

- ADP.
- Colágeno (de tendón bovino).
- Epinefrina.

CULTEK S.L., Madrid, Spain.

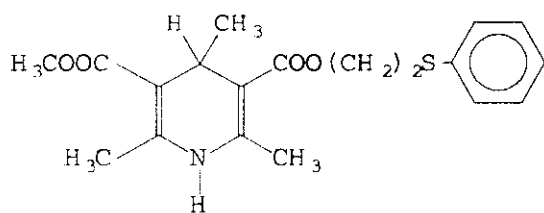
- Medio de cultivo RPMI 1640, con 2g/l de NaHCO_3 y sin glutamina.

E. MERCK, Darmstadt, Germany.

- Todos los reactivos utilizados para los tampones y soluciones descritas en el apartado anterior.

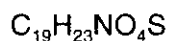
3 DESCRIPCION QUIMICA DEL PCA-4248.

3.1 ESTRUCTURA QUIMICA.



PCA - 4248

3.2 FORMULA ESTRUCTURAL.



3.3 PESO MOLECULAR.

361.46

3.4 NOMBRE QUIMICO.

5-metoxicarbonil-2,4,6-Trimetil-1,4-dihidropiridina-3-carboxilato de 2-(feniltio)etilo.

3.5 CLAVE DE LABORATORIO.

PCA-4248

3.6 ASPECTO.

Polvo amarillo claro.

3.7 PUNTO DE FUSION.

72 - 74 °C (medido en un aparato Büchi 510, con un incremento de temperatura de 1°C/minuto).

3.8 SOLUBILIDAD A TEMPERATURA AMBIENTE.

En etanol >	0.5%
En CHCl ₃ >	5%
En DMSO >	5%
En H ₂ O <	0.05%

3.9 ESTABILIDAD.

El PCA-4248 ha demostrado ser estable sin sufrir ningún cambio en estado sólido durante tres meses a una temperatura ambiente de 31°C, y con una humedad relativa del 70%¹¹⁴

3.10 SINTESIS.

El PCA-4248 se preparó usando una modificación de la síntesis de Hantzsch, según la descripción de Fax y col¹¹⁵, según el esquema (Fig.11). En primer lugar, el aducto de dicetena-acetona (I) se rompe a 100°C para dar acetilacetona (II). Este compuesto es inestable y reacciona inmediatamente con el alcohol (III) para dar lugar a un β-cetoéster (IV). La reacción de este último con el 3-aminocrotonato correspondiente (V) en presencia de formaldehído da lugar finalmente a la ciclación de la molécula, con lo que resulta la 1,4-dihidropiridina(VI).

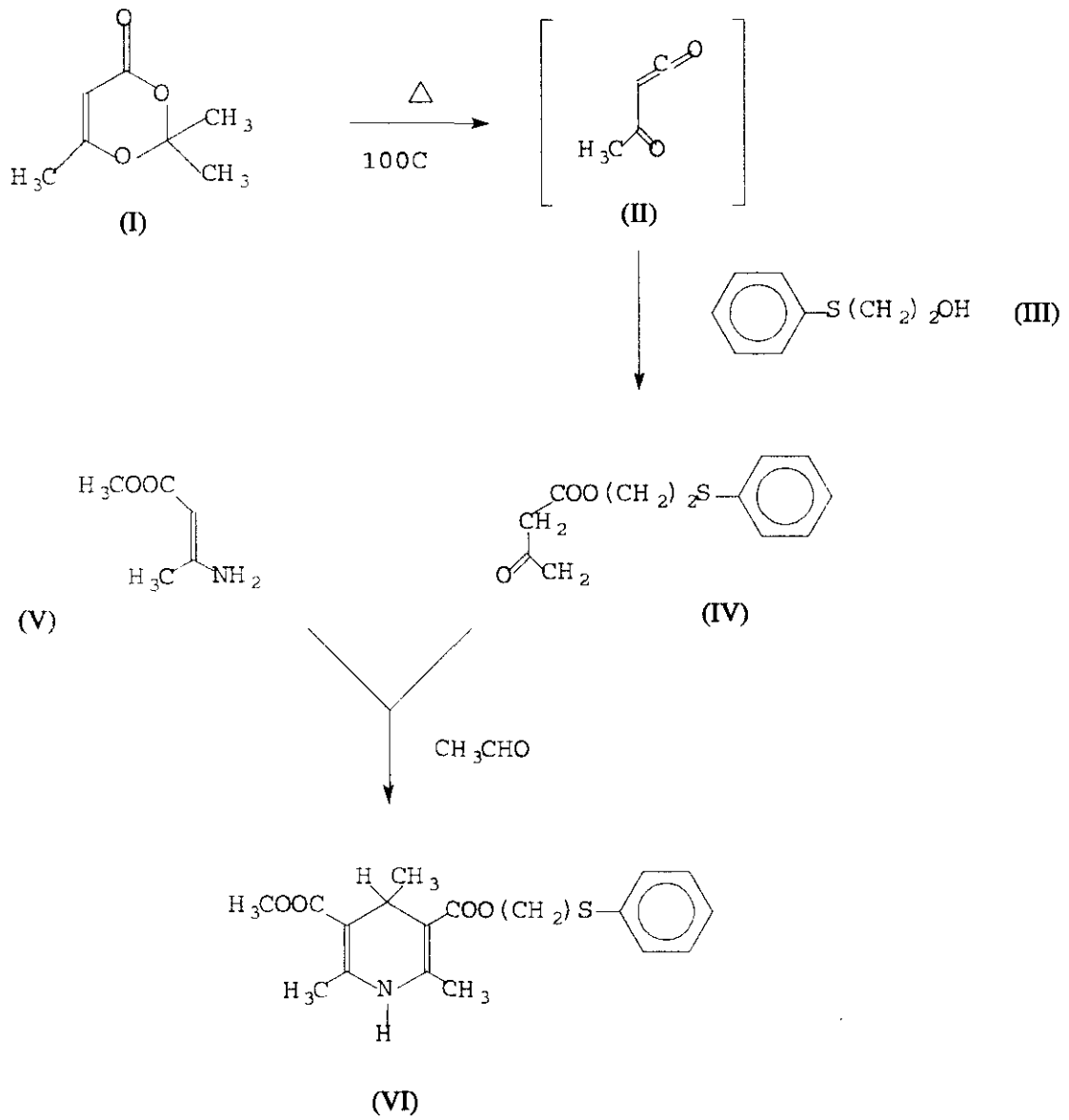


FIGURA 11. Esquema general de síntesis de 1,4 - dihidropiridinas.

4 ESTUDIOS EN CELULAS AISLADAS

4.1 ENSAYOS SOBRE PLAQUETAS.

4.1.1 OBTENCION DE LAS CELULAS.

Se realizaron experimentos en diversos tipos de preparaciones de plaquetas obtenidas como se describe a continuación.

Preparación de plasma rico en plaquetas (PRP).

El plasma rico en plaquetas se obtuvo de sangre de conejos y en algunos casos de voluntarios sanos. La sangre se anticoaguló con solución de ACD (concentración final 1/10, v/v) y se centrifugó dos veces a 172g durante 10 minutos a temperatura ambiente, para separar el plasma rico en plaquetas (PRP). El PRP se centrifugó de nuevo a 2000g, 4°C y 20 minutos para la obtención del plasma pobre en plaquetas (PPP). El número de plaquetas en el PRP se contó en un contador de células Coulter modelo ZM, y se ajustó, con PPP, a 300.000 plaq/ μ l para humanos y 350.000 plaq/ μ l para conejos.

Preparación de plaquetas filtradas.

Se preparó PRP para aislar las plaquetas según el método de Klopogge y col.¹¹⁶. El PRP aplicó en una columna de sepharosa 2B mantenida en tampón fosfato salino (PBS),

y equilibrada previamente a su utilización en tampón Tyrode/Hepes (sin calcio) desgasificado, con glucosa (5mM) y BSA (0.035%). Las plaquetas se eluyeron en este tampón y su número se ajustó a 200.000 plaq/ μ l. Después, la columna se lavó varias veces con tampón fosfato salino (PBS).

Obtención de plaquetas lavadas de conejo.

Se prepararon las suspensiones de plaquetas de conejo de acuerdo con el método de Vargas y col.¹¹⁷ ligeramente modificado. La sangre anticoagulada con ACD (1/6 final, v/v) se centrifugó para la obtención del PRP. Las plaquetas se sedimentaron por centrifugación a 2000g, 4°C durante 20 minutos. Se lavaron tres veces en tampón de lavado de plaquetas con glucosa (1mg/ml), BSA (3.5mg/ml), apirasa (25 μ g/ml) y PGE₁ (10ng/ml). Por último, se sedimentaron y se diluyeron en tampón Tyrode/Hepes (con calcio) suplementado con glucosa (1mg/ml) y BSA (3.5mg/ml). La solución de plaquetas se ajustó a la concentración de 350.000 plaq/ μ l.

4.1.2. AGREGOMETRIA Y LIBERACION DE ATP.

La agregación plaquetaria se midió en un lumiagregómetro Cronolog modelo 400, termostatizado a 37°C y con agitación constante de 1000 rpm, acoplado a un registrador de doble canal. Se utilizó la técnica de Born y col.¹¹⁸ modificada por Caen y Legrand¹¹⁹.

Los parámetros elegidos para medir el efecto inhibitor del fármaco fueron:

- Tiempo de latencia.
- Transmitancia (densidad óptica de la preparación).
- Reversibilidad e irreversibilidad de la agregación.
- Velocidad de agregación.

El tiempo de latencia se define como el intervalo transcurrido entre la adición del agonista y el comienzo de la de liberación de ATP.

El cambio máximo en la densidad óptica del plasma control se consideró como 100% de agregación.

La velocidad de agregación se calcula en unidades arbitrarias y es la pendiente máxima de la curva de agregación

Paralelamente, se midió la liberación de ATP como respuesta a la activación por los agonistas. La determinación se realizó en la misma muestra que la agregación según el método de Feinman y col.¹²⁰. La secreción se cuantificó mediante el registro de luminiscencia resultante de la reacción del ATP liberado, simultáneamente con otros componentes de los gránulos densos, con luciferasa de *Photinus pyralis* y luciferina sintética [ácido 4,5-dihidro-2-(6-hidroxi-2-benzotiazol)-4-tiazol-carboxílico].

Para la medida de luminiscencia se añadió a cada muestra 25mg/ml de una solución de luciferina/luciferasa en agua destilada. La calibración de la repuesta se realizó por adición de una cantidad conocida de ATP (228 nM) a cada una de las muestras.

Agregación por distintos agonistas en PRP humano.

La suspensión de plaquetas se preincubó con una solución de PCA-4248 (en DMSO al 0.2%) durante 15 minutos a 37°C antes de añadir el agonista. El PAF se añadió disuelto en tampón HEPES/bicarbonato con BSA al 0.25%. Las muestras control se incubaron en idénticas condiciones con 2µl/ml de DMSO. Se midió la actividad de dosis del PCA-4248 desde 10µM a 0.1nM, frente a PAF 0.1, 0.5 y 1µM. También se estudió el efecto del fármaco sobre la agregación inducida por otros agentes agregantes. Estos agonistas fueron los siguientes: ADP (2.5µM), ácido araquidónico (1mM), colágeno (1µg/ml) y epinefrina (5µg/ml).

Agregación inducida por PAF en plaquetas lavadas de conejo.

La suspensión de plaquetas lavadas se preincubó durante 5 minutos a 37°C con PCA-4248 en DMSO al 0.2%. Las muestras control se preincubaron con la misma concentración de DMSO. La agregación se inició por la adición de PAF en tampón Hepes/bicarbonato con BSA al 0.25%. Las concentraciones de PAF utilizadas fueron 0.2, 0.4 y 2nM, y las de PCA-4248 desde 10uM a 0.1nM.

4.1.3. ESTUDIOS DE UNION AL RECEPTOR.

Los estudios de unión al receptor del PAF en plaquetas, se llevaron a cabo en plaquetas lavadas de conejo y en plaquetas filtradas humanas.

Estudios sobre plaquetas lavadas de conejo.

Las plaquetas se resuspendieron en solución de Tyrode sin calcio, con glucosa 5mM y BSA al 0.2%, se añadieron a tubos de plástico y se incubaron con distintas concentraciones de [³H] PAF y PCA-4248 durante 30 minutos a temperatura ambiente, según el método descrito por Valone y col.⁸⁷. En los experimentos de desplazamiento del ligando, las células se incubaron con [³H] PAF 0.2nM y distintas concentraciones de PCA-4248 (de 10μM a 0.1nM). Las plaquetas se aislaron por filtración a vacío con filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) humedecidos previamente en solución de Tyrode con calcio. El procedimiento de filtración, incluyendo tres lavados con tampón a 4°C, se completó en 15-30 segundos. Los valores de radiactividad asociados a los filtros se cuantificaron por espectrofotometría de centelleo líquido. La unión inespecífica del compuesto marcado se valoró por la radioactividad incorporada en

presencia de PAF no marcado 2 μ M. Los resultados obtenidos se expresaron como % de unión específica al receptor. Tanto para los experimentos de saturación como para los estudios cinéticos, los datos se analizaron de acuerdo con el método de Munson y Rodbard¹²¹ modificado por McPherson¹²². Los valores de K_i se calcularon utilizando la ecuación de Cheng y Prusoff¹²³.

$$K_i = IC_{50} / \{1 + [[^3H] PAF]\} \times 1/K_D$$

donde IC_{50} es la concentración de antagonista capaz de desplazar al 50% del PAF marcado, $\{[^3H] PAF\}$ es la concentración de PAF marcado añadido al experimento (en nuestro caso el valor igual al de K_D) y K_D es la constante de disociación del PAF con su receptor.

Estudios sobre plaquetas filtradas humanas.

Para completar los experimentos llevados a cabo sobre el receptor de plaquetas de conejo, se realizaron experimentos de unión al receptor de plaquetas humanas. Se utilizaron plaquetas filtradas en solución de Tyrode suplementado con glucosa (0.1%) y albúmina de suero bovina (0.25%) y ajustadas a 200.000 plaq/ μ l. Para los estudios de desplazamiento, las plaquetas se incubaron con $[^3H]$ PAF 0.23nM, y distintas concentraciones de PCA-4248 (100 μ M a 0.1nM) durante 45 minutos a temperatura ambiente. La unión inespecífica se determinó realizando las incubaciones en presencia de PAF no marcado 2 μ M. Las células se incubaron en tubos Ependorf a los que se añadió una solución 1mM de Cl_2Ca/Cl_2Mg . La reacción se paró por adición de tampón a 4°C. Las plaquetas se lavaron tres veces por centrifugación a 8000g durante 30 segundos. Por último, se añadió una solución de Triton X-100 al 1%, en ácido

nítrico al 5%, para inducir la lisis de las células. El contenido de los tubos se traspasó a viales con líquido de centelleo y la radioactividad se valoró por espectrofotometría de centelleo líquido.

El porcentaje de inhibición presentado por el PCA-4248 para la unión de [³H] PAF a las plaquetas se calculó según la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Unión Total} - \text{Unión Total comp.} \times 100\%}{\text{Unión específica}}$$

Donde la unión específica era igual al valor de unión total menos la unión no específica.

4.1.4. MEDIDA DE LA MOVILIZACION DE Ca²⁺.

Las variaciones de la concentración de Ca²⁺ intracelular se midieron en células en suspensión. Se utilizó el método de Grynkiewicz¹²⁴, basado en la medición de la fluorescencia emitida por un quelante fluorescente de calcio, el Indo-1. El quelante entra en la célula en forma de acetoximetil ester, sustancia no polar que difunde al interior de la célula donde es hidrolizado por las esterasas intracelulares para dar lugar al ácido libre, de carácter polar, que queda atrapado en el interior.

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un fluorímetro de doble emisión Cairn termostatzado y con agitación. Los experimentos se realizaron a 37°C en cubetas de 2ml. La longitud de onda de excitación fue 360 nm, cuantificándose la fluorescencia emitida a 410 y 490 nm. La fluorescencia emitida por Indo-1 a 490 nm disminuye al unirse a calcio mientras que la señal a 410 nm aumenta al formarse el complejo Indo-Ca.

Los experimentos se realizaron en plaquetas de conejo filtradas. Las plaquetas se incubaron con Indo-1/AM 8 μ M durante una hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las plaquetas se sedimentaron por centrifugación a 1400g a 4°C durante 15 minutos. Tras dos lavados con medio nominal libre de Ca²⁺ se resuspendieron en el mismo medio y se ajustaron a 200.000 plaq/ μ l. Según el tipo de experimento se añadió a este medio una solución de calcio 1mM o de EGTA 200 μ M.

El PCA-4248, a concentraciones entre 0.1 y 1 μ M, y el correspondiente vehículo, se incubaron con cada muestra durante 1 a 5 minutos antes de la adición de 0.1nM de PAF, y se registraron las variaciones de la fluorescencia emitida a las dos longitudes de onda.

La concentración de calcio intracelular se calculó según el método de Grynkiewicz y col.¹²:

$$pCa^{2+} = pK_D + \log(R-R_{min}/R_{max}-R)$$

$$[Ca^{2+}] = K_D (R-R_{min}/R_{max}-R)$$

donde R es la relación de fluorescencia a las dos longitudes de onda para un punto dado, R_{max} es la señal de fluorescencia cuando todo el Indo esta unido a calcio, R_{min} la obtenida cuando todo el fluoróforo está libre y K_D es la constante de unión del complejo Indo-Ca (240nM). Por tanto, si se conocen los valores de K_D, R_{max} y R_{min} podemos calcular la concentración de calcio.

Para la cuantificación de la concentración de calcio se hicieron calibraciones (medidas de F_{max}, F_{mín} y AutoF) en las siguientes condiciones: medidas de F_{max} en presencia de

1mM de calcio y con ionomicina 1 μ M, Fmín en ausencia de calcio y en presencia de EGTA 1mM y medidas de autofluorescencia en células sin cargar con Indo. Todas las señales obtenidas en los experimentos se calibraron en presencia de la concentración adecuada de PCA-4248 dado que este compuesto altera el espectro de fluorescencia del Indo.

4.2 ESTUDIOS EN LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

4.2.1 OBTENCION DE LAS CELULAS.

Preparación de PMNs de conejo.

Los PMNs de conejo se obtuvieron siguiendo el método de Stewart¹²⁵. La sangre extraída con ACD (1/6, v/v, final) se centrifugó en las condiciones descritas para la obtención de PRP. La porción rica en hematíes y leucocitos se añadió sobre dextrano al 6% (en solución salina) y se dejó sedimentar durante una hora. La fase superior se separó y se centrifugó a 750g, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células sedimentadas se resuspendieron en una solución de suero fisiológico/PPP (4/1, v/v). La suspensión de células se añadió sobre la mitad de volumen de Ficoll-Paque y se centrifugó a 1000g durante 30 minutos. Los PMNs se obtuvieron de la capa inferior y se lavaron dos veces con tampón Tyrode/Hepes sin calcio por centrifugación a 1000g, 10 minutos a temperatura ambiente. En caso necesario, se sometieron a una lisis hipotónica con tampón Hepes/CINH₄.

Los PMNs se contaron microscópicamente con una cámara Neubauer y se resuspendieron en tampón Tyrode/Hepes en el que se utilizaron ajustados a 5.000 cél/ μ l. La viabilidad de las células valorada mediante la exclusión de Azul de Trypan fue del 85-90%. La población celular se examinó al microscopio con colorante de Wright, para valorar el porcentaje de PMNs, el cual fue siempre superior al 95%.

Obtención de PMNs humanos.

Los PMNs humanos se aislaron de sangre obtenida de voluntarios sanos por sedimentación con dextrano T-500 seguida de centrifugación sobre Ficoll-Paque, según el método modificado de Boyum y col.¹²⁶. La sangre extraída con EDTA (0.2M pH=7.4) se deja sedimentar con dextrano T-500 al 6%, a la proporción 1.3 volúmenes de dextrano por 4.7 volúmenes de sangre, durante 30-45 minutos a temperatura ambiente. El sedimento se elimina y el sobrenadante se centrifuga a 400g durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Las células se resuspendieron en tampón Tyrode/Hepes (con calcio) y se aplicaron sobre dos volúmenes de Ficoll-Paque. Tras centrifugar a 1000g durante 30 minutos, los PMNs se obtuvieron de la capa inferior y en caso necesario se sometieron a un proceso de lisis hipotónico, para eliminar los glóbulos rojos. Finalmente, las células se resuspendieron en solución de Tyrode con glucosa y BSA y se ajustaron a 3.000 cél/ μ l.

4.2.2 ENSAYOS DE UNION AL RECEPTOR.

Estudios de unión al receptor en PMNs de conejo.

El desplazamiento de la unión de PAF a los receptores de PMNs de conejo se realizó a temperatura ambiente. Los PMNs (5000/ μ l) se incubaron con 0.5nM de [³H] PAF en Hepes/bicarbonato con BSA al 0.25% y con concentraciones variables de PCA-4248 (de 10 μ M a 0.1nM) durante una hora. La unión no específica se valoró por la adición de ligando no marcado a la concentración 2 μ M.

La reacción se paró por enfriamiento de los tubos a 4°C, y las células se filtraron a vacío con filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C. Los filtros se introdujeron en viales que

contenían líquido de centelleo y se contó la radioactividad incorporada en ellos. El método de cálculo fue idéntico al utilizado para los estudios de unión al receptor de plaquetas de conejo.

Estudios de unión al receptor de PMNs humanos.

Los ensayos de unión al receptor en PMNs humanos, se hicieron según el método de Sánchez-Crespo y col.³¹. Los PMNs en solución de Tyrode suplementada con glucosa y BSA en presencia de $\text{Cl}_2\text{Ca}/\text{Cl}_2\text{Mg}$ 1 mM, se ajustaron a 3.000 cél/ μl . Los PMNs se incubaron durante 30 minutos a 37°C con 0.96nM de [³H]PAF y distintas concentraciones de PCA-4248 (de 10 μM a 0.1nM).

La unión no específica se determinó realizando las incubaciones en presencia de PAF no marcado 2 μM . La reacción se detuvo por dilución con medio a 4°C, seguida de tres lavados por centrifugación a 1000g durante 1 minuto. Por último, se añadió una solución de Triton X-100 (1%) en ácido nítrico al 5% a la suspensión celular y el lisado celular se añadió a viales que contenían líquido de centelleo para el recuento de radioactividad.

El porcentaje de inhibición de unión de PAF a PMNs producido por el antagonista se calculó de acuerdo con la ecuación descrita para los estudios de unión al receptor de plaquetas humanas.

4.3 ENSAYOS EN MACROFAGOS ALVEOLARES DE COBAYA.

4.3.1 OBTENCION DE LAS CELULAS.

Los macrófagos alveolares de cobaya se prepararon según el método descrito por Maridonneau-Parini y col.¹²⁷. Los macrófagos se obtuvieron por lavados repetidos en pulmón

de cobayas anestesiados con pentobarbital sódico (60mg/Kg) por vía intraperitoneal). Se hicieron cinco lavados con 10ml de tampón fosfato salino (PBS)/lidocaína, a través de una cánula introducida en la tráquea del animal.

El líquido obtenido se centrifugó a 470g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con HEPES 20mM, a la concentración de 3000cel/ μ l y se dejaron estabilizar en un baño a 37°C durante dos horas. La viabilidad celular por ensayo de exclusión de Azul de Trypan, fue superior al 95% y la proporción de macrófagos del 85-90% de las células totales.

4.3.2. ESTUDIOS DE UNIÓN AL RECEPTOR.

* Pre-incubación con LPS.

Las células se incubaron durante cuatro horas a 37°C en presencia de 100ng/ml de endotoxina bacteriana de E.coli 0111B4 en suero fisiológico (LPS) o el vehículo apropiado.

* Pre-incubación con TNF.

Las células se mantuvieron a 37°C durante cuatro horas y la citoquina, a la concentración de 10U/ml en PBS con BSA al 0.1%, se añadió a la suspensión celular 15 minutos antes de finalizar este período. Posteriormente, las células se incubaron durante una hora más a temperatura ambiente con las concentraciones de [3 H] PAF adecuadas a cada caso:

- 0.5nM PAF + vehículo.
- 1.2nM PAF + LPS.
- 1.2nM PAF + TNF.

junto con concentraciones variables de PCA-4248 10 μ M a 0.1nM, en DMSO al 0.2%.

Para el cálculo de unión no específica se añadió PAF no marcado 2 μ M.

Al igual que en PMNs y plaquetas de conejo la reacción se detuvo por inmersión de los tubos en baño de hielo y filtración en vacío. Los resultados obtenidos se valoraron de la

misma manera que en los estudios de unión de PAF al receptor de plaquetas de conejo.

4.3.3. ESTUDIOS DE PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO.

La producción de anión O_2^- se determinó en alícuotas de 0.5ml de suspensión de macrófagos. La medida de la luminiscencia se valoró en un lumiagregómetro Cronolog modelo 400 termostatzado a 37°C. La producción de anión superóxido se determinó por quimioluminiscencia, utilizando el método dependiente de luminol de Descamps-Latscha y col.¹²⁸. La suspensión de células se incubó a 37°C con agitación constante con una solución de luminol 10 μ M, en presencia de azida sódica 100 μ M y de 10U/ml de peroxidasa de rábano picante. La luminiscencia emitida en cada muestra se valoró frente a un standard interno de 294 pmol de H₂O₂. Previamente a la realización del ensayo, las células se dejaron estabilizar durante dos horas a 37°C. En algunos casos se hizo una pre-estimulación con LPS (2 μ g/ml), TNF (10U/ml) o PAF(2nM) durante el tiempo de estabilización a 37°C. Posteriormente las células se pasaron a la cubeta del lumiagregómetro y se estimularon con el agonista correspondiente: TNF, PAF, LPS y fMLP. Las células se preincubaron durante 1 minuto con 100ng/ml de PCA-4248, o vehículo, antes de la adición del agonista. Las concentraciones utilizadas de los distintos agonistas fueron las siguientes:

- TNF 10U/ml en PBS con BSA al 0.1%.
- LPS 2 μ g/ml en suero fisiológico.
- fMLP 1nM en PBS.
- PAF 2nM en Hepes/bicarbonato con BSA al 0.25%.

5 ESTUDIOS "IN VIVO".

Se desarrollaron dos tipos de experimentos:

- * Modelos dependientes directamente de PAF:
 - Muerte e hipotensión inducida por PAF.
- * Modelos en los que estimula la producción de PAF endógeno por estimulación de diversos tipos de células:
 - Shock endotóxico.
 - Hipotensión inducida por LPS

5.1 AGREGACION "EX VIVO" EN PRP DE CONEJO.

Se utilizaron conejos albinos Nueva Zelanda, machos de 3 -3.5 Kg de peso. Los animales recibieron por vía oral una dosis única de 10mg/Kg de PCA-4248 en 10ml/Kg de carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5%. Los animales control recibieron un volumen igual del mismo vehículo. Inmediatamente antes de la administración del compuesto, se implantó un *catéter en la arteria media de la oreja para proceder a la extracción de muestras de sangre.* El catéter se llenó con solución salina isotónica heparinizada y se mantuvo a lo largo de todo el experimento. Las muestras de sangre se obtuvieron inmediatamente antes y 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración del compuesto en *jeringas de plástico conteniendo 0.1 volúmenes de citrato al 3.8%.* A partir de esta sangre se preparó el PRP en la forma habitual, ajustándose el número de plaquetas a 350000/ μ l con PPP autólogo. La agregación se indujo en cada muestra con PAF 3,10 y 30 nM, calculándose el porcentaje de inhibición con respecto a la respuesta de la muestra predosis.

La significación estadística de la diferencia de respuesta entre las plaquetas de animales tratados y no tratados se calculó aplicando el test de t de Student para datos no apareados.

5.2 MODELOS DE HIPOTENSION EN RATA ANESTESIADA.

5.2.1 HIPOTENSION INDUCIDA POR PAF.

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley, machos de 250 gramos de peso. El protocolo de hipotensión inducida por PAF fue básicamente el descrito por Terashita¹²⁹, con ligeras modificaciones. Las ratas se anestesiaron por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (60mg/Kg), y se cateterizó la vena femoral izquierda para la administración de PAF (1ml/kg en tampón Hepes/Bicarbonato con BSA al 0.25%) y PCA-4248 (0.2ml/Kg en PEG 400/suero fisiológico 1/1). El valor de la media integrada de la presión arterial se determinó con un polígrafo Letica modelo 2000, conectado a un transductor de presión mediante un catéter de polietileno que se introdujo en la arteria carótida derecha del animal. Se realizaron cuatro series diferentes de experimentos:

- 1 0.3 μ g/Kg de PAF se inyectaron 5 minutos después de la administración intravenosa de PCA-4248 (0.3mg/Kg). Los animales se observaron durante 15 minutos para ver el efecto protector del PCA-4248 frente a la hipotensión inducida por PAF.
- 2 0.3 μ g/Kg de PAF se inyectaron por vía intravenosa y cuando la caída de presión del animal alcanzó su máximo (a los 2 minutos), se administraron 0.3mg/kg de PCA-4248 por vía intravenosa, procediéndose a registrar los cambios de la presión arterial durante los siguientes 15 minutos. En esta serie de experimentos se trató de caracterizar el efecto del PCA-4248 sobre la

reversibilidad de la hipotensión inducida por el PAF.

- 3 0.66 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de PAF y PCA-4248 (1mg/kg) inyectados simultáneamente. Pasados cinco minutos se extrajo sangre del animal a través de un catéter insertado en la arteria femoral derecha del animal. La sangre obtenida se centrifugó para la obtención del valor hematocrito lo que nos permitió valorar el efecto del fármaco sobre la extravasación de plasma.

- 4 PCA-4248, 30mg/Kg, administrado como una suspensión estable en carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5%, por vía oral (10ml/Kg), una hora antes de inyectar PAF (0.3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Se registraron las variaciones de presión arterial durante treinta minutos tras la inyección de PAF. En estos experimentos caracterizamos la biodisponibilidad y el efecto del PCA-4248 sobre la hipotensión inducida por PAF cuando el fármaco se administra por vía oral.

La significación estadística de las diferencias de respuesta entre animales control y tratados se evaluaron utilizando el test de t de Student, para datos no apareados.

5.2.2 HIPOTENSION INDUCIDA POR ENDOTOXINA BACTERIANA EN RATA.

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 200-250 gramos de peso que se anestesiaron por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (60mg/Kg). En estos experimentos se trató de definir la capacidad del antagonista para suprimir los efectos producidos por la liberación endógena de PAF. Se siguió el método modificado de Terashita y col¹⁸, tratando de reproducir en los animales parte de las alteraciones que ocurren durante el shock endotóxico. Se

midieron:

- Hipotensión inducida por endotoxina bacteriana.
- Leucopenia.
- Trombocitopenia.

Se realizaron tres tipos de experimentos:

- 1 PCA-4248 (2mg/Kg) en PGE400/suero fisiológico 1/1, v/v (0.2ml/Kg), inyectado cinco minutos antes de la administración intravenosa de 7.5mg/Kg de LPS (endotoxina bacteriana de *E. coli* 0111B4) en suero fisiológico 0.2ml/Kg. Se registraron los cambios en la presión arterial y las variaciones del número de plaquetas y leucocitos circulantes durante un hora. El recuento de leucocitos y plaquetas se realizó en muestras de sangre obtenidas a través de un catéter insertado en la arteria femoral derecha. Las muestras se extrajeron inmediatamente antes y 15, 30, 45 y 60 minutos después de la inyección de LPS.
- 2 En otra serie de experimentos, se inyectó 1mg/Kg de PCA-4248 20 minutos después de LPS (7.5mg/Kg), es decir, cuando la caída de presión arterial inducida por la inyección de endotoxina se había estabilizado. Después de la administración se observó la respuesta de los animales durante una hora.
- 3 PCA-4248 (20mg/Kg) se administró por vía oral una hora antes de la endotoxina bacteriana endovenosa (7.5mg/Kg). Los cambios en la presión arterial se registraron durante una hora a partir de la inyección de LPS.

La significación estadística de las diferencias obtenidas entre los animales tratados y no tratados se calculó a por medio del test de t de Student, para datos apareados.

5.3 MODELOS DE SHOCK EN RATON.

5.3.1 MORTALIDAD INDUCIDA POR PAF.

Se valoró la duración del efecto del compuesto administrado por vía oral y la relación dosis-respuesta, en ratones RMNI, machos de 30 grs de peso. El PCA-4248 (10 y 30 mg/Kg) se administró por vía oral como suspensión en CMC al 0.5%, (10ml/Kg) a diversos tiempos comprendidos entre los 5 minutos y las 5 horas antes de la inyección intravenosa de 80µg/Kg de PAF (1ml/Kg). Se determinó la supervivencia de los ratones tratados con el PCA-4248 o vehículo durante una hora después de la inyección de PAF.

La significación estadística de las diferencias entre el grupo control y el grupo de animales administrados con el PCA-4248, se calculó aplicando el test de X^2 , con la corrección de Yates.

5.3.2 MORTALIDAD INDUCIDA POR ENDOTOXINA BACTERIANA.

Ratones RMNI de idénticas características a los utilizados anteriormente recibieron por vía oral distintas dosis del PCA-4248 en suspensión en CMC al 0.5%. Cada raton recibió dos dosis de vehículo o PCA-4248 (3,10 o 30 mg/Kg) cinco horas antes y una hora después de la inyección intravenosa de 7.5mg/Kg de endotoxina (E.coli 0111B4 1ml/kg). La mortalidad se contabilizó durante 24, 48, 72 y 96 horas de acuerdo con el método descrito por Handley¹³⁰. La significación estadística de las diferencias en la mortalidad entre los animales tratados y no tratados se calculó de la misma manera que en el apartado anterior.

5.4 ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados se expresaron como valores medios \pm E.S. Para la comparación entre los grupos se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA). Se aplicó, para varianzas homogéneas, el test de t de Student para datos apareados y no apareados, de acuerdo con el número de experimentos. En todos los casos, se consideró que las diferencias eran significativas cuando un valor de $P < 0.05$. Para los estudios de supervivencia se aplicó el test de X^2 con la corrección de Yates.

III RESULTADOS

1 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA ACTIVIDAD DE PAF EXOGENO IN VITRO.

En este apartado se valoró la actividad del PCA-4248 sobre distintas respuestas celulares:

- Agregación y liberación de ATP inducida por PAF sobre plaquetas de conejo y sobre plasma rico en plaquetas (P.R.P.) de voluntarios sanos.
- Agregación inducida por otros agentes agregantes: ADP, AA, colágeno y epinefrina, en plasma rico en plaquetas (P.R.P.) de voluntarios sanos.
- Movilización de Ca^{2+} inducida por PAF en plaquetas de conejo.
- Producción de anión superóxido inducida por PAF en macrófagos alveolares de cobaya.

1.1 AGREGACION Y SECRECION DE ATP EN PLAQUETAS DE CONEJO INDUCIDA POR PAF.

Los experimentos iniciales se realizaron en plaquetas de conejo lavadas con el fin de analizar el efecto de distintas concentraciones del PCA-4248 sobre la activación plaquetaria inducida por PAF. En la figura 1 se puede observar como la agregación inducida por PAF es dependiente de la concentración del agonista hasta la dosis de 1.9nM, por lo que se escogió esta concentración para estudiar el efecto del PCA-4248. Como se puede apreciar en la Fig.1, la dosis efectiva de PAF que provoca el 50% de respuesta, ED_{50} , calculada a partir de 9 experimentos independientes fue de $0.2 \pm 0.02nM$.

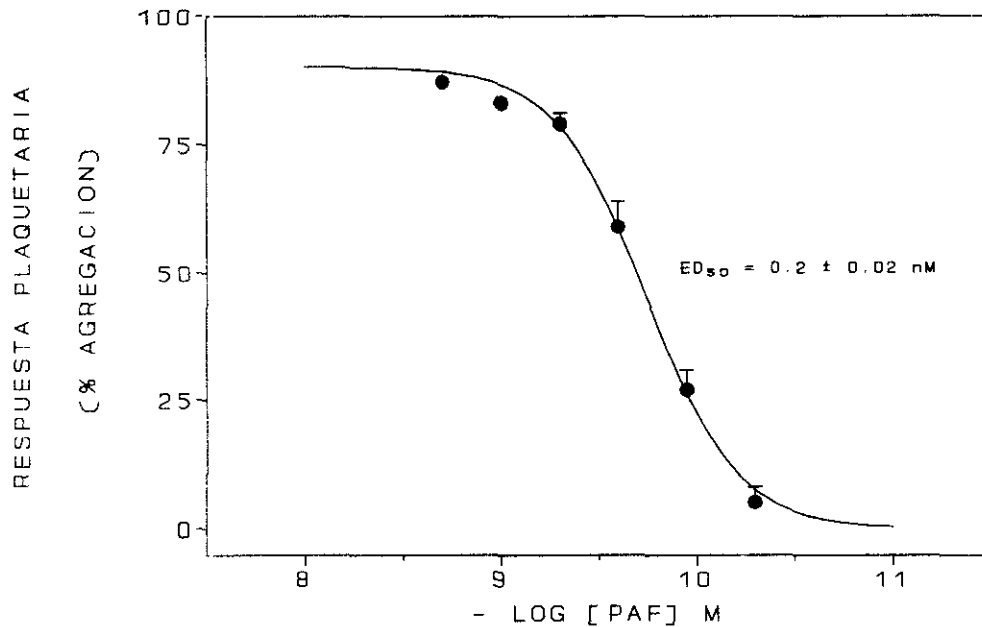


FIGURA 1. Curva dosis-respuesta de PAF frente a la activación de plaquetas lavadas de conejo. La suspensión de plaquetas (350.000 plaq/ μ l) se pre-incubó durante 5 minutos a 37°C tras lo que se añadió PAF. Los resultados son la media \pm E.S. de 9 experimentos.

El PCA-4248 se preincubó 5 minutos a 37°C en la suspensión de plaquetas, 350000 plaq/ μ l, y el PAF se utilizó a la concentración de 1.9nM. El PCA-4248 inhibió la agregación plaquetaria de forma dependiente de la concentración, con un valor de IC₅₀ = 0.3 \pm 0.02 μ M, calculado a partir de los valores mostrados en la figura 2. También inhibió la liberación de ATP de forma dosis-dependiente, con un valor de IC₅₀ = 0.01 \pm 0.006 μ M. Estos datos indican que

el PCA-4248 es, aproximadamente, diez veces más activo sobre la liberación de ATP que sobre la agregación plaquetaria.

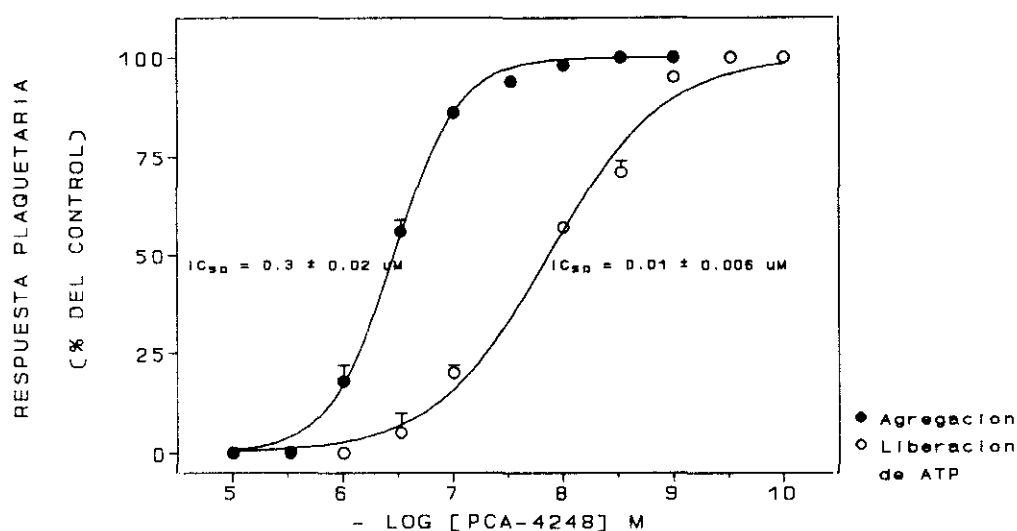


FIGURA 2. Efecto del PCA-4248 sobre la agregación y la liberación de ATP inducida por PAF. Las plaquetas lavadas de conejo se preincubaron durante 5 minutos con PCA-4248, pasados los cuales, se estimularon con PAF 1.9nM. Los valores son la media \pm E.S. de 3 experimentos por duplicado.

Con el fin de identificar el tipo de antagonización producida por el PCA-4248 sobre el efecto del PAF, se representaron los resultados de los experimentos de inhibición de la respuesta frente a tres concentraciones de PAF. La figura 3 es la representación de dobles inversas ($1/\text{Inhibición de la agregación frente a } 1/[\text{PCA-4248}]$) para las tres concentraciones de PAF. Los resultados dieron lugar a tres rectas que se cortan, aproximadamente, en el mismo punto del eje de ordenadas, lo que sugiere que el PCA-4248 se comporta como un

antagonista competitivo del PAF.

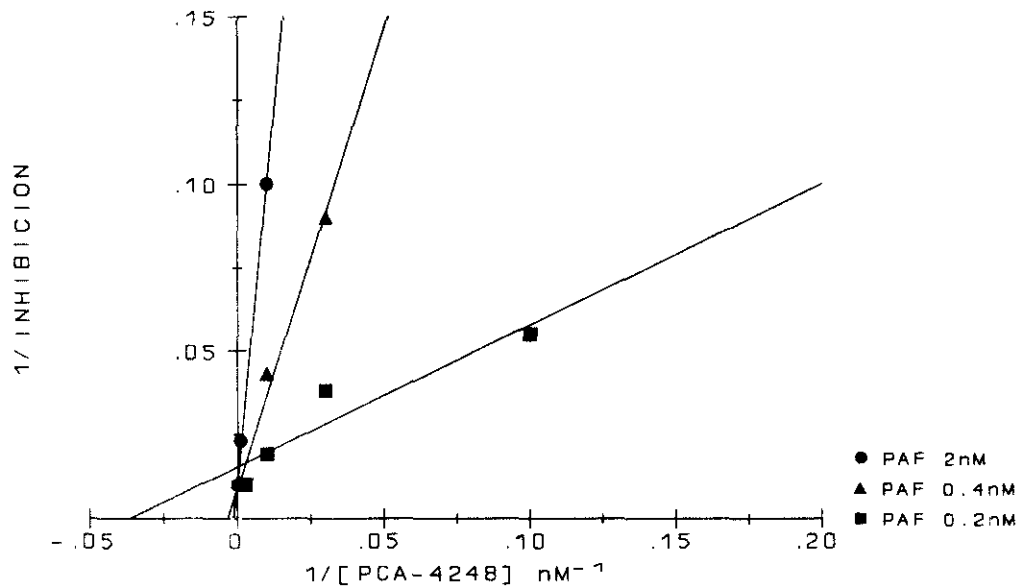


FIGURA 3. Representación de dobles inversas para la agregación de plaquetas lavadas de conejo. Las plaquetas ($350.000/\mu l$) se preincubaron con PCA-4248 durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se adicionó el PAF 0.2, 0.4 y 2 nM. Cada recta representa una curva-dosis repuesta del PCA-4248 para una concentración de PAF. Los valores son la media \pm E.S. de tres experimentos por duplicado.

1.2 AGREGACION Y LIBERACION DE ATP INDUCIDAS POR PAF EN PRP HUMANO.

La concentración de PAF necesaria para obtener una respuesta de las plaquetas en plasma es mayor que la requerida en plaquetas lavadas debido, probablemente, a la presencia de albúmina que se une al PAF con alta afinidad. La figura 4 representa la curva dosis-

respuesta de agregación inducida por PAF. El valor de ED_{50} fue 4.9 ± 0.04 nM y la menor concentración de PAF que induce respuesta máxima $0.1 \mu\text{M}$.

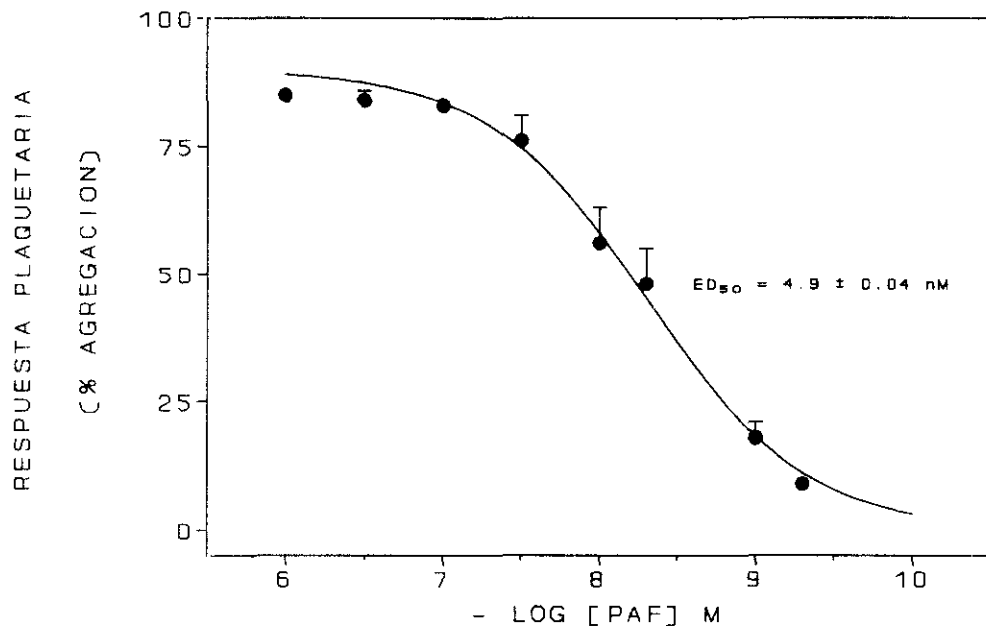


FIGURA 4. Curva dosis-respuesta de PAF en P.R.P. humano. Los plasmas humanos contenían 300.000 plaq/ μl . Se pre-incubaron durante 15 minutos a 37°C y luego se estimularon por PAF. Los resultados son la media \pm E.S. de 9 experimentos.

Para PAF = $0.1 \mu\text{M}$, el PCA-4248 se incubó durante 15 minutos a 37°C con 300.000 plaq/ μl (figura 5). El PCA-4248 fue capaz de inhibir tanto la agregación como la liberación de ATP de manera dependiente de la dosis, con valores de IC_{50} de $2.95 \pm 0.03 \mu\text{M}$ y $5.65 \pm 0.01 \mu\text{M}$, respectivamente.

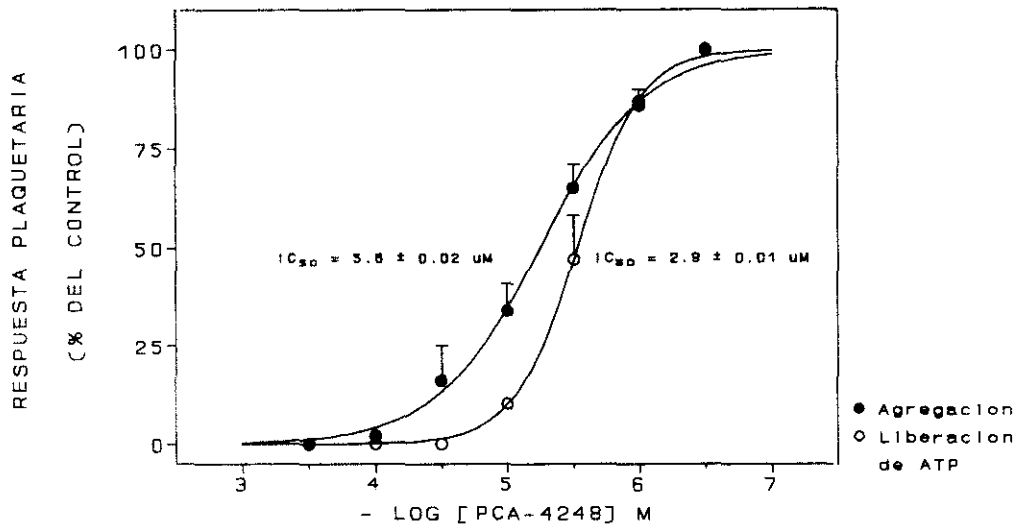


FIGURA 5. Efecto de PCA-4248 sobre la agregación y la liberación de ATP en PRP humano. El plasma rico en plaquetas, 300.000 plaq/ μ l, se preincubaron durante 15 minutos en presencia de distintas concentraciones del PCA-4248, tras lo que se añadió PAF 0.1 μ M. Los valores son la media \pm E.S. de 6 experimentos.

Por último, para caracterizar el efecto del fármaco sobre la agregación inducida por PAF en plasma rico en plaquetas se realizaron experimentos frente a tres concentraciones de PAF. La representación de dobles inversas para PAF 0.1, 0.5 y 1 μ M, mostró, al igual que en plaquetas de conejo, una familia de rectas que se cortan en el mismo punto del eje de ordenadas (Fig. 6).

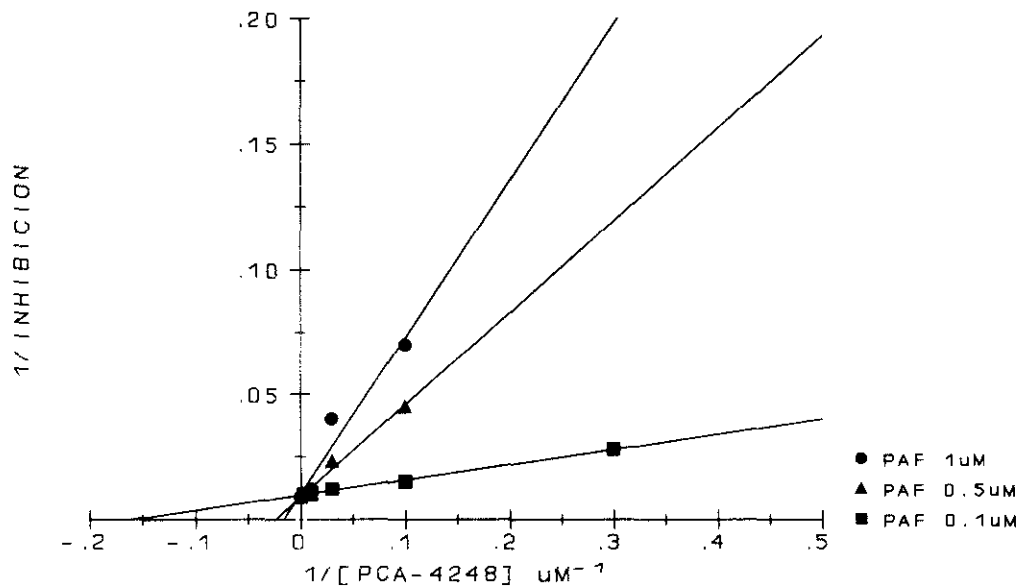


FIGURA 6. Representación de dobles inversas sobre la agregación en PRP humano. Los plasmas ricos en plaquetas (PRP) ajustados a 300.000 plaq/ μ l, se pre-incubaron con PCA-4248 durante 15 minutos a 37°C. Después se estimularon por PAF 0.1, 0.5 y 1 uM. Cada recta representa un curva dosis-respuesta de PCA-4248 para una concentración de PAF.

1.3 AGREGACION INDUCIDA POR OTROS AGENTES AGREGANTES SOBRE PRP HUMANO.

Con el fin de aclarar si el efecto del PCA-4248 sobre la agregación inducida por PAF es específico, o si por el contrario, se trata de una acción generalizada sobre la agregación plaquetaria, se realizaron estudios con otros agonistas plaquetarios a concentraciones capaces de provocar una respuesta máxima: ADP (2.5 μ M), AA (1mM), epinefrina 5 μ g/ml y colágeno

(1 µg/ml). En la tabla 1 se puede apreciar que a la concentración 10 µM, el compuesto no mostró ningún efecto sobre la agregación inducida por otros agonistas.

		<u>% Agregación plaquetaria</u>
Colágeno	(1 µg/ml)	83 ± 5
Epinefrina	(5 µg/ml)	93 ± 5
ADP	(2.5 µM)	89 ± 6
AA	(1 Mm)	96 ± 3

TABLA 1. Efecto del PCA-4248 sobre la agregación plaquetaria inducida por diversos agentes agregantes. PCA-4248, 10 µM, se pre-incubó durante 15 minutos a 37°C con 300.000 plaq/µl antes de la activación con los diversos agonistas. Los datos son la media ± E.S. de 3 experimentos.

1.4 EFECTO DE PCA-4248 SOBRE LA MOVILIZACION DE Ca²⁺ EN PLAQUETAS INDUCIDA POR PAF.

Aunque no se conocen por completo los mecanismos que regulan la agregación y la secreción en plaquetas, se sabe que ambos procesos están regulados por la concentración citoplasmática del ion Ca²⁺. Por otra parte el Ca²⁺ juega un papel importante en la transducción de la señal iniciada por PAF. Con el fin de aclarar la posible influencia del PCA-4248 sobre estos mecanismos, se hicieron experimentos en plaquetas filtradas de conejo para:

- Caracterizar si el aumento de la [Ca²⁺] citosólico inducido por PAF en plaquetas era debido al aumento de entrada de Ca²⁺ extracelular o a la salida al citosol

del Ca^{2+} de los depósitos.

- Estudiar si el aumento de la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico es dependiente de la dosis de PAF.
- Determinar el efecto de distintas concentraciones de PCA-4248 sobre la entrada de Ca^{2+} extracelular.

La curva dosis-respuesta de PAF se llevó a cabo en dos condiciones distintas: en presencia de Ca^{2+} extracelular 1mM y en plaquetas suspendidas en tampón nominalmente libre de Ca^{2+} al que se añadió EGTA 0.2mM. La figura 7 muestra los resultados obtenidos.

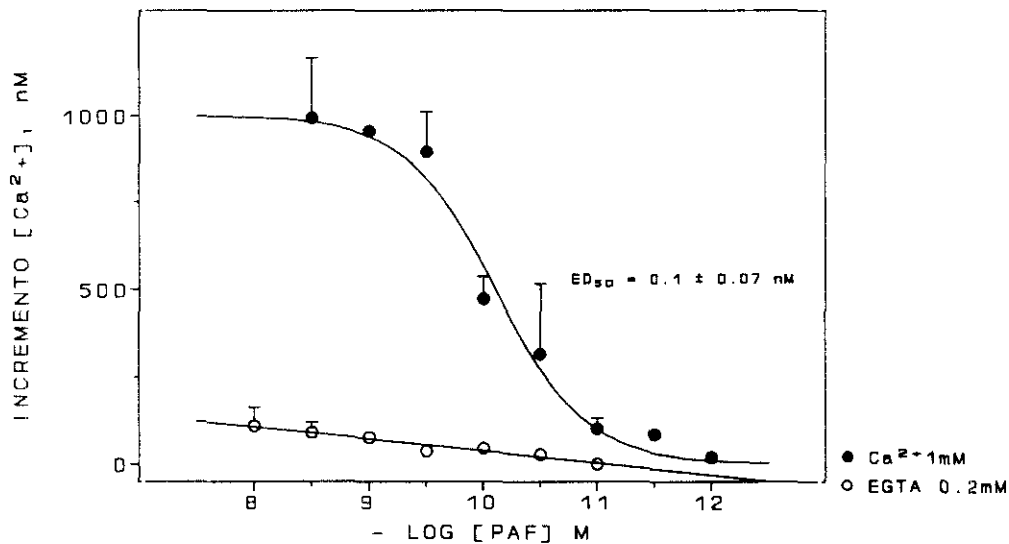


FIGURA 7. Movilización de Ca^{2+} inducida por PAF en plaquetas de conejo. Las plaquetas filtradas de conejo, 200.000/ μl , se incubaron a 37°C en presencia de Ca^{2+} extracelular (círculos negros) y de EGTA 0.2mM (círculos blancos), y se estimularon con distintas concentraciones de PAF. Los datos son la media \pm E.S. de 8 experimentos.

Se observa que el aumento de la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico es dependiente de la dosis,

y es máximo con una concentración de PAF 1nM. También se pudo atribuir un origen extracelular al Ca^{2+} acumulado, ya que el incremento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólico se produjo cuando la estimulación de las plaquetas se realizó en un medio con Ca^{2+} 1mM, pero cuando el agonista se añadió en presencia de EGTA 200 μM , el incremento en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue casi inapreciable. El valor ED_{50} sobre la entrada de entrada de Ca^{2+} extracelular fue de $0.1 \pm 0.07\text{nM}$.

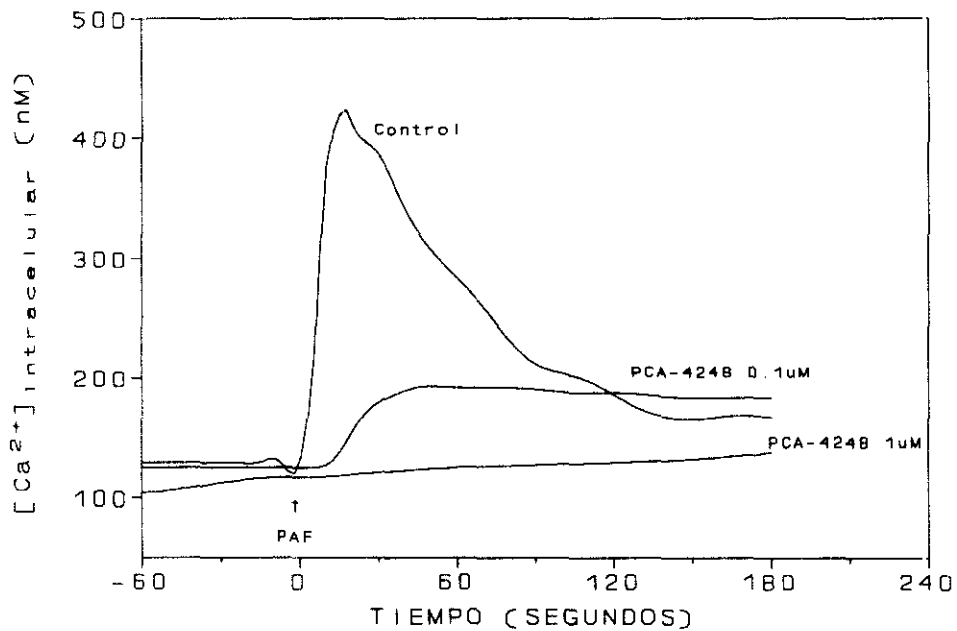


FIGURA 8. Efecto del PCA-4248 sobre el pico de Ca^{2+} inducido por PAF. Las plaquetas se pre-incubaron con PCA-4248 0.1 y 1 μM durante 1 a 5 minutos a 37°C antes de la estimulación por PAF. La figura muestra los resultados obtenidos para un minuto de pre-incubación del PCA-4248 (un experimento representativo).

El PCA-4248 a las concentraciones 1 μ M y 100nM se incubó durante distintos tiempos previamente a la estimulación por PAF 0.1nM en presencia de Ca²⁺ extracelular 1mM. La figura 8 muestra que una incubación de un minuto a 37°C, es suficiente para que el PCA-4248 suprima el pico de Ca²⁺ extracelular casi totalmente (91 \pm 7% de inhibición, a la concentración 1 μ M) o lo reduzca significativamente (71 \pm 7%, con PCA-4248 100nM). La figura 9 nos muestra la curva dosis-efecto del PCA-4248 frente a la entrada de Ca²⁺ extracelular inducida por PAF 0.1nM. El valor de IC₅₀ para el PCA-4248 en presencia de Ca²⁺ extracelular era 0.5 \pm 0.06nM.

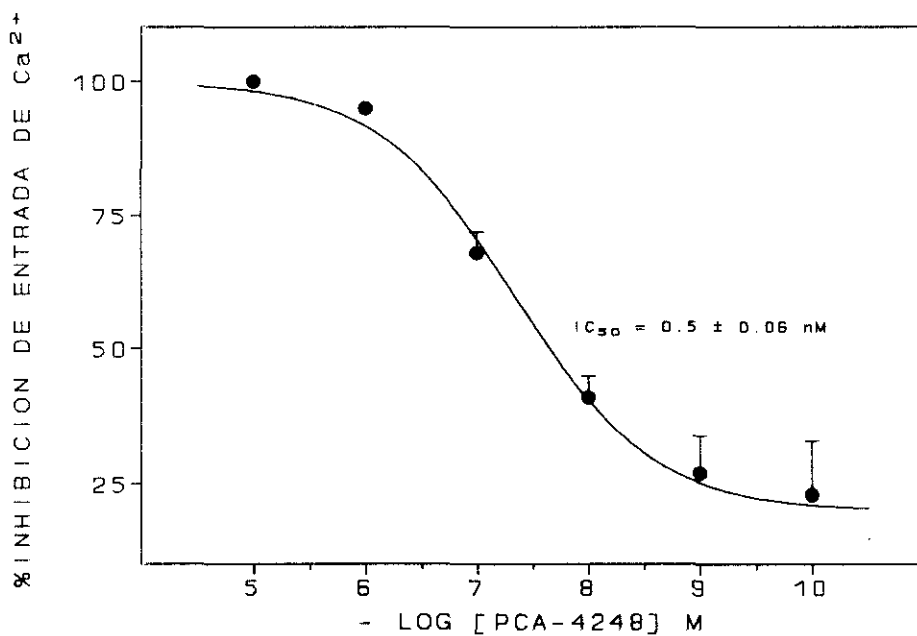


Figura 9. Curva dosis-respuesta para PCA-4248 frente a la entrada de Ca²⁺ extracelular inducida por PAF en plaquetas.

El PCA-4248 se incubó 5 minutos a 37°C previos a la estimulación por PAF 0.1nM. Los datos representan la media \pm E.S. de 6 experimentos.

1.5 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO EN MACROFAGOS ALVEOLARES DE COBAYA ESTIMULADOS POR PAF.

Cuando se estimulan los macrófagos alveolares de cobaya con diversos agonistas, entre ellos el PAF, se desencadena la explosión oxidativa con la consiguiente producción de anión superóxido. La producción de anión superóxido es dependiente de la concentración de PAF. En estos experimentos se realizaron curvas dosis-respuesta, pero debido a la variabilidad de los resultados no se pudo hacer un análisis estadístico de los datos. Se observó que con PAF 0.2nM la producción de anión superóxido era máxima, sin que se observara aumento de la señal con concentraciones superiores. La respuesta frente a PAF fue rápida y transitoria. Se ensayó la actividad del PCA-4248 100nM frente a esta concentración de PAF, tratando de minimizar las variaciones propias de cada muestra, utilizando una concentración elevada de PAF. La tabla 2 muestra los resultados obtenidos, pudiéndose observar que el PCA-4248 suprime casi totalmente la producción de anión superóxido.

	<u>Pmol de O₂⁻/1,5x10⁶ células</u>
Macrófagos + vehículo	0 ± 0
Macrófagos + PAF + vehículo	238 ± 75
Macrófagos + PAF + PCA-4248	2 ± 0.6

TABLA 2. Efecto del PCA-4248 sobre la producción de O₂⁻ inducida por PAF en macrófagos alveolares de cobaya. Los macrófagos (3.000cel/μl) se pre-incubaron durante 1 minuto a 37°C con PCA-4248 100nM, después se añadió PAF 2nM. Los datos son la media ± E.S. de 6 experimentos.

2 ESTUDIOS DE UNION DEL PCA-4248 AL RECEPTOR DEL PAF EN DISTINTAS CELULAS.

En los experimentos descritos hasta ahora se ha demostrado que el PCA-4248 es un inhibidor específico y competitivo de los efectos del PAF sobre distintos tipos de células. En este apartado pretendemos analizar, además, si el PCA-4248 se comporta como un antagonista específico y competitivo de la unión del PAF a su receptor en distintos tipos de células, puesto que los compuestos que inhiben la agregación plaquetaria y la liberación de ATP inducida por PAF muestran una buena correlación entre su capacidad como agentes antiagregantes y el valor de K_i que muestran para desplazar el PAF de su receptor en plaquetas.

2.1 INTERACCION DEL PCA-4248 CON EL RECEPTOR DE PAF EN PLAQUETAS DE CONEJO.

Se llevaron a cabo estudios de:

- Saturación para la unión de [3 H] PAF en presencia del PCA-4248.
- Estudios cinéticos de asociación y disociación.
- Experimentos de desplazamiento de [3 H] PAF por el PCA-4248 y la Nitrendipina.

Se realizaron experimentos de saturación de la unión de [3 H] PAF en presencia del vehículo y del PCA-4248 0.5nM, 3.7nM y 1 μ M. Se calcularon los valores de K_D y de unión máxima (Bmax) para las distintas condiciones. La figura 10 muestra los resultados obtenidos. La representación de Scatchard para las concentraciones menores del antagonista 0.5 y 3.7nM dio lugar a una familia de rectas que se cortan en un solo punto del eje de ordenadas, lo que

demuestra antagonismo competitivo, mientras que para la concentración $1\mu\text{M}$ la recta se cortó en otro punto. Los valores de unión máxima y K_D no variaban apreciablemente $K_D = 0.2 \pm 0.01\text{nM}$, $0.3 \pm 0.02\text{nM}$, $0.3 \pm 0.01\text{nM}$ y los valores de B_{max} : 156, 157 y 154 $\text{fmol}/10^8$ plaq, para vehículo, PCA-4248 0.5nM y 3.7nM, respectivamente. Sin embargo, a la concentración de PCA-4248 $1\mu\text{M}$, éste se comportó de manera no competitiva, ya que presentaba una disminución en el valor de unión máxima ($B_{\text{max}} = 120 \text{ fmol}/10^8$ plaq).

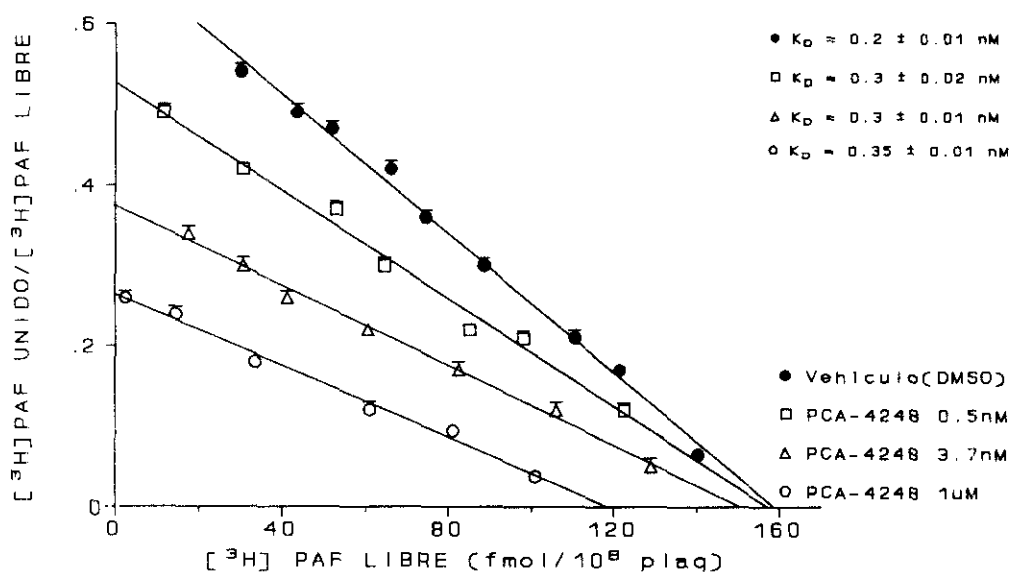


FIGURA 10. Representación de Scatchard para distintas concentraciones de PCA-4248 en plaquetas lavadas de conejo. Las plaquetas ajustadas se incubaron a $200.000/\mu\text{l}$ durante 30 minutos a temperatura ambiente junto con vehículo o PCA-4248 0.5nM, 3.7nM y $1\mu\text{M}$ y distintas concentraciones de $[^3\text{H}]$ PAF. Los valores representan la media \pm E.S. de 3 experimentos por triplicado.

La figura 11 muestra los resultados obtenidos en los experimentos de asociación y disociación de $[^3\text{H}]$ PAF en presencia de: DMSO (vehículo), PAF no marcado 3nM y PCA-4248

30nM y 1 μ M. La presencia del PCA-4248 en el medio provocó la disociación de [3 H] PAF de su receptor de manera dependiente del tiempo y de la concentración. Además, la curva de disociación de [3 H] PAF en presencia de PCA-4248 fue muy similar en forma a la que se detectaba en presencia de PAF sin marcar, pero completamente distinta a lo que ocurría en presencia del vehículo.

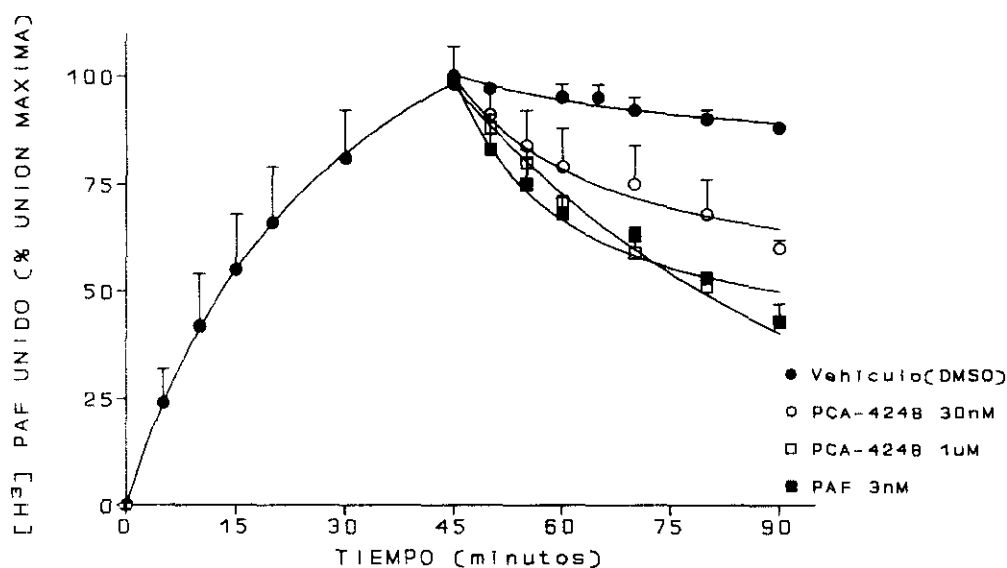


FIGURA 11. Curvas de asociación y disociación de [3 H] PAF en presencia de PCA-4248 y PAF no marcado en plaquetas de conejo. Las plaquetas, 200.000/ μ l, se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con distintas concentraciones [3 H] PAF. Cuando la saturación se hubo alcanzado, las plaquetas se incubaron durante el mismo tiempo pero en presencia de PAF no marcado vehículo, 3nM y PCA-4248 30nM y 1 μ M. Los datos son la media \pm E.S. de 3 experimentos por triplicado.

Los estudios de unión de [3 H] PAF a plaquetas lavadas de conejo se realizaron con una concentración de [3 H] PAF 0.2nM, valor próximo a la K_D , y distintas concentraciones de

PCA-4248. Los resultados obtenidos demostraban que el PCA-4248 era capaz de desplazar al PAF de su receptor de una manera dependiente de la concentración. La figura 12 muestra la curva de desplazamiento de [3 H] PAF por PCA-4248. El valor de IC_{50} y de K_i eran respectivamente 30 ± 4 nM y 14 ± 0.4 nM, lo que hace pensar en un antagonismo sobre el receptor.

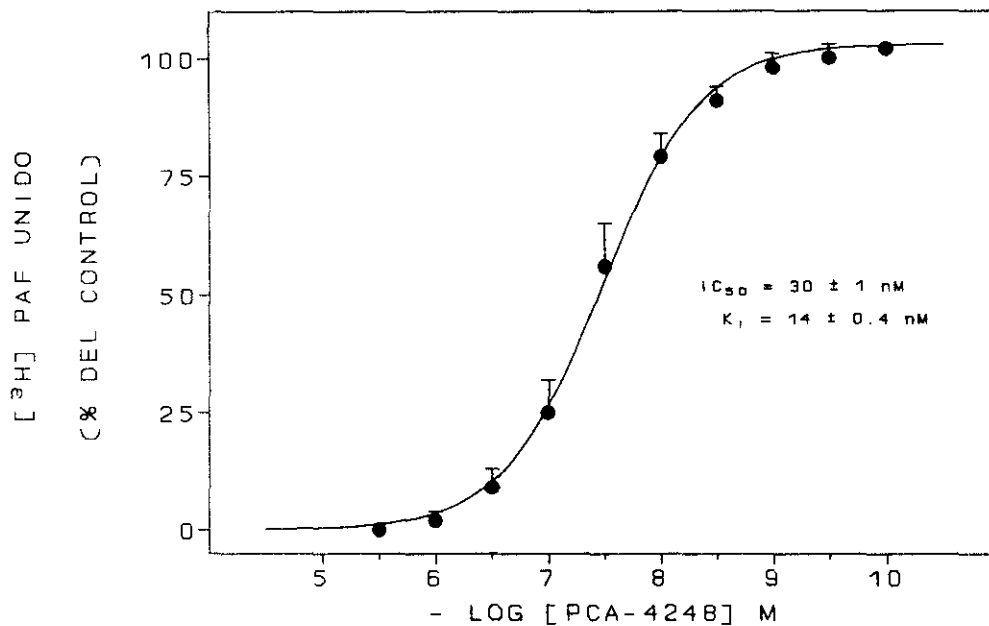


FIGURA 12. Curva de desplazamiento de [3 H] PAF por el PCA-4248 en plaquetas de conejo. El PCA-4248 y [3 H] PAF se añadieron simultáneamente a la suspensión de plaquetas, 200.000/ μ l, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Los datos representan la media \pm E.S. de 8 experimentos.

Por último, se realizaron experimentos de desplazamiento de [3 H] PAF por la Nitrendipina. Esta dihidropiridina fue incapaz de desplazar al PAF de su receptor a con-

centraciones menores de $10\mu\text{M}$ (Fig.13). Los valores de K_i y de IC_{50} fueron, respectivamente, $4.2 \pm 0.9\mu\text{M}$ y $24 \pm 5\mu\text{M}$. Los resultados obtenidos muestran el diferente comportamiento de ambos compuestos, aunque en la estructura de ambas drogas exista un núcleo de 1,4-dihidropiridina.

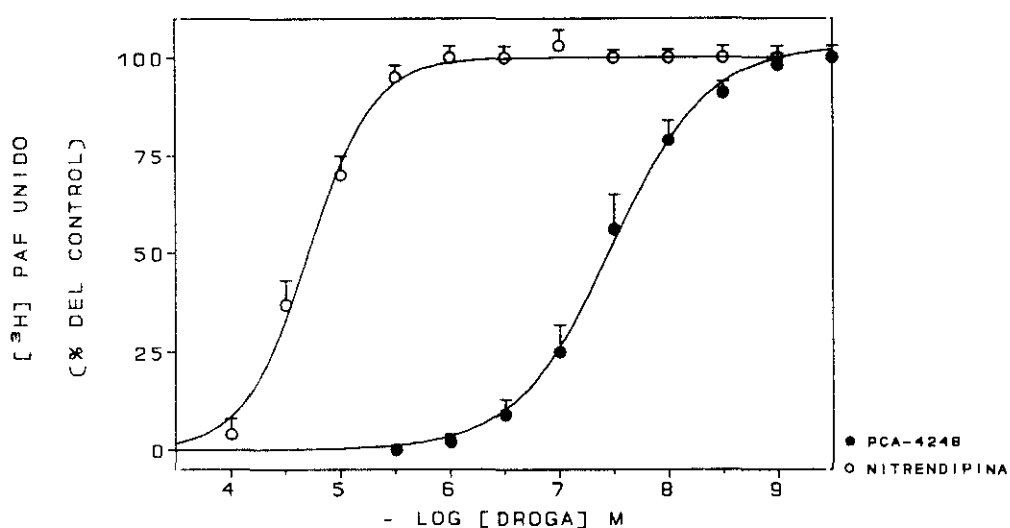


FIGURA 13. Comparación de los efectos de Nitrendipina y PCA-4248 sobre el receptor del PAF en plaquetas de conejo.

Las condiciones de los experimentos fueron idénticas a los de desplazamiento por el PCA-4248 (para nitrendipina $n = 6$).

2.2 INTERACCION DEL PCA-4248 SOBRE EL RECEPTOR DE PAF EN PLAQUETAS HUMANAS.

Los estudios en plaquetas humanas incluyeron:

- Experimentos de saturación de la unión de $[^3\text{H}]$ PAF, para el cálculo de K_D .
- Curvas de desplazamiento de $[^3\text{H}]$ PAF por PCA-4248.

Para los experimentos de saturación se obtuvo un valor de K_D igual al de plaquetas de conejo, $K_D = 0.23\text{nM}$. La curva de desplazamiento de $[^3\text{H}]$ PAF se llevó a cabo a una concentración próxima a la K_D . La figura 14 muestra la curva de desplazamiento

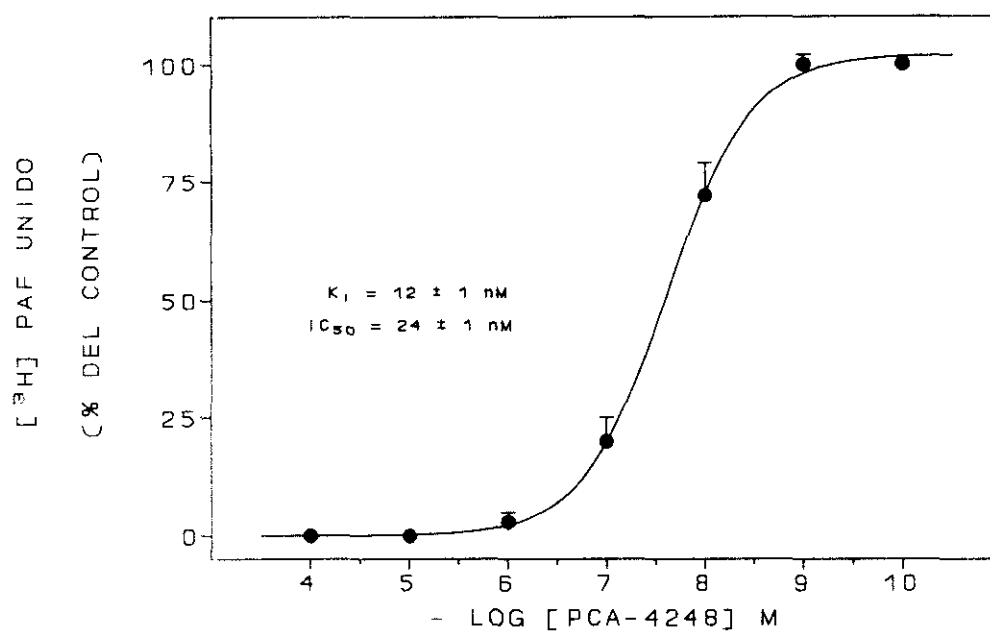


FIGURA 14. Curva de desplazamiento de $[^3\text{H}]$ PAF de su receptor en plaquetas humanas por el PCA-4248. El PCA-4248 se añadió junto a $[^3\text{H}]$ PAF a la suspensión de plaquetas, $200.000/\mu\text{l}$, se incubó 45 minutos a 37°C . Los valores son la media \pm E.S. de 6 experimentos.

obtenida para $[^3\text{H}]$ PAF cuando se incubaba en presencia de distintas concentraciones del PCA-4248. Como era de esperar, el compuesto fue capaz de desplazar al $[^3\text{H}]$ PAF de su receptor con un valor de $IC_{50} = 24 \pm 1\text{nM}$ y de $K_1 = 12 \pm 1\text{nM}$.

2.3 INTERACCION DEL PCA-4248 CON EL RECEPTOR DEL PAF EN PMNs DE CONEJO.

Los estudios de unión al receptor en PMNs de conejo se realizaron en condiciones parecidas a los de plaquetas de conejo. En primer lugar se hicieron estudios de saturación, para el cálculo de la K_D , y en segundo lugar se realizaron las curvas de desplazamiento

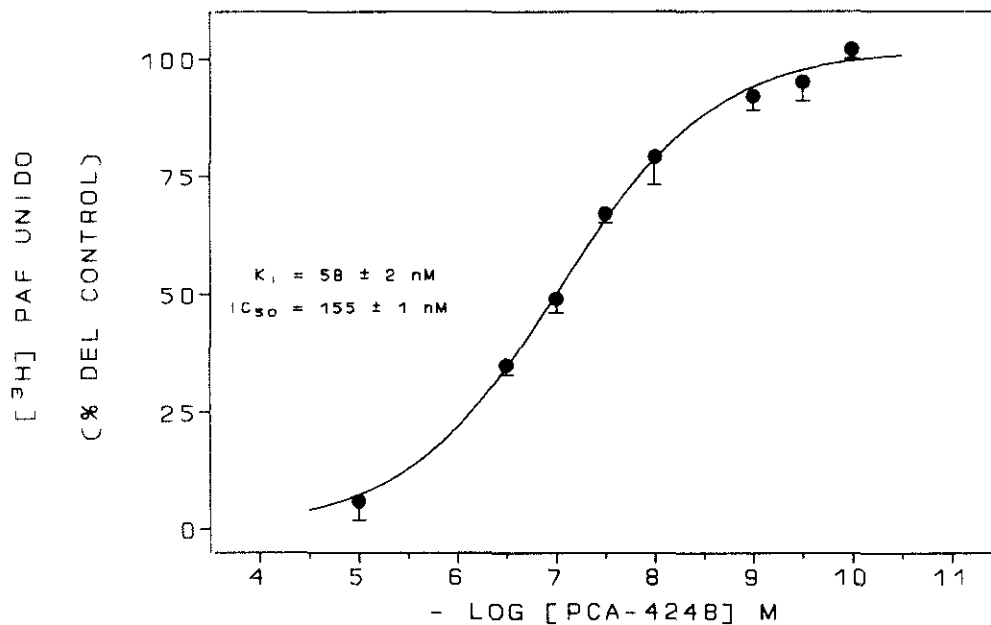


FIGURA 15. Curva de desplazamiento de [³H] PAF del receptor en PMNs de conejo por el PCA-4248. El PCA-4248 añadido al tiempo que [³H] PAF sobre la suspensión de células, 500.000/ μ l, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los valores representan la media \pm E.S. de 3 experimentos.

de [³H] PAF por el PCA-4248. La concentración de [³H] PAF utilizado en este caso fue 0.5nM, ya que el valor de K_D calculado en nuestras condiciones fue 0.66nM. En estas condiciones

se llevaron a cabo las curvas de desplazamiento de [^3H] PAF para distintas concentraciones del PCA-4248. La figura 15, muestra la curva de desplazamiento de [^3H] PAF por el PCA-4248. Los valores de K_i e IC_{50} fueron, respectivamente, $155 \pm 1\text{nM}$ y $58 \pm 2\text{nM}$.

2.4 INTERACCION DEL PCA-4248 SOBRE EL RECEPTOR DE PAF EN PMNs HUMANOS.

En el caso de PMNs humanos la concentración de [^3H] PAF utilizada fue 0.96nM , valor de la K_D en nuestras condiciones experimentales. La concentración de PAF marcado necesaria

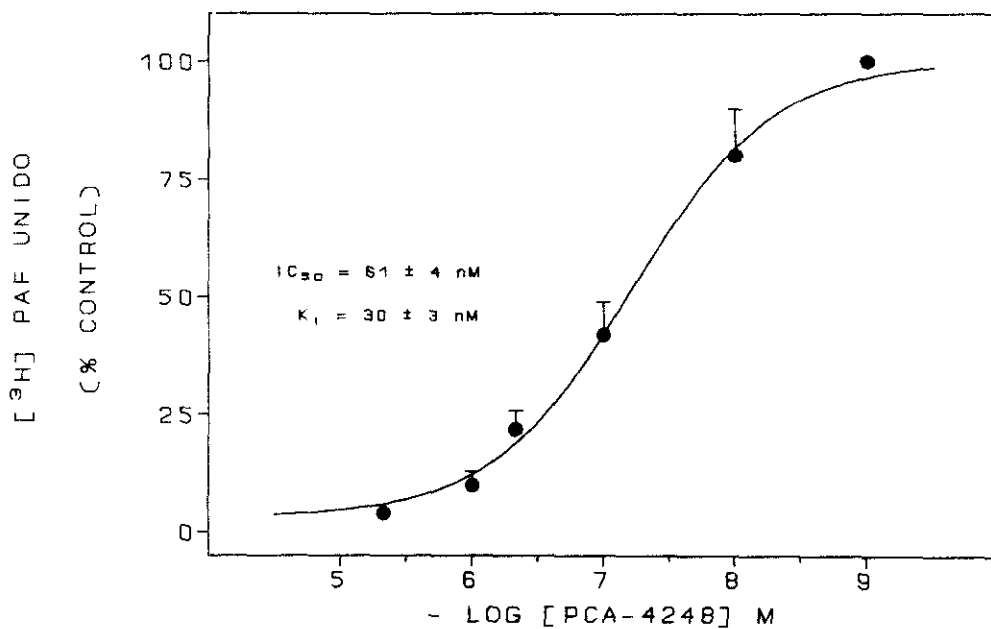


FIGURA 16. Curva de desplazamiento de [^3H] PAF en PMNs humanos por el PCA-4248. Las células ajustadas a $3.000/\mu\text{l}$, se incubaron durante 45 minutos a 37°C , en presencia de 0.96nM de [^3H] PAF y distintas concentraciones del PCA-4248. Los valores son la media \pm E.S. de 4 experimentos.

para llegar a la saturación fue mucho mayor en PMNs que en las plaquetas, pues los PMNs necesitan concentraciones mucho mayores de PAF que las plaquetas para responder a la estimulación. La curva de desplazamiento del [^3H] PAF de su receptor por el PCA-4248 se muestra en la figura 16. Los valores obtenidos de K_i e IC_{50} fueron respectivamente: $61 \pm 4\text{nM}$ y $30 \pm 3\text{nM}$.

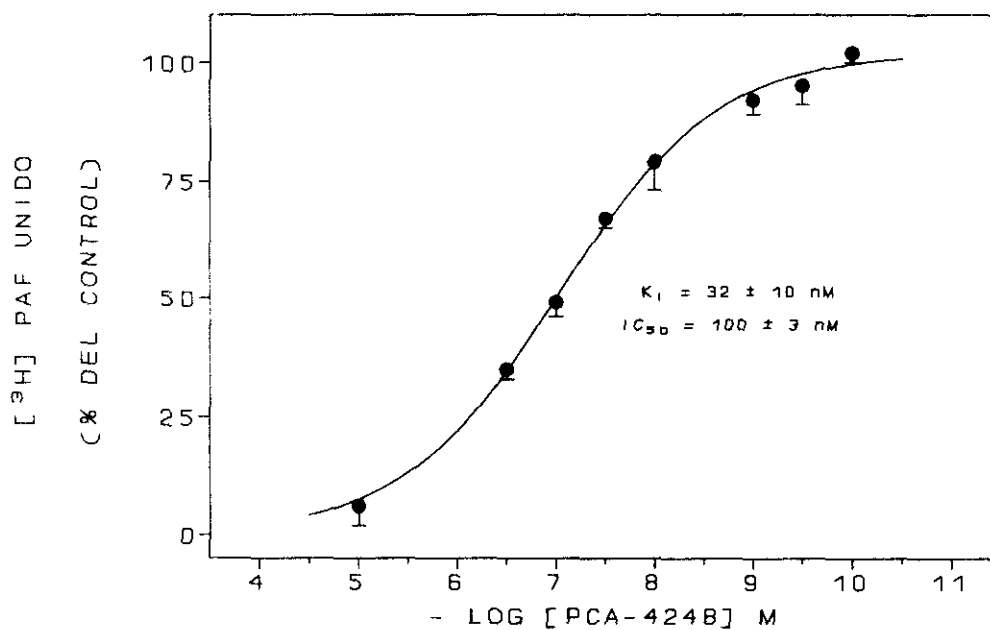


FIGURA 17. Curva de desplazamiento de [^3H] PAF por el PCA-4248 en macrófagos alveolares de cobaya. Los macrófagos, $3.000/\mu\text{l}$, se incubaron durante 1 hora con 0.42nM de [^3H] PAF y distintas concentraciones del PCA-4248. Los datos representados son la media \pm E.S. de 3 experimentos por triplicado.

2.5 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE EL RECEPTOR DE PAF EN MACROFAGOS ALVEOLARES DE COBAYA.

Se calculó el valor de la K_D para [^3H] PAF en el receptor de macrófagos alveolares de cobaya mediante experimentos de saturación. Los experimentos de desplazamiento de [^3H] PAF por el PCA-4248 se diseñaron de acuerdo con los valores obtenidos. La concentración de PAF marcado utilizada en este caso fue 0.4nM, valor próximo al de K_D calculada en nuestras condiciones: $K_D = 0.42 \pm 0.1\text{nM}$. La figura 17 muestra la curva de desplazamiento obtenida. Los valores de K_i e IC_{50} fueron $32 \pm 10\text{nM}$ y $100 \pm 3\text{nM}$.

3 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA ACTIVIDAD DE PAF EXOGENO IN VIVO.

Con el fin de establecer si la capacidad del PCA-4248 para antagonizar los efectos del PAF "in vitro" se producía también "in vivo"; se estudió el efecto del compuesto sobre la activación de las plaquetas de animales a los que se había administrado PCA-4248, y se hicieron experimentos para observar la acción del PCA-4248 sobre los efectos farmacológicos que provoca el PAF en el sistema cardiovascular. Los modelos que se utilizaron para probar la actividad del antagonista "in vivo" fueron los siguientes:

- Agregación "ex vivo" de plaquetas de conejo.
- Hipotensión y hemoconcentración inducida por inyecciones intravenosas de PAF en rata anestesiada.
- Muerte inducida por PAF en ratón.

3.1 AGREGACION "EX VIVO" DE PLAQUETAS DE CONEJOS TRATADOS CON PCA-4248.

Una manera de valorar la eficacia "in vivo" de un antagonista consiste en medir la respuesta de plaquetas obtenidas de la sangre de conejos que previamente hayan recibido una dosis del compuesto en estudio. Este tipo de experimentos se denomina estudio de la agregación "ex vivo". El PCA-4248 se administró por vía oral y se extrajeron muestras de sangre a distintos tiempos para la preparación de las plaquetas filtradas. La figura 18 muestra los resultados obtenidos con una concentración de PAF 3nM. A los 15 minutos de la

administración del fármaco, las plaquetas mostraban una pequeña inhibición, con respecto a la agregación inducida por la misma concentración de PAF antes de la administración. Esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. El efecto del compuesto es más intenso media hora después, y alcanza el máximo efecto una hora después de la administración. A partir de este momento, se mantuvo estable hasta 2 horas después y desapareció 4 horas más tarde, por lo que se puede afirmar que el PCA-4248 muestra una absorción rápida tras la administración por vía oral y una apreciable duración de efecto.

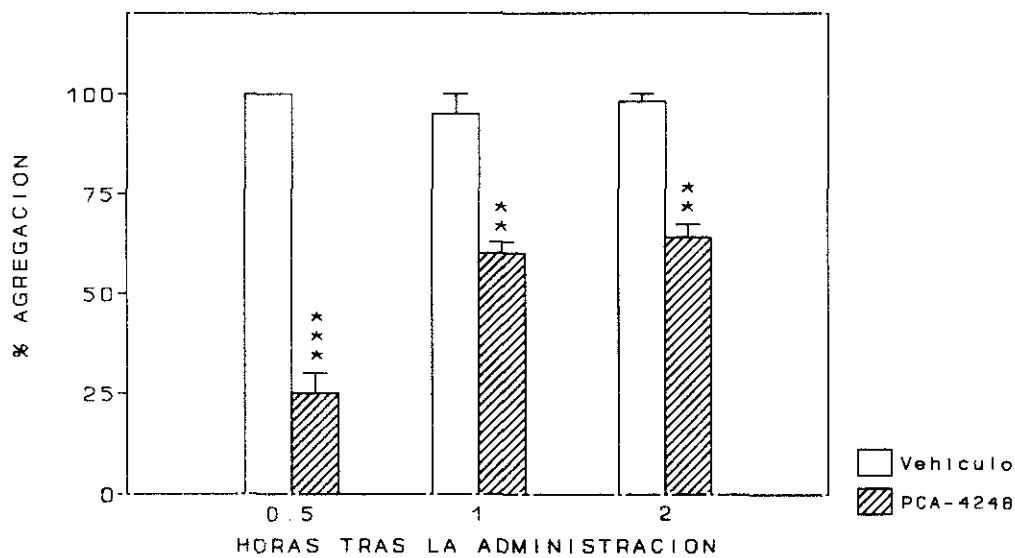


FIGURA 18. Agregación "ex vivo" de PRP de conejo inducida por PAF. El PCA-4248 10mg/Kg, se administró por vía oral a los conejos. Se extrajeron las plaquetas y se agregaron a distintos tiempos después de la administración con PAF 3nM. los datos son la media \pm E.S. de 4 experimentos. La significación estadística: ** $P(t) < 0.01$ y *** $P(t) < 0.001$.

3.2 EFECTO SOBRE LA HIPOTENSION Y LA HEMOCONCENTRACION INDUCIDA POR PAF EN RATA ANESTESIADA.

Los estudios llevados a cabo fueron:

- Curva dosis-respuesta de PAF frente a la hipotensión sistémica.
- Se valoró el efecto protector del PCA-4248 y su capacidad para revertir la hipotensión y la hemoconcentración inducida por PAF.

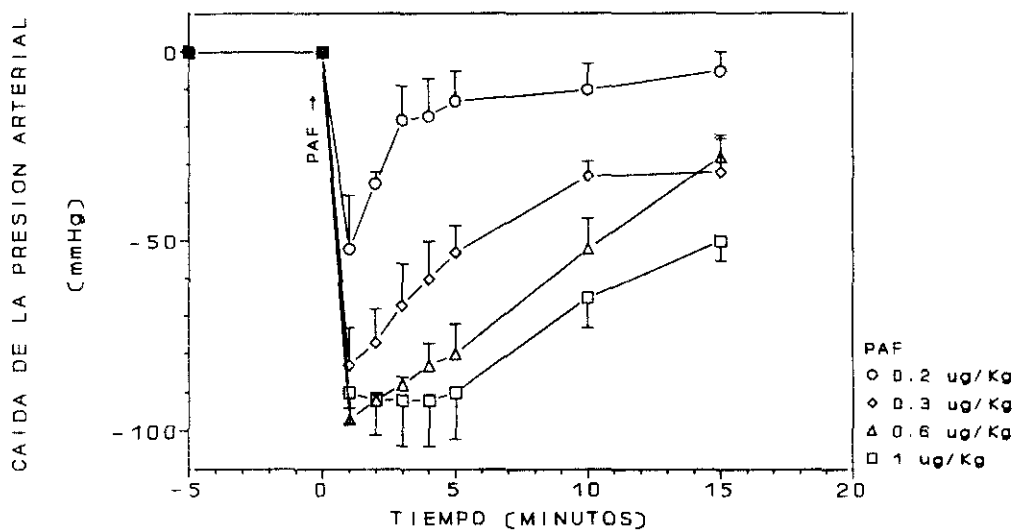


FIGURA 19. Curva dosis-respuesta de hipotensión inducida por PAF en rata. PAF se administró por vía intravenosa a las dosis indicadas en la gráfica. Los valores representados son la media \pm E.S. de 4 experimentos.

La figura 19 muestra la hipotensión producida por dosis de PAF de 0.2, 0.33, 0.66 y 1 µg/Kg. A la vista de estos resultados se escogió la dosis de 0.33 µg/kg para los siguientes

experimentos, puesto que esta concentración provoca una caída inicial de la tensión arterial prácticamente idéntica a la obtenida con concentraciones superiores, que además es reversible.

La figura 20 muestra el efecto protector del PCA-4248 sobre la hipotensión inducida por 0.33 μ g/Kg de PAF. El PCA-4248 0.3mg/Kg se administró por vía intravenosa, cinco minutos antes de la inyección de PAF. En todos los casos se observó protección por el fármaco, con una menor caída de tensión y una recuperación de los valores iniciales a los 5 minutos, mientras que los animales tratados con el vehículo presentaban todavía una reducción del 50% sobre el valor basal.

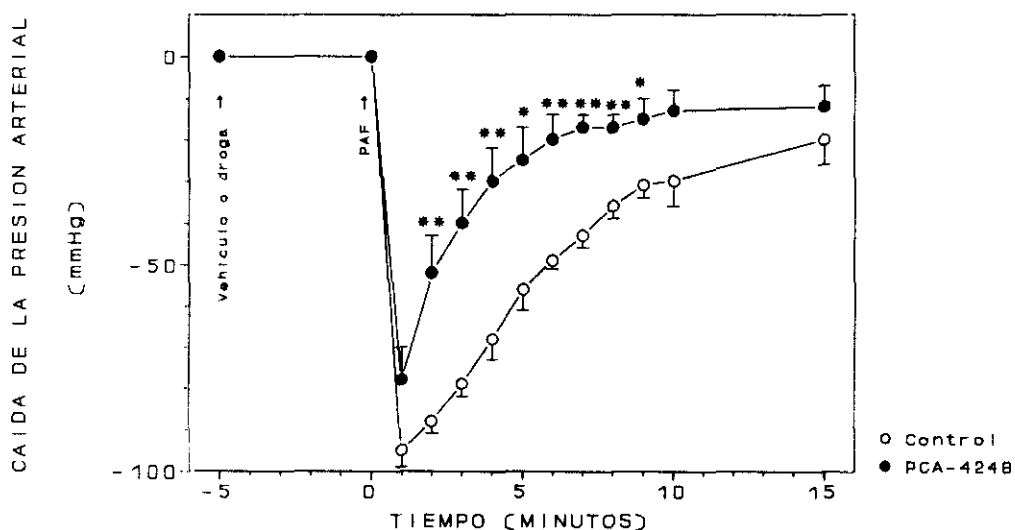


FIGURA 20. Protección del PCA-4248 sobre la hipotensión en rata inducida por PAF. El PCA-4248, 0.3mg/Kg, se administra por vía intravenosa 5 minutos antes de la administración intravenosa de PAF 0.33 μ g/Kg. Los datos representados son la media \pm E.S. para 6 experimentos. La significación estadística : * indica $P(t) < 0.05$ y ** $P(t) < 0.01$.

Con objeto de ver si el PCA-4248 era capaz de revertir la hipotensión inducida por el PAF, el PCA-4248 se administró por vía intravenosa cuando la hipotensión inducida por el PAF era máxima, lo que ocurre 1-2 minutos después de la inyección. En la figura 21 se aprecia la diferencia entre los animales control y los que recibieron el compuesto. Se observó que en los animales tratados con PCA-4248, la caída de la tensión se había reducido al 50% del valor de partida a los 2 minutos de la inyección, mientras que las ratas que recibieron el vehículo seguían presentando una reducción del 80%

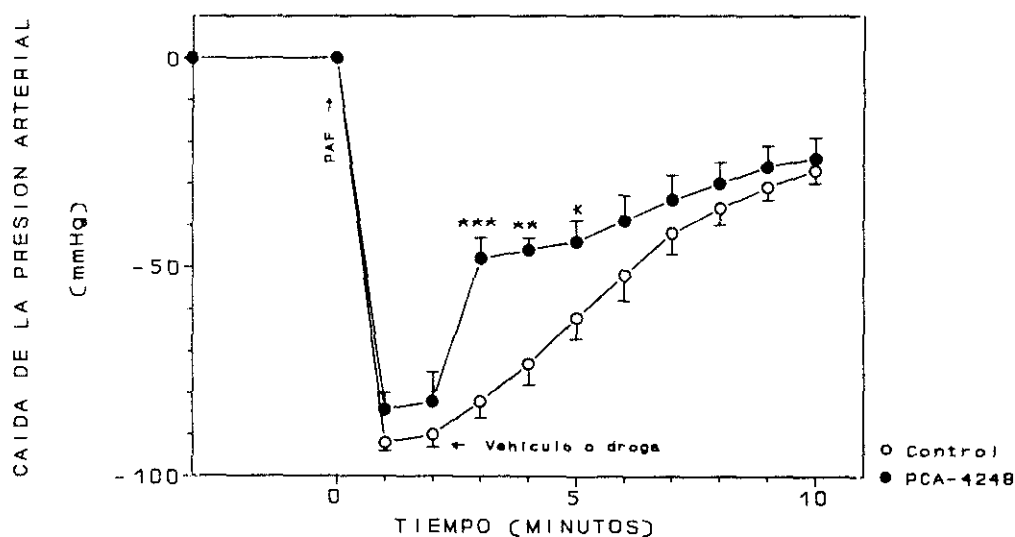


FIGURA 21. Efecto del PCA-4248 sobre la reversibilidad de la hipotensión inducida por PAF en rata. El PCA-4248, 0.3mg/Kg, se administró por vía intravenosa 2 minutos después de la inyección intravenosa de PAF 0.33ug/Kg. Los datos son la media \pm E.S. de 8 experimentos. La significación estadística se expresa como: * para $P(t) < 0.05$, ** $P(t) < 0.01$ y *** $P(t) < 0.001$.

En la figura 22 se representan los resultados obtenidos cuando el PCA-4248 se administró por vía oral a la dosis de 30mg/kg, una hora antes de la administración intravenosa

de PAF $0.5\mu\text{g/Kg}$. Se observa que el PCA-4248 inhibe parcialmente el efecto hipotensor del PAF. El máximo de efecto se observó a los 2 minutos de la inyección del agonista, cuando ocurre la caída máxima de presión, siendo de un 35% del valor basal para PCA-4248 y de un 80% para el control.

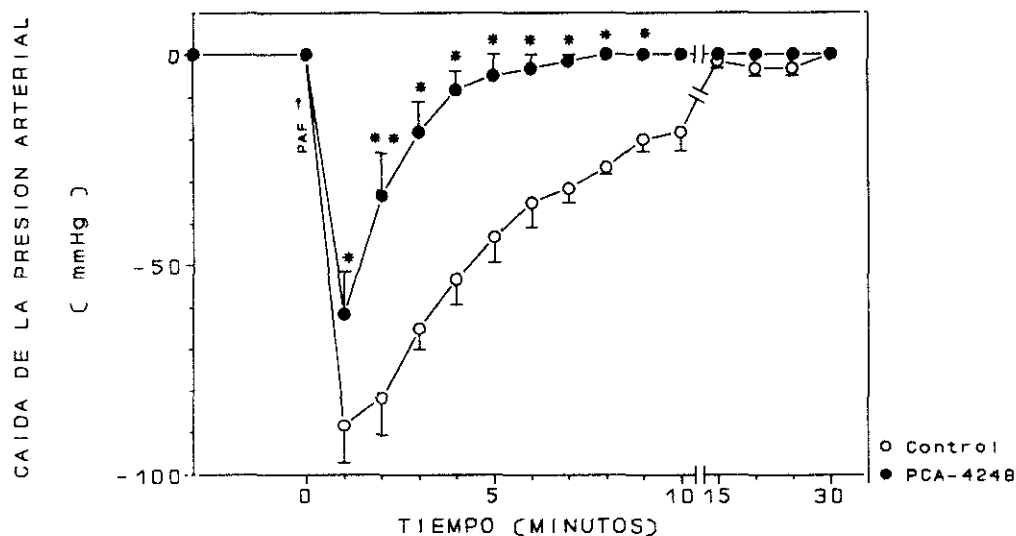


FIGURA 22. Efecto del PCA-4248, por vía oral, sobre la hipotensión inducida por PAF en rats. PCA-4248, 30mg/Kg , se administró por vía oral una hora antes de la administración intravenosa de PAF($0.5\mu\text{g/Kg}$). Los valores son la media \pm E.S. de 5 experimentos. Para $n = 5$. * $P(t) < 0.05$ y ** $P(t) < 0.01$.

El PAF se administró a la dosis de $0.66\mu\text{g/Kg}$ para estudiar el efecto del PCA-4248 sobre la hemoconcentración inducida por PAF. El PCA-4248 se administró por vía intravenosa a la dosis de 1mg/kg , simultáneamente con el PAF. A los 5 minutos, del comienzo de la infusión de PAF, se recogieron muestras de sangre en las que se midió el valor HMTc. En

la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos. Los animales tratados con el compuesto presentaron un valor de HMTc normal, mientras que en los controles, que recibieron solamente el vehículo, se apreció un aumento significativo de este valor.

	<u>Valores de HMTc</u>
No tratados	48 ± 3 %
PAF + Vehículo	58 ± 6 % (+)
PAF + PCA-4248	49 ± 3 % (*)

*TABLA 3. Medida del aumento de los valores de hematocrito inducido por PAF en ratas. n = 40 para animales no tratados y tratados con PAF y n = 6 para animales tratados con el PCA-4248. La significación estadística de los resultados obtenidos para los animales tratados con PAF con respecto a los administrados con vehículo se señala como (+) significa $P(t) < 0.05$ y * para los animales tratados con PAF y vehículo con respecto a animales administrados con PCA-4248, para $P(t) < 0.05$.*

3.3 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA MORTALIDAD EN RATON INDUCIDA POR PAF.

Se realizaron los siguientes estudios:

- Curva dosis-respuesta de mortalidad en ratón inducida por PAF.
- Efecto de distintas dosis de PCA-4248 sobre la mortalidad inducida por PAF en ratón.

Como se muestra en la Tabla 4, la dosis de 80 μ g/Kg provoca la muerte del 80% de los animales (ED₈₀).

	<u>% Mortalidad (1 hora después).</u>
Control	0
PAF 50 ug/Kg	43
PAF 60 ug/Kg	68
PAF 80 ug/Kg	77
PAF 90 ug/Kg	85
PAF 100 ug/Kg	100

TABLA 4. Curva dosis-respuesta de mortalidad en ratón inducida por PAF. PAF a las dosis indicadas en la tabla se inyectó por vía intravenosa. La mortalidad se registró una hora después de la administración de PAF (n = 30).

Quando se administró el PCA-4248 a las dosis de 10 y 30mg/Kg por vía oral, distintos tiempos antes de la administración intravenosa de PAF, 80 μ g/Kg, se observó una protección de la mortalidad que se representa en la figura 23. Con PCA-4248, 10mg/Kg, el efecto era considerable a los 5 minutos y se mantenía durante una hora. Para la dosis de 30mg/Kg, el efecto fue máximo a los 5 minutos de la administración. Sin embargo, una hora después el efecto había disminuído apreciablemente.

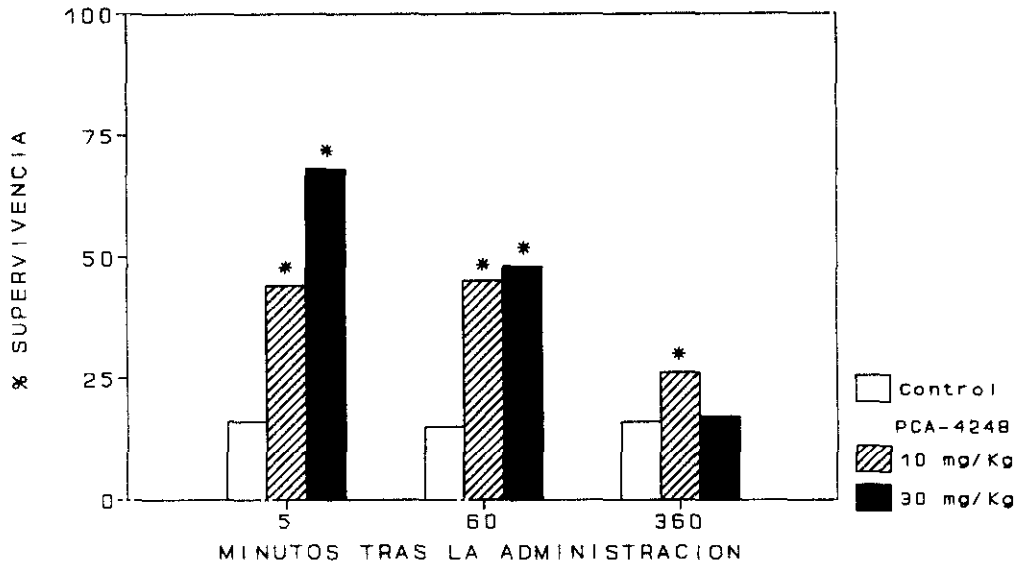


FIGURA 23. Efecto del PCA-4248 sobre la mortalidad inducida por PAF en ratón. PCA-4248, 10 y 30 mg/Kg se administró, por vía oral, a los tiempos indicados previos a la administración intravenosa de PAF (n= 30). La significación estadística esta representada por * para $P(X^2) < 0.05$.

4 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA ACTIVIDAD DE PAF ENDOGENO IN VITRO.

El propósito de este apartado es investigar el efecto que ejercen TNF y LPS a través de la producción de PAF en macrófagos alveolares y la influencia que el PCA-4248 pueda tener sobre las células pre-estimuladas con estas sustancias. Todos los experimentos se llevaron a cabo en macrófagos alveolares de cobaya y la medida de la activación consistió en la cuantificación de la producción de anión superóxido en las distintas condiciones:

- Estimulación por PAF, LPS, TNF y fMLP, en ausencia de cualquier pre-estímulo.
- Producción de PAF tras la estimulación por LPS y TNF.
- Activación de LPS y posterior estimulación con TNF, PAF y fMLP.
- Activación TNF y posterior estimulación por PAF y fMLP.
- Activación por PAF y posterior efecto sobre la estimulación por TNF y fMLP.
- Estudios de unión al receptor de PAF en macrófagos pre-estimulados por TNF y LPS.

4.1 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO INDUCIDA POR PAF, TNF, LPS Y fMLP.

Se observó que la producción de anión superóxido en respuesta a PAF y fMLP era mucho mayor que cuando las células se activan con LPS y TNF. La producción de anión superóxido inducida por PAF (2nM) fue cinco veces superior a la inducida por fMLP (1nM) y cincuenta veces mayor que la inducida por LPS (2µg/ml) y TNF (10U/ml). Como se puede

observar en la figura 24, la respuesta a PAF y fMLP era inmediata tras la adición del agonista, mientras que con TNF y LPS el tiempo de respuesta variaba entre 30 y 60 minutos.

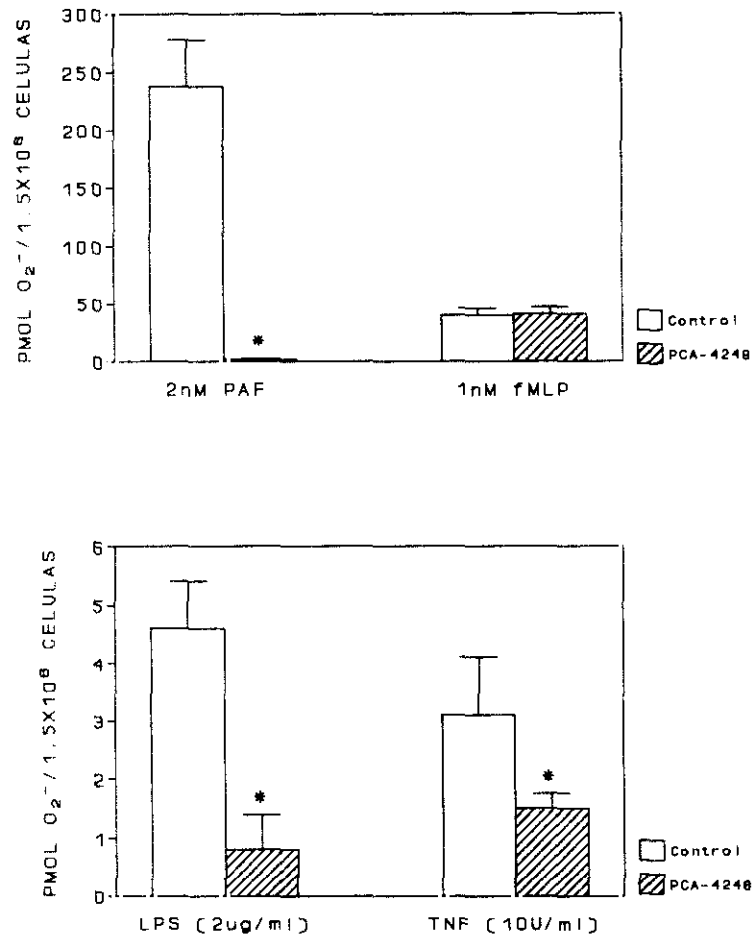


FIGURA 24. Producción de O_2^- por macrófagos alveolares de cobaya estimulados por PAF, fMLP, LPS y TNF. Las células se estimularon con PAF 2nM, fMLP 1nM, LPS 2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y TNF 10U/ml en presencia de PCA-4248 100nM o el vehículo adecuado. El PCA-4248 mostró diferencias significativas * para $P(t) < 0.05$. Los datos son la media \pm E.S. de 4 experimentos por duplicado.

El PCA-4248, 100nM, suprimió la producción de O_2^- inducida por PAF y anuló casi totalmente la inducida por LPS, mientras que sólo fue capaz de reducir en un 50% la producción de O_2^- en respuesta a TNF y no modificó la producción inducida por fMLP (Fig.24).

4.2 PRODUCCION DE PAF INDUCIDA POR LPS Y TNF EN MACROFAGOS.

En algunos experimentos se midió la producción de PAF en las células estimuladas por LPS y TNF. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 5. Se observó que la producción de PAF en células estimuladas por TNF era pequeña y que éste permanecía asociado a las células. En el caso de LPS, la producción de PAF era más elevada. La mayor parte del PAF sintetizado aparecía asociada a células, aunque pudieron medirse concentraciones apreciables en los sobrenadantes.

	<u>PAF (pmol/1.5x10⁶ células)</u>	
	Células	Sobrenadante
No tratadas	< 0.02	< 0.02
LPS (2µg/ml)	0.53 ± 0.14	0.15 ± 0.02
TNF (10U/ml)	0.05 ± 0.02	< 0.02

TABLA 5. Síntesis de PAF en macrófagos alveolares estimulados por LPS y TNF. Las condiciones del experimento son LPS 2µg/Kg y TNF 10U/ml. Se realizó en un número muy limitado de experimentos por lo que no se encontró diferencia estadísticamente significativa

4.3 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO INDUCIDA POR PAF, TNF Y fMLP EN MACROFAGOS ACTIVADOS POR LPS.

Las concentraciones de los agonistas fueron idénticas a las del experimento anterior. En estos experimentos las células se incubaron durante 30-45 minutos en presencia de LPS

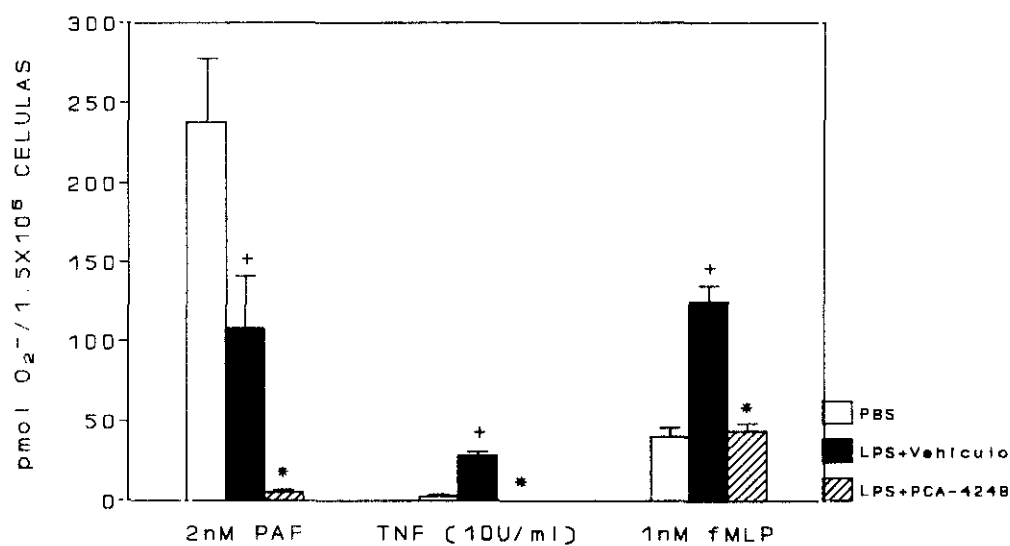


FIGURA 25. Efecto del PCA-4248 sobre la producción de O_2^- en macrófagos activados por LPS. Las células se pre-incubaron durante 30-45 minutos con LPS 2 μ g/Kg y después se estimularon con PAF 2nM, TNF 10U/ml o fMLP 1nM, en presencia del PCA-4248 100nM o del vehículo adecuado. Los valores representados son la media \pm E.S. de 4 experimentos por duplicado. La significación estadística esta representada por * $P(t) < 0.05$ para células en presencia de PCA-4248 comparadas con las células control y + para $P(t) < 0.05$ para las células control activadas con respecto a células no activadas.

a la dosis de 2µg/ml, posteriormente se estimularon con los otros agonistas. La figura 25, muestra que cuando los macrófagos alveolares se pre-estimularon con LPS, aumentó la producción de O_2^- en respuesta a fMLP y TNF. Mientras que la producción de anión superóxido disminuyó a la mitad cuando la activación se llevó a cabo con PAF. El PCA-4248 suprimió totalmente la producción de O_2^- por PAF y TNF, aunque en el caso del fMLP sólo fue capaz de disminuirlo hasta niveles equivalentes a los que presentaban las células sin activar.

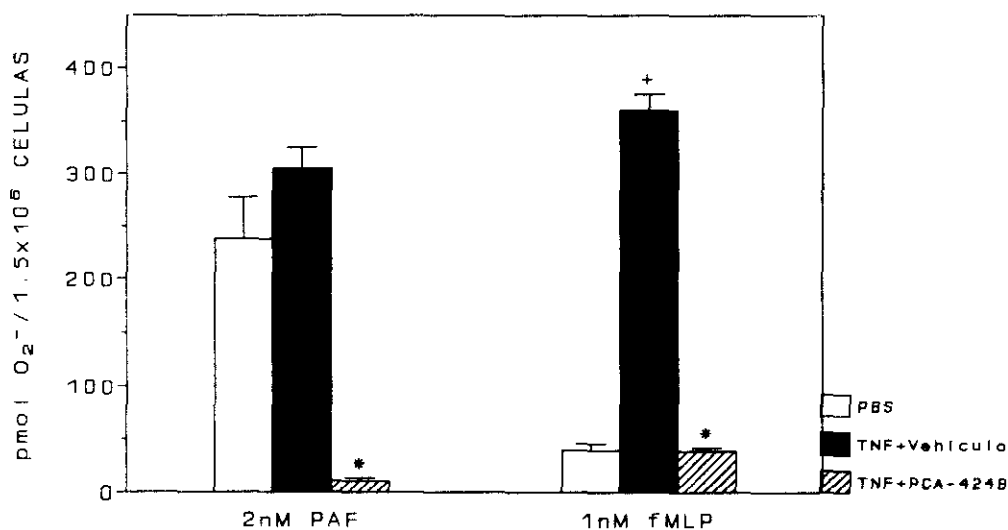


FIGURA 26. Efecto del PCA-4248 sobre la producción de O_2^- en macrófagos activados por TNF. Las células se incubaron con TNF 10U/ml durante 30 minutos y después se estimularon con PAF 2nM o fMLP 1nM, en presencia de PCA-4248 100nM o el vehículo adecuado. Los datos son la media \pm E.S. de 4 experimentos por duplicado. La significación estadística esta representada por * $P(t) < 0.05$ para células control con respecto a las tratadas con PCA-4248 y + $P(t) < 0.05$ para células activadas con respecto a células sin activar.

4.4 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO POR PAF Y fMLP EN MACROFAGOS ACTIVADOS POR TNF.

Las células se incubaron durante 30-45 minutos con TNF 10U/ml, y posteriormente se añadieron el PAF o el fMLP. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia y ausencia del PCA-4248. La figura 26 muestra los resultados obtenidos. Se observó que existía un aumento moderado de la producción de O_2^- en respuesta a PAF, mientras que con fMLP el aumento era mucho más prominente.

El PCA-4248 suprimió totalmente la producción de O_2^- en respuesta al PAF, mientras que en el caso de fMLP, lo suprimía solamente hasta niveles aproximados a los que correspondían a las células no pre-incubadas con TNF (Fig.26).

4.5 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO POR LPS, TNF Y fMLP EN MACROFAGOS ACTIVADOS POR PAF.

Los experimentos fueron idénticos a los descritos anteriormente, pero en este caso la pre-activación de las células se realizó con PAF 2nM durante 30-45 minutos. En la figura 27 se aprecia también, que al pre-estimular las células con PAF existía un aumento moderado de la producción de O_2^- por LPS, TNF y fMLP. En los dos primeros casos, el PCA-4248 suprimió totalmente la producción de O_2^- , mientras que cuando se utilizó fMLP sólo fue capaz de suprimir la respuesta atribuible a la preincubación con PAF.

Una consecuencia de estos experimentos fue que la preincubación de los macrófagos con PAF acorta de 45 a 5 minutos el tiempo necesario para que se produzca respuesta al TNF. Los registros de un experimento típico están representados en la figura 28.

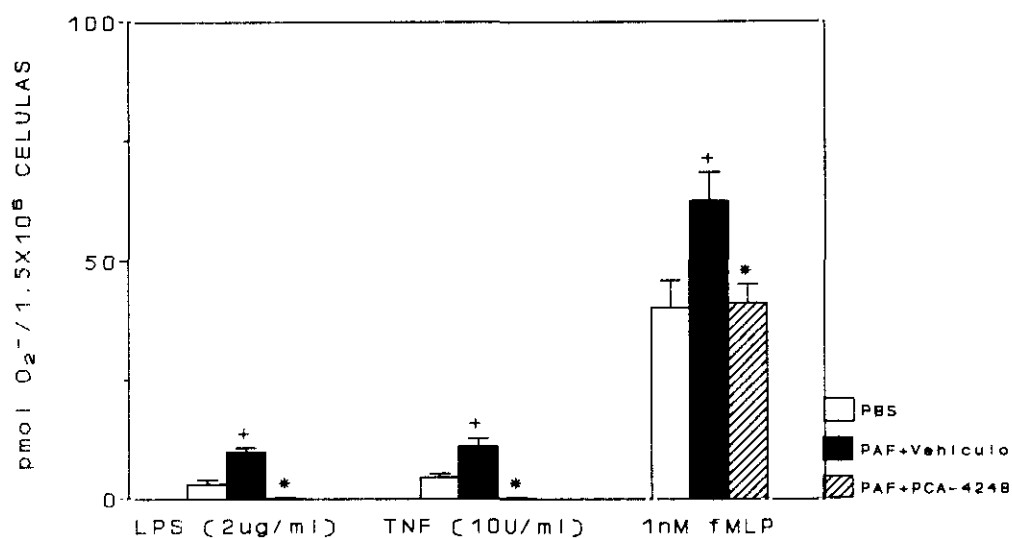


FIGURA 27. Efecto del PCA-4248 sobre la pre-estimulación por PAF en macrófagos. PAF 2nM se pre-incubó durante 30 minutos con las células, que luego se estimularon con LPS 2µg/Kg, TNF 10 U/ml y fMLP 1nM, en ausencia o presencia del PCA-4248. Los resultados son la media ± E.S. de 4 experimentos por duplicado. La significación estadística está expresada como * para $P(t) < 0.05$ de células control frente a PCA-4248, + para $P(t) < 0.05$ para células pre-estimuladas frente a no pre-estimuladas.

La figura 29 muestra el efecto del PCA-4248 sobre el acortamiento del tiempo de respuesta de las células cuando se activan con PAF y, posteriormente, se estimulan con TNF. El fármaco suprimió la producción de O_2^- en respuesta a PAF y TNF, mientras que un antagonista típico del receptor del PAF, el compuesto de clave WEB 2086, sólo modificó el efecto, debido a la pre-incubación con PAF sin modificar la respuesta del TNF.

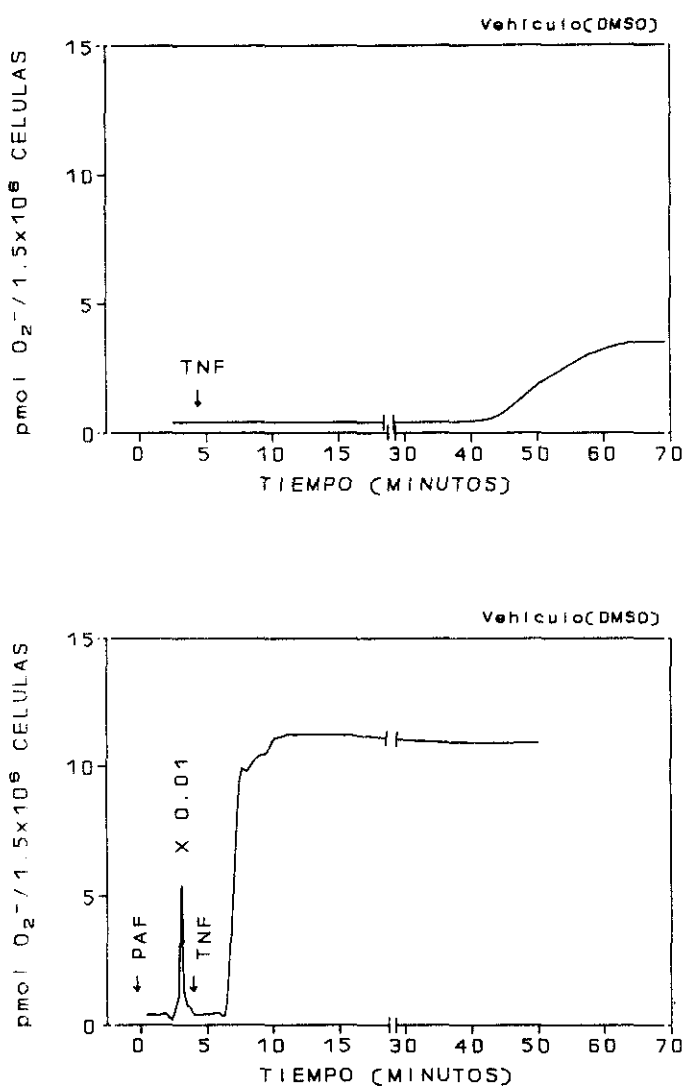


FIGURA 28. Cinética de producción de O₂⁻ en macrófagos pre-estimulados por PAF. Los macrófagos se estimularon directamente con TNF 10U/ml (panel de arriba) o se pre-incubaron por PAF 2nM antes de la activación por TNF (panel de abajo). La grafica corresponde a un experimento representativo.

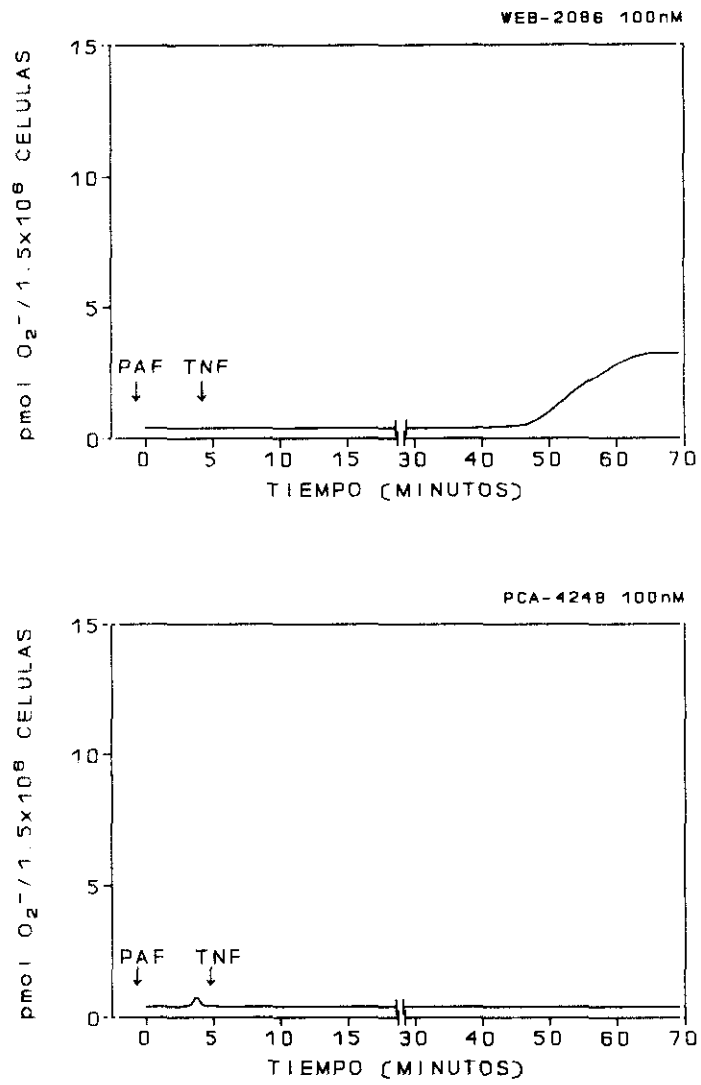


FIGURA 29. Efecto de PCA-4248 sobre la cinética de producción de O_2^- sobre macrófagos pre-estimulados por PAF. Los macrófagos se pre-incubaron por PAF 2nM antes de la incubación con TNF (10U/ml) en presencia de PCA-4248 100nM (panel inferior) o WEB 2086 100nM (panel superior).

4.6 EFECTO DE TNF Y LPS SOBRE LA UNIÓN DE PAF A SU RECEPTOR EN MACROFAGOS ALVEOLARES. EFECTO DEL PCA-4248

El papel que el TNF y LPS pueden jugar sobre la regulación de los niveles de PAF y sobre su liberación por las células, podría estar relacionado con la regulación de su receptor. Por esta razón se estudió el efecto que ambos juegan sobre la interacción PAF-receptor y la acción que el PCA-4248 puede ejercer sobre estas interacciones.

	K_D (nM)	Bmax (fmol/1.5x10 ⁶ cel)
PAF	0.5	100
PAF + LPS	1.2	167
PAF + TNF	1.3	155

TABLA 6. Efecto de la activación por LPS y TNF sobre la unión del PAF a su receptor en macrófagos alveolares de cobaya.

Se llevaron a cabo estudios de saturación de la unión por [³H] PAF en macrófagos no estimulados y en células que habían sido activadas con 10U/ml de TNF, o 100ng/ml de LPS, antes de la adición del [³H] PAF. Los valores de K_D y Bmax obtenidos para los tres casos se recogen en la tabla 6.

Los resultados obtenidos de los experimentos de saturación se muestran en la figura 30, donde se muestra que TNF y LPS disminuyen la afinidad del [³H] PAF por su receptor y aumentan los valores de K_D y de Bmax.

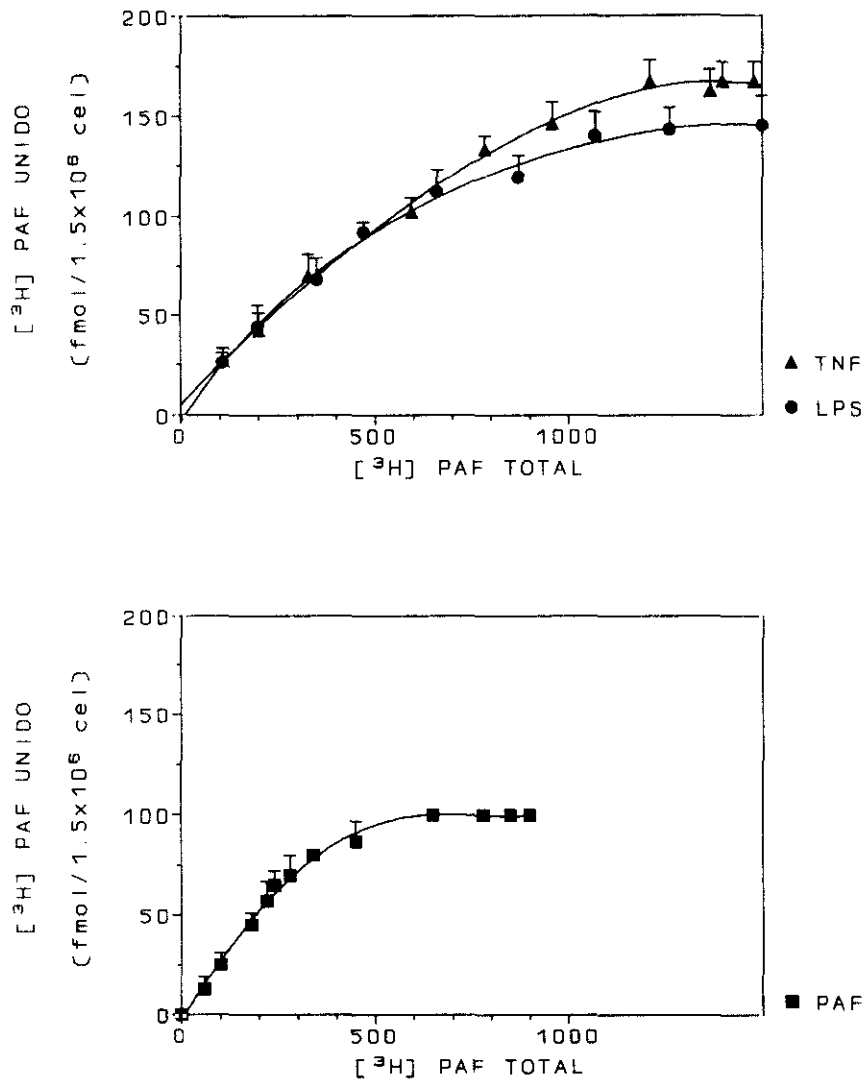


FIGURA 30. Unión específica de [³H] PAF a su receptor en macrófagos alveolares de cobaya. Los macrófagos se incubaron en presencia de TNF 10U/ml(15 minutos) o LPS 100ng/ml(2 horas)(panel superior) o en presencia de vehículo (panel inferior), antes de la adición de distintas concentraciones de [³H] PAF. Los resultados son la media ± E.S. de 3 experimentos por duplicado.

Posteriormente, se estudió el efecto del PCA-4248 sobre la unión de [3 H] PAF a su receptor de macrófagos nativos y pre-incubados con TNF y LPS. Los resultados están reflejados en la figura 31, donde se muestran las curvas de desplazamiento del PCA-4248.

Los valores de K_i obtenidos fueron 49 ± 5 nM para PAF + TNF, 40 ± 10 nM para PAF + LPS y 32 ± 10 nM para células nativas.

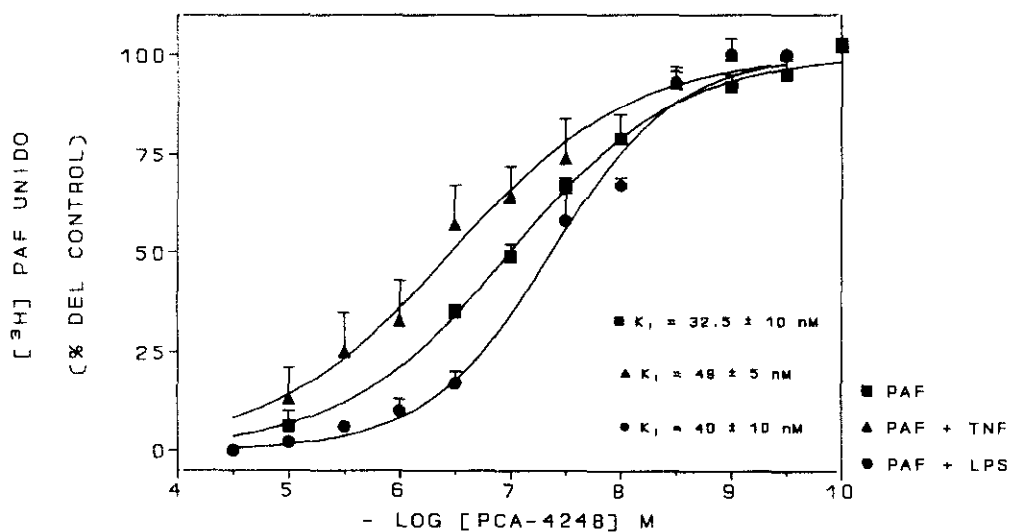


FIGURA 31. Curvas de desplazamiento de [3 H] PAF por el PCA-4248 en macrófagos alveolares de cobaya. Las células se pre-incubaron en presencia de vehículo, TNF 10U/ml o LPS 100ng/ml durante 15 minutos para el segundo y 2 horas para el tercero, tras lo cual se añadió el PCA-4248. Los resultados son la media \pm E.S. de 3 experimentos por duplicado.

5 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PAF ENDOGENO IN VIVO.

El objetivo de los experimentos descritos en este apartado es estudiar la capacidad del PCA-4248 para atenuar o inhibir los efectos causados por la endotoxina bacteriana "in vivo".

Se estudió:

- El efecto del PCA-4248 sobre la hipotensión, la trombocitopenia y la leucopenia inducida por endotoxina bacteriana (LPS) en rata.
- El efecto sobre la muerte en ratón inducida por LPS.

5.1 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA HIPOTENSION EN RATA INDUCIDA POR LPS.

Las inyecciones intravenosas de LPS provocan la caída de la presión arterial en rata, pero a diferencia de la hipotensión inducida por PAF, esta caída es lenta y se mantiene durante más de una hora. En este modelo se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- Curva dosis-respuesta de hipotensión inducida por LPS en rata.
- Protección ejercida por el PCA-4248 frente a la hipotensión inducida por LPS.
- Capacidad del PCA-4248 para revertir la hipotensión instaurada por LPS.

Los resultados obtenidos al estudiar la hipotensión inducida por endotoxina se representan en forma de curvas dosis-respuesta en la figura 32. Se probaron tres dosis de endotoxina: 5, 7.5 y 15 mg/Kg. El análisis del perfil temporal de la caída de la presión arterial muestra que

es lenta, progresa a lo largo de una hora, y es irreversible. La dosis escogida para llevar a cabo los restantes experimentos fue de 7.5mg/Kg, por ser la dosis que causa una caída importante de la tensión arterial, sin llegar a ser letal como ocurre con las dosis mayores.

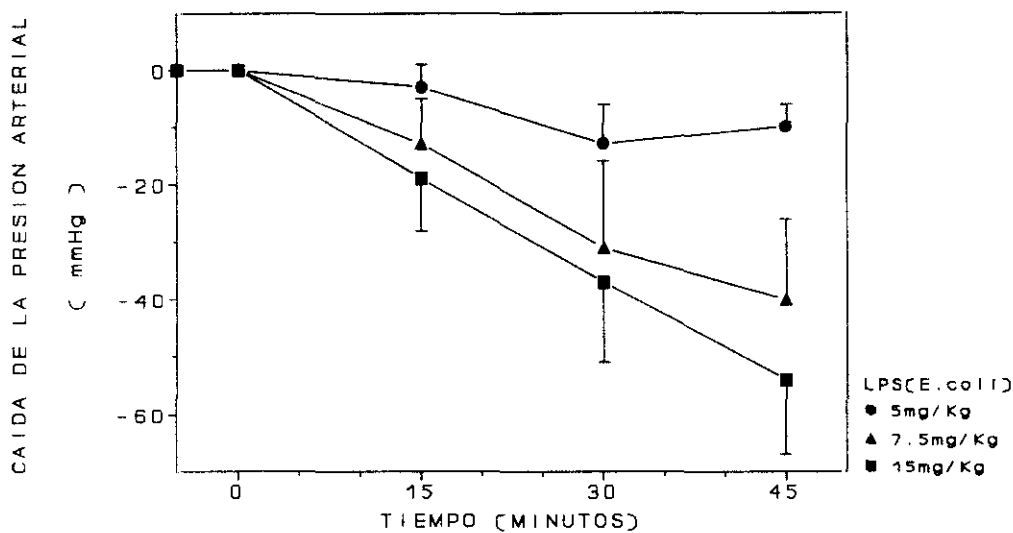


FIGURA 32. Curva dosis-respuesta de hipotensión inducida por LPS en rata. LPS de *E. coli* 0111B4 se administró, por vía intravenosa, a los animales a tres dosis distintas 5, 7.5 y 15 mg/Kg. Los resultados representan la media \pm E.S. de 6 experimentos.

El PCA-4248 administrado por vía intravenosa a la dosis de 1mg/kg, cinco minutos antes de la inyección intravenosa de 7.5 mg/Kg de LPS, previene parcialmente el efecto hipotensor de la endotoxina, aunque las diferencias respecto a los grupos control no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando se administró a la dosis de 2mg/Kg, las diferencias sí alcanzan significación estadística. El efecto máximo se observó a partir de 30 minutos después de la administración intravenosa de LPS y se mantuvo hasta 60 minutos.

Los resultados se muestran en la figura 33.

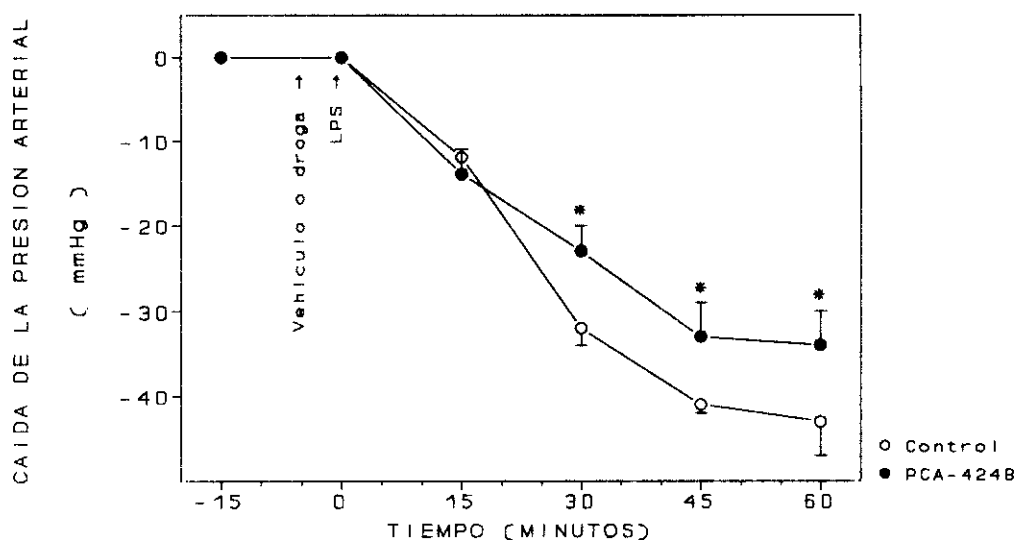


FIGURA 33. Efecto protector del PCA-4248 sobre la hipotensión inducida por LPS en rata. PCA-4248 2mg/Kg se administró por vía intravenosa 5 minutos antes de la administración intravenosa de LPS 7.5mg/Kg. Los datos son la media \pm E.S. de 8 experimentos. La significación estadística se expresa como: * para $P(t) < 0.05$.

Con objeto de estudiar la capacidad del PCA-4248 para revertir la hipotensión, EL pca-4248 se inyectó a la dosis de 1mg/kg por vía intravenosa en el momento en el que la caída de tensión fue máxima, es decir entre 15 y 30 minutos de la administración. Se observó que en los dos primeros minutos había una recuperación casi total de la tensión, aunque posteriormente se producía una ligera caída. Los resultados están representados en la figura 34.

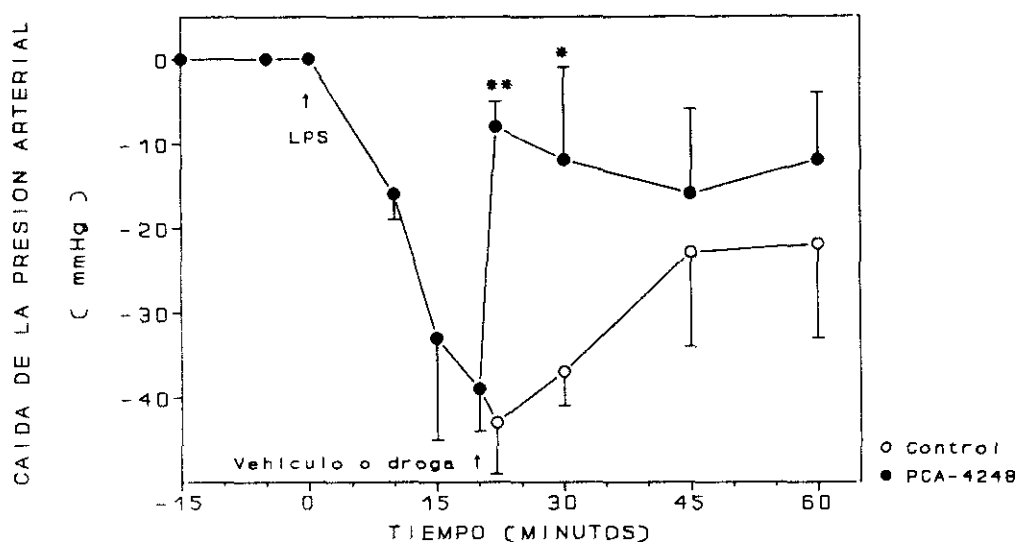


FIGURA 34. Capacidad del PCA-4248 para revertir la hipotensión inducida por LPS en rata. LPS 7.5mg/Kg se administró por vía intravenosa y a los 20 minutos, cuando la caída de la tensión era máxima, se administró por vía intravenosa el PCA-4248 1mg/Kg. Los resultados son la media \pm E.S. de 6 experimentos. La significación estadística está señalada como: * para $P(t) < 0.05$ y ** para $P(t) < 0.01$.

Para estudiar la eficacia del compuesto administrado por vía oral, se administraron 20mg/Kg del PCA-4248 una hora antes de la inyección intravenosa de 7.5mg/kg de LPS. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 35. Se observó que el PCA-4248 previene la caída de la tensión inducida por LPS, y que las diferencias son estadísticamente significativas a los 15 y 30 minutos de la administración de LPS.

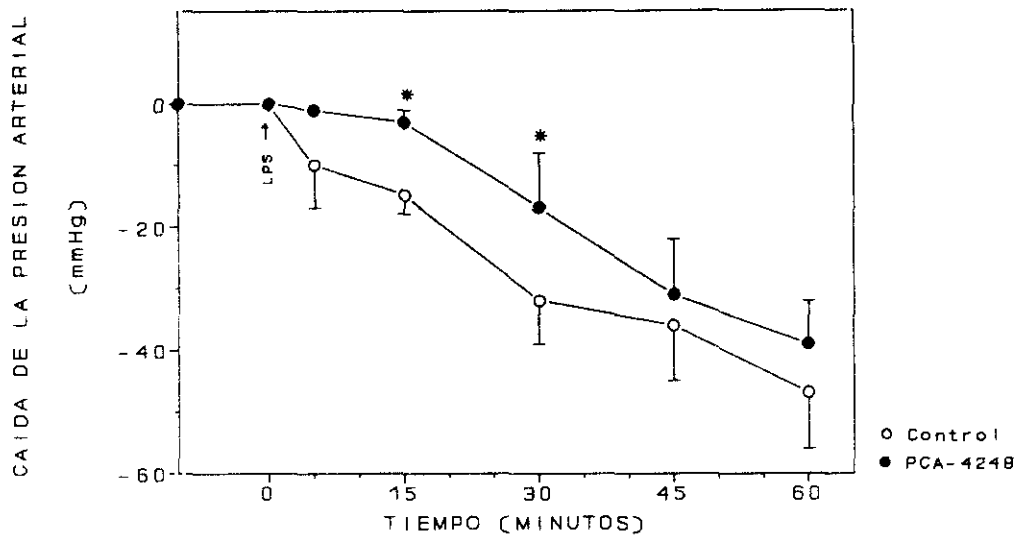


FIGURA 35. Eficacia de acción del PCA-4248 sobre la hipotensión inducida por LPS en rata. PCA-4248 20mg/Kg, se administró, por vía oral, una hora antes de la inyección intravenosa de LPS 7.5mg/Kg. Los datos representan la media \pm E. S. de 6 experimentos. La significación estadística fue: * para $P(t) < 0.05$.

5.2 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA LEUCOPENIA Y TROMBOCITOPENIA EN RATA INDUCIDA POR LPS.

Las condiciones fueron idénticas a las de los experimentos de hipotensión. El PCA-4248, a la dosis de 1mg/Kg, se administró por vía intravenosa 5 minutos antes de la endotoxina. Las muestras de sangre se extrajeron antes de la administración de LPS y 15, 30, 45 y 60 minutos después. Los valores de los recuentos de leucocitos y plaquetas previos

a la endotoxina se tomaron como 100%. Como se observa en la figura 36, LPS provocó un disminución del número de leucocitos y plaquetas circulantes que fue máxima a los 15 minutos después de la administración intravenosa de LPS. El PCA-4248 previno totalmente de la caída tanto de leucocitos como de plaquetas (Fig.36).

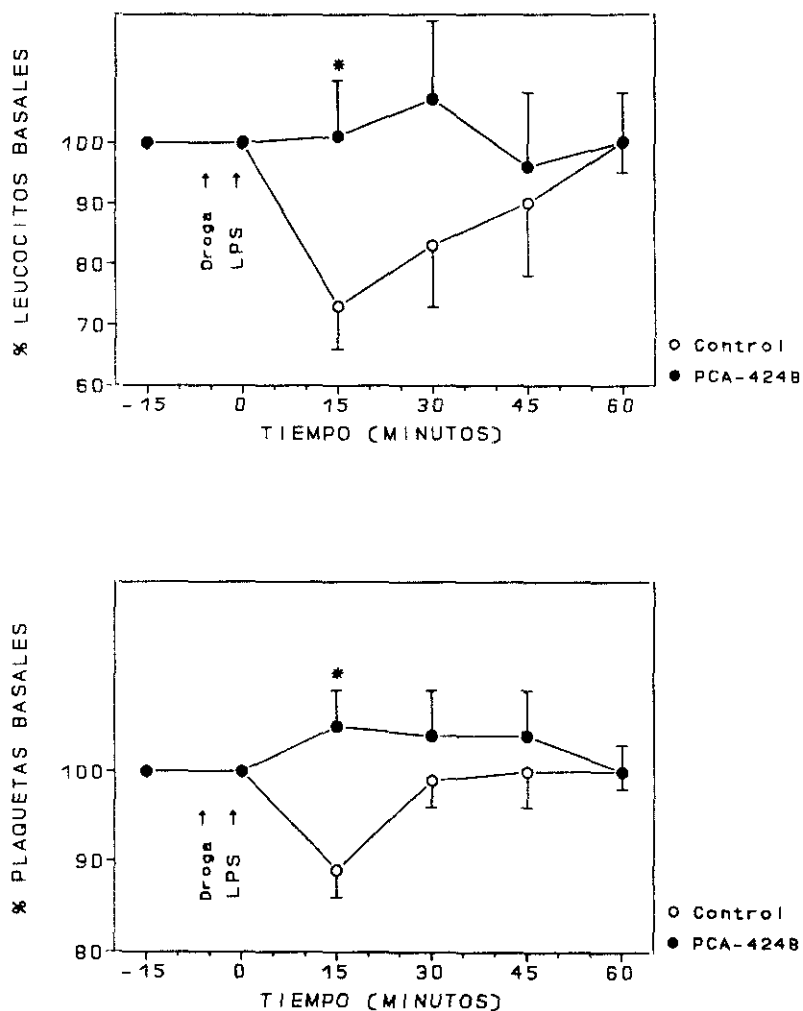


FIGURA 36. Efecto del PCA-4248 sobre la trombocitopenia y la leucopenia inducida por LPS. PCA-4248 1mg/Kg se administró, por vía intravenosa, 5 minutos antes de la administración intravenosa de LPS, 7.5mg/Kg. El panel superior representa los resultados obtenidos para los recuentos de leucocitos y el inferior los obtenidos para plaquetas. Los resultados son la media ± E.S. de 9 experimentos. La significación estadística se representa por: * para P(t) < 0.05.

5.3 EFECTO DEL PCA-4248 SOBRE LA MORTALIDAD EN RATON INDUCIDA POR LPS.

Aunque la inyección intravenosa de LPS, al igual que la infusión de PAF, pueden provocar la muerte de los animales de experimentación, la mortalidad inducida por endotoxina se diferencia de la mortalidad inducida por PAF en el patrón temporal. La mortalidad inducida por PAF se produce en la primera hora tras la inyección del agonista, mientras que LPS presenta un máximo de mortalidad a las 24-48 horas y va disminuyendo hasta los 5-7 días. Por esta razón la mortalidad se registró hasta 7 días después de la inyección intravenosa de LPS.

Se realizaron los siguientes experimentos:

- Cálculo de la dosis letal 80% (LD_{80}) para LPS.
- Efecto del PCA-4248 sobre la mortalidad inducida por LPS.

	<u>% Mortalidad (a los 7 días)</u>
LPS 5mg/Kg	17
LPS 7.5mg/Kg	84
LPS 8.5mg/Kg	95
LPS 12.5mg/Kg	100

TABLA 7. Curva dosis-respuesta de mortalidad inducida por LPS en ratón. LPS 5, 7.5, 8.5 y 12.5 mg/Kg se administró, por vía intravenosa, a los animales. La mortalidad se registró durante 7 días. (n = 30, excepto para la dosis de 7.5mg/Kg, n = 60).

En primer lugar se hicieron curvas dosis-respuesta de LPS (de E. coli 0111B4). Se utilizaron 5, 7.5, 8.5 y 12.5 mg/Kg de LPS, administrada por vía intravenosa. Los resultados reflejados en la tabla 7, muestran la mortalidad a los 7 días de la administración. A la vista de estos resultados se escogió como dosis efectiva 80% (ED_{80}) 7.5mg/Kg.

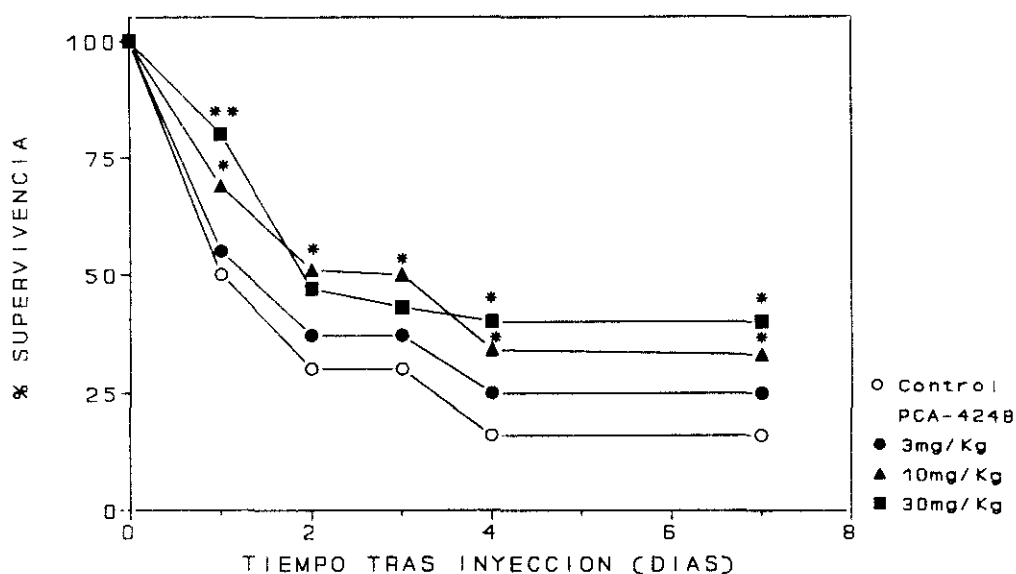


FIGURA 37. Efecto del PCA-4248 sobre la mortalidad inducida por LPS en ratón. El PCA-4248 3, 10 y 30mg/Kg se administró, por vía oral, 5 horas antes de la administración intravenosa de LPS 7.5mg/Kg y una hora antes. La mortalidad se registró durante 7 días. (n = 60, para cada grupo). La significación estadística esta representada por: * para $P(\chi^2) < 0.05$ y ** para $P(\chi^2) < 0.01$.

Con el fin de valorar el efecto del PCA-4248 sobre la mortalidad inducida por LPS, se administraron 3, 10 y 30 mg/Kg del compuesto por vía oral, cinco horas antes y, por segunda vez, una hora antes de la administración intravenosa de LPS 7.5 mg/Kg. Como se

aprecia en la figura 36, el PCA-4248 mostró un efecto protector frente a la mortalidad inducida por LPS, que fue máximo a las 24 horas. PCA-4248 redujo la mortalidad total a los 7 días del 85% (para el control) a 75% con la dosis de 3mg/Kg, al 52% con 10mg/Kg y al 45% con 30mg/Kg.

IV DISCUSSION

Durante los últimos años se ha demostrado que el PAF, junto con varios otros mediadores, está directamente implicado en la etiología de una gran variedad de situaciones patológicas y se ha anticipado que el desarrollo de antagonistas de su receptor potentes y específicos pueden contribuir a un nuevo enfoque terapéutico para enfermedades tales como el asma o el shock séptico^{131,132}. Este tipo de compuestos han demostrado ser, además, una valiosa herramienta experimental, gracias a la que se ha podido definir la participación real del PAF en la patofisiología de varias enfermedades.

Entre estos compuestos se encuentra el PCA-4248, un nuevo compuesto con actividad antagonista del receptor del PAF seleccionado en el desarrollo de un programa de estudio de compuestos de nueva síntesis con actividad antagonista frente al PAF. Los laboratorios ALTER se interesaron por la actividad que presentaban una serie de 4-alkil-1,4-dihidropiridinas, con una función tioéter unida al carboxilato de la posición 3 del anillo piridínico a través de un puente alquilénico, que poseían una potente actividad inhibitoria de la agregación de plaquetas inducida por PAF mientras que no modificaban la respuesta de las plaquetas a otros agonistas¹³³.

El PCA-4248 ha demostrado ser un potente antagonista del receptor del PAF, específico y competitivo capaz de inhibir los efectos del PAF en varias situaciones tanto "in vitro"¹³⁴ como "in vivo"¹³⁵.

Este compuesto compite con el [³H] PAF por su sitio de unión a plaquetas humanas y de conejo con una K_i en el rango nanomolar, del mismo orden de magnitud que varios otros antagonistas del PAF previamente descritos¹³⁶.

Aunque la utilización de preparaciones de células intactas parece ser la más adecuada para la interacción ligando-receptor, en el caso concreto del PAF existen una serie de

problemas que ha sido necesario tener en cuenta a la hora de plantear los experimentos de caracterización de la unión del PCA-4248 al receptor del PAF en plaquetas, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares.

Se ha descrito que, el PAF puede activar a estas células sufriendo internalización o degradación a metabolitos inactivos como el liso-PAF¹³⁷ o puede ser incorporado a los fosfolípidos de la cubierta exterior del plasmalema^{137,138}. Debido a estos hechos muchas publicaciones sobre estudios de unión al receptor, realizados con distintos antagonistas, así como con diversas especies de PAF (C₁₆, C₁₈) se caracterizan por valores muy altos de unión inespecífica (del orden de un 50% de la unión total). Nosotros hemos modificado las condiciones de los ensayos previamente descritos utilizando plaquetas suspendidas en un medio con baja concentración de Ca²⁺ (0.2mM), suficiente para mantener la integridad de la membrana plasmática y la funcionalidad del receptor, pero insuficiente para provocar la activación de las células por las concentraciones de PAF utilizadas en nuestros experimentos.

Así mismo, las incubaciones se han realizado a temperatura ambiente, por espacios de tiempo inferiores a 60 minutos, para impedir la internalización y el metabolismo del PAF¹³⁹. En estas condiciones la unión inespecífica se redujo a un 25 ± 5% de la unión total y la unión del [³H] PAF a su receptor en los tres tipos de células estudiados resultó completamente reversible.

Las determinaciones de la constante de afinidad y del número de receptores varían grandemente de un investigador a otro incluso cuando se comparan experimentos realizados en el mismo tejido, la misma especie y bajo condiciones similares. Así la constante de disociación del equilibrio (K_D) para [³H] PAF en plaquetas de conejo varía desde 0.5¹³⁸ a 3.62nM¹⁴⁰ con capacidades máximas de unión que oscilan entre 259¹⁴⁰ y 19.386²³ sitios de unión por plaqueta.

En nuestros experimentos obtuvimos un valor de K_D de 0.2nM y un número máximo de 940 sitios de unión por plaqueta. Estos valores se justifican, además de por las condiciones

del ensayo, por la utilización como ligando marcado el enantiómero L del PAF(1-C₁₆), que es la molécula del PAF con mayor afinidad y especificidad por el receptor, en lugar de formas racémicas LD o mezclas de distintas especies químicas (PAF-C₁₆ + PAF-C₁₈) que han sido los más utilizados en los estudios de unión al receptor antes mencionados.

Los experimentos iniciales de la modulación de la respuesta celular frente a PAF por el PCA-4248 fueron útiles para sugerir su actividad antagonista de PAF. Sin embargo, su capacidad para inhibir algunas de las actividades de este autacoide, podría no deberse necesariamente al antagonismo del receptor y estar relacionada con pasos intermedios implicados en los procesos estudiados. Por tanto, los estudios de unión al receptor, utilizando [³H] PAF como radioligando marcado, son imprescindibles para caracterizar la actividad del fármaco a nivel del receptor. Los datos presentados en esta tesis sugieren una competición directa del PCA-4248 por el receptor del PAF, ya que las representaciones de Schild para la unión de [³H] PAF a plaquetas de conejo obtenidos de la realización del análisis de Scatchard nos mostraron valores de la pendiente muy próximos a la unidad (-0.92 ± 0.12 para $n = 10$). El compuesto inhibió la unión específica del [³H] PAF a su receptor en plaquetas de conejo y humanas con unas IC₅₀ de 30 y 24nM, (K_i = 14 y 12nM) respectivamente. Esta inhibición fue completamente reversible en presencia de concentraciones elevadas (1μM) de PAF no marcado.

La comparación entre los resultados de los experimentos de unión del PAF al receptor y de agregación de plaquetas inducida por PAF mostraron una buena correlación entre la potencia exhibida por el PCA-4248 en los estudios de unión al receptor IC₅₀ = 30nM y los estudios funcionales, IC₅₀ = 300nM respectivamente, para unas concentraciones de agonista de 0.2 y 1.9nM.

La correlación no es tan buena en el caso de las agregaciones realizadas en P.R.P. debido probablemente a la unión tanto del PAF como del PCA-4248 a las proteínas del plasma.

Los estudios en leucocitos polimorfonucleares humanos y de conejo, mostraron un valor

de K_i muy parecido en ambos casos 61 y 58nM sugiriendo la existencia de un mismo receptor en los PMNs de ambas especies, tal como sucedía en plaquetas.

La diferencia de afinidad por el receptor de plaquetas y de PMNs ha sido descrita también para otros antagonistas del PAF¹²⁵. Lo mismo sucede cuando estudiamos la afinidad del PCA-4248 en el receptor de macrófagos residentes de pulmón de cobaya ($K_i = 32\text{nM}$). Este hecho apoya las sugerencias de Hwang¹⁴¹ y otros autores¹⁴², de que debe haber, al menos, dos tipos de receptores para el PAF.

Otra posible explicación sería la existencia en ciertos tipos de células, de receptores intracelulares para el PAF, que actuaría como un mediador intracelular. Apoyan estas hipótesis la internalización del PAF en algunos tipos de células con la consiguiente imposibilidad de desplazar totalmente al agonista de estos receptores intracelulares y la disminución de la potencia aparente de los antagonistas. De hecho, nosotros hemos comprobado que en el caso de activación de macrófagos alveolares por distintos estímulos, LPS, TNF, etc. existe una producción de PAF, que en su mayor parte no es liberado al medio extracelular sino que permanece asociado a las células.

La actividad anti-PAF del PCA-4248 se mantuvo cuando el compuesto se administró por vía intravenosa u oral, a animales de experimentación. El compuesto bloqueó la mayor parte de los efectos del PAF en conejo, rata, ratón y protegió a estos últimos de la letalidad de la inyección intravenosa de endotoxina bacteriana. Además, los experimentos "in vivo" y "ex vivo" demostraron una rápida absorción y una prolongada duración del efecto del PCA-4248.

Los efectos hipotensores y la letalidad del PAF han sido descritos en varias especies,^{24,143,144} y se cree que son mediados vía receptor¹⁴⁵. La capacidad del PCA-4248, así como de otros antagonistas del PAF¹⁴⁶, para inhibir y revertir la hipotensión inducida por PAF y para proteger de la letalidad producida por la administración intravenosa de PAF, apoyan la hipótesis de que la hipotensión y el shock están mediados por receptores. En varios modelos

experimentales "in vivo", el PCA-4248 se comportó como un potente inhibidor de los efectos del PAF. El mecanismo de acción más probable, en estos casos parece ser el de antagonismo por el receptor, pero no podemos excluir otras actividades farmacológicas de tipo anti-inflamatorio.

En la rata, el PCA-4248 se mostró más activo frente a la hipotensión inducida por PAF, cuando se inyectó por vía intravenosa que cuando se administró por vía oral. Este hecho puede reflejar, bien una limitada absorción del compuesto o bien la existencia de catabolismo activo del PCA-4248.

Nuestros resultados demuestran que el PCA-4248 es capaz de antagonizar igualmente los efectos del PAF generado de forma endógena, es decir, PAF liberado en respuesta a estímulos tales como inmunoagregados¹³⁵ o endotoxina bacteriana.

Nuestro trabajo se ha centrado en los efectos producidos por la endotoxina bacteriana ya que se ha demostrado que parte de sus efectos, característicos del shock séptico, están mediados, al menos en parte vía generación de PAF^{147,148}.

El shock puede producirse por diversas causas, entre las cuales la de mayor incidencia es la sepsis bacteriana¹⁴⁹. En el estado de shock se produce un fallo del sistema circulatorio en la distribución de las sustancias químicas necesarias para la supervivencia celular y en la eliminación de productos de desecho. Ello conduce a una disfunción y a la muerte celulares¹⁵⁰. La complejidad de la patofisiología se explica por la existencia de mecanismos en los que participan diversidad de mediadores humorales y celulares, entre los que destacan aminas vasoactivas, citoquinas como TNF, IL-1 e IL-6 y lípidos bioactivos como el PAF. Todo ello hace que el estado de shock sea la versión sistémica de la inflamación aguda.

En los últimos años se ha tratado de esclarecer el papel patogénico de lípidos activos, como el PAF, o ciertas citoquinas en el shock séptico^{151 152}.

La infusión intravenosa de endotoxina produce síntesis de PAF y aparecen síntomas como hipotensión, hemoconcentración y en algunos casos hasta la muerte¹⁵³. Por otra parte,

la inyección intravenosa de PAF mimetiza gran parte de las características fisiopatológicas del shock.

El TNF es también un importante mediador en el shock séptico. De hecho esta citoquina se describió por primera vez por un grupo de investigadores, que aislaron, de animales tratados con endotoxina, una proteína que producía la necrosis hemorrágica de tumores¹⁵⁴.

El papel del TNF en el shock ha adquirido relevancia en los últimos años. Toda una serie de hechos parecen apoyar la importancia del papel del TNF en el shock séptico:

- Es conocido que la endotoxina bacteriana es el estímulo más potente para provocar la síntesis de TNF por parte de monocitos y macrófagos²³.
- Se han medido concentraciones importantes de TNF en sangre de animales de experimentación tratados con endotoxina y en los pacientes con sepsis¹⁵⁵.
- La inyección intravenosa de TNF en animales de experimentación desencadena un síndrome con características muy parecidas al estado de shock, aunque no reproduce la totalidad de los efectos producidos por la endotoxina¹⁵⁶.

Las ideas expuestas anteriormente hacen pensar que TNF y PAF cooperan durante el shock séptico para provocar los efectos observados en esta situación¹⁵⁷. Curiosamente, la administración de PAF a ratones tratados con endotoxina hace disminuir los niveles de TNF circulantes. Los mecanismos implicados en el proceso podrían ser dos. El primero de ellos, dependería de la formación de PGE₂, que sería la causa de una disminución en la síntesis de mRNA para el TNF. El segundo mecanismo propone que la ocupación del receptor del PAF por agonistas o antagonistas de este receptor provocaría la disminución de la síntesis de TNF¹⁵⁸.

Además del PAF y del TNF, la IL-1 se considera también un importante mediador en el shock séptico.

Varios puntos apoyan esta afirmación:

- La infusión de IL-1 provoca en animales de experimentación leucopenia, taquicardia

e hipotensión.

- Se ha descrito que esta citoquina actúa de manera sinérgica con el TNF para producir el daño tisular y la muerte en modelos experimentales¹⁵⁹.

Nuestros resultados demostraron que el PCA-4248 inhibió la hipotensión arterial inducida por endotoxina en rata anestesiada, de forma similar a lo observado en la hipotensión inducida por la infusión de PAF.

Las dosis intravenosas del PCA-4248 necesarias para la recuperación de los animales tratados con LPS fueron mayores que en el caso de la hipotensión inducida por PAF, sin embargo, las cantidades necesarias para observar su efecto por vía oral eran aproximadamente iguales para las dos situaciones. Este hecho se ha descrito también, para otros antagonistas del PAF, tales como el WEB 2086 y el SDZ 64-412¹³⁰.

Puesto que la infusión de endotoxina bacteriana produce la liberación de varios mediadores con distintos patrones cinéticos, este hecho debe tenerse en cuenta a la hora de analizar los resultados. La liberación máxima de PAF tiene lugar, aproximadamente, a los 20 minutos tras la inyección de endotoxina, mientras que el TNF no es un mediador constitutivo, sino que se genera entre 90-120 minutos después¹⁶⁰. Esto podría explicar la mayor eficacia del compuesto frente a LPS en el caso de la vía oral, ya que esta ruta de administración favorecería su mejor distribución en los tejidos. Mientras que la administración intravenosa del compuesto sería menos eficaz debido a un mayor catabolismo y/o a su rápida eliminación del torrente sanguíneo.

El PCA-4248, administrado por vía intravenosa, disminuyó la trombocitopenia y la leucopenia inducidas por inyección intravenosa de LPS en rata anestesiada. La actividad desarrollada por el compuesto no puede relacionarse con un efecto directo sobre los receptores de plaquetas, puesto que las plaquetas de rata no poseen receptores para el PAF. Sin embargo, estos resultados podrían estar relacionados con los cambios hemodinámicos inducidos por la endotoxina, que contribuirían al secuestro intrapulmonar de células sanguíneas,

o deberse a una propiedad adicional del PCA-4248 aún no caracterizada.

Algunos antagonistas del PAF tales como el WEB 2086¹⁶¹, el CV 3988¹²⁹ o el BN 50739¹⁶² también son efectivos frente a la hipotensión inducida por endotoxina, sin embargo, son incapaces de antagonizar la leucopenia y la trombocitopenia asociadas. El WEB 2086, probado en nuestras condiciones experimentales, no resultó efectivo para proteger al animal frente a la hipotensión. La discrepancia de este dato con los publicados previamente¹⁶³, podría deberse a la utilización de una distinta dosis de endotoxina bacteriana o a la mayor duración del período de observación en nuestro laboratorio. La eficacia del PCA-4248 frente a la leucopenia y trombocitopenia inducida por endotoxina en rata podría ser debida a una posible actividad anti-TNF¹¹³, ya que el TNF induce trombocitopenia, leucopenia y hemoconcentración, que se deben su capacidad para inducir la adhesión de neutrófilos a las células endoteliales. Anticuerpos monoclonales anti-TNF inhiben estas respuestas a la endotoxina en ratas¹⁶⁴. Además, se ha demostrado que dichos anticuerpos son capaces de suprimir la inducción de la NO sintasa y la producción de óxido nítrico (NO), que sería el efector final de la vasodilatación, y la hipotensión consecuente.

La medida de los niveles de TNF en plasma tras la administración de endotoxina bacteriana permite predecir en algunos casos el carácter letal de la situación patológica^{165,166}. Por otro lado, se ha observado que algunos antagonistas de PAF son capaces de disminuir los niveles de TNF en suero de ratones tratados con LPS, sugiriendo que, debido a este hecho, estos compuestos podrían presentar un efecto beneficioso adicional¹⁵³.

El PCA-4248, administrado por vía oral, fue capaz de suprimir casi totalmente la mortalidad inducida por endotoxina en ratones. El efecto máximo fue dependiente de la dosis y se observó a las 24 horas de la administración intravenosa de LPS, coincidiendo con la fase de mayor mortalidad en el grupo control. A la vista de este efecto, se probó la capacidad del PCA-4248 para proteger de la muerte inducida en ratones por inyección intravenosa de TNF. Este estudio, realizado por el departamento de inmunología de los laboratorios Knoll (Ludwigshafen,

Alemania)¹⁶⁷ demostró la efectividad del compuesto en este modelo donde aumentó en un 40% la supervivencia de ratones a los que se administró TNF por vía intravenosa.

La misma dosis de WEB 2086 no tuvo ningún efecto protector sobre la mortalidad por TNF sugiriendo que la mortalidad inducida por TNF no es PAF-dependiente y que el PCA-4248 posee actividad anti-TNF además de su actividad PAF-antagonista

Este hecho, que pudiera ser fundamental a la hora de utilizar el PCA-4248 como agente terapéutico en el shock séptico, nos llevó a intentar caracterizar la actividad anti-TNF del compuesto.

Existe una estrecha relación entre los mediadores lipídicos y las citoquinas en cuanto a su papel funcional, demostrándose interrelación entre ambos tipos de mediadores. Se conoce también que la IL-1 induce la acumulación de una PLA₂ de elevado peso molecular y la liberación de PGE₂¹⁶⁸. Así como la acumulación de DAG procedente de fosfatidilcolina¹⁶⁹.

Así mismo, se ha probado la existencia de una PLA₂ de alto peso molecular que juega un papel crucial en la citotoxicidad y en la transducción de la señal inducida por el TNF¹⁷⁰. Paralelamente, estudios "in vitro" han demostrado la relación entre fosfolípidos y citoquinas y han observado que productos derivados del ácido araquidónico controlan la producción de TNF e IL-1.

PAF y LTB₄ son también estímulos muy potentes para la producción de estas citoquinas¹⁷¹. Mientras que la PGE₂ inhibe la producción de TNF e IL-1 por un mecanismo de "feedback" negativo¹⁷².

En todo este proceso, los macrófagos alveolares de pulmón juegan un papel importante. En primer lugar, como células productoras de un elevado número de mediadores y en segundo lugar como células diana de mediadores inflamatorios. Entre todos los mediadores generados en la reacción inflamatoria, las especies reactivas de oxígeno representan una familia de moléculas muy activas y que contribuyen al daño estructural y funcional de las células y tejidos implicados⁶.

Es bien conocido que, en diversas situaciones "in vivo"¹⁷³, tanto el TNF como la endotoxina (LPS) favorecen la activación de los macrófagos alveolares para una posterior respuesta al PAF o fMLP¹⁷⁴. También se ha observado que el PAF estimula la producción de TNF en monocitos de sangre periférica y que, en un rango de concentración nanomolar, provoca la producción de TNF en respuesta a la endotoxina¹⁷⁵.

La estimulación de macrófagos alveolares de cobaya con PAF y LPS conduce a la producción de O_2^- , que el PCA-4248 suprimió totalmente, sin embargo, el compuesto no modificó la respuesta a fMLP y redujo en un 50% la producción de O_2^- inducida por TNF.

Estos hechos sugieren que la producción de O_2^- en respuesta a fMLP es independiente del receptor del PAF mientras que la inducida por TNF es sólo parcialmente dependiente de PAF o bien que el PCA-4248 posee algún tipo de actividad anti-TNF.

La pre-incubación ("priming") de las células con LPS hizo que la producción de O_2^- aumentara cuando los macrófagos se estimulaban posteriormente con TNF y fMLP, sin embargo, cuando la estimulación era por PAF, la producción de O_2^- estaba disminuida, lo que sugiere una ocupación parcial de los receptores por el PAF sintetizado en respuesta a LPS.

En células pre-activadas con LPS, el PCA-4248 suprimió el aumento de O_2^- inducido como respuesta a fMLP y anuló totalmente cualquier tipo de respuesta a TNF y PAF. Sin embargo, otro antagonista del PAF, el WEB-2086, no fue capaz de suprimir la elevación de los niveles de O_2^- cuando la estimulación era por TNF, mientras que se comportó de manera análoga al PCA-4248 cuando los macrófagos se estimularon por PAF o fMLP, confirmando así que el aumento de la actividad debido a la incubación con LPS es dependiente del receptor del PAF, mientras que la estimulación por fMLP y TNF es independiente de la misma y que el PCA-4248 posee actividad anti-TNF no relacionada con su efecto antagonista del PAF.

La pre-incubación con TNF, indujo a su vez un aumento en la respuesta de los macrófagos sólo en el caso de estimulación posterior con fMLP. El PCA-4248 suprimió sólo parcialmente este aumento de la producción de O_2^- , comportándose también en esta situación

como un inhibidor de los efectos del TNF sin actividad frente al fMLP.

Cuando las células se pre-incubaron con PAF, éste causó un primer pico de producción de O_2^- y la disminución del período de latencia requerido para la producción de O_2^- en respuesta a TNF. El PCA-4248 suprimió tanto la producción de O_2^- debida a PAF como la inducida por TNF. De nuevo, el comportamiento del fármaco fue diferente al de otro antagonista de PAF utilizado como patrón, ya que el WEB-2086 suprimió la producción de O_2^- debida al PAF sin modificar la respuesta de los macrófagos a TNF. Todos estos datos sugieren que el PAF tiene un papel importante en la activación de macrófagos por LPS, aumentando la respuesta de las células a otros mediadores. En el caso del TNF la situación es diferente, ya que si bien la pre-estimulación con PAF no incrementa la producción de anión superóxido, en respuesta a TNF, sí hace que esta respuesta sea casi inmediata transformando al macrófago en una célula capaz de responder rápidamente a la estimulación por TNF.

El PCA-4248 es activo, no sólo en aquellos modelos en los que se produce claramente la liberación de PAF, sino que además, modifica también la respuesta celular al TNF y los efectos de la interacción PAF-TNF.

La modificación por LPS y TNF de la respuesta a una posterior estimulación por PAF pueden ocurrir a través de diversos mecanismos:

- Por un aumento de la afinidad del receptor del PAF por el ligando y/o un aumento en el número de receptores debido a una restructuración de los receptores en la superficie de la membrana.
- O bien, por modificaciones a nivel de aquellos procesos de transducción que ocurren tras la interacción del ligando con el receptor.

Nuestros estudios indican que la activación de los macrófagos alveolares de cobaya por parte de LPS y TNF parece modificar las características de la unión del PAF a su receptor, ya que la incubación de las células con LPS o TNF indujo un aumento en el número de receptores y una disminución de la afinidad del ligando por el receptor.

Se ha descrito que la activación de macrófagos peritoneales de ratón por LPS induce un aumento en el número de receptores de membrana celular, pero no altera la afinidad de éstos por el PAF¹⁷⁶. También se ha descrito un aumento en el número de receptores para PAF, expresados en una línea celular de monocitos (Mono Mac C) en respuesta a TNF, aunque en este trabajo no se hace referencia a un posible cambio de afinidad¹⁷⁷. Estos datos indicarían, que tanto LPS como TNF son capaces de modular la respuesta del PAF a través de un mecanismo en el que esta implicada la expresión de su receptor.

Nuestros resultados indican que, el PCA-4248 fue capaz de desplazar al [³H] PAF de su receptor de manera dependiente de la dosis en macrófagos pre-incubados con LPS o TNF. Los valores de K_i para los tres casos: células nativas y células activadas por LPS o TNF eran aproximadamente iguales, sugiriendo que los nuevos receptores de PAF expresados en la membrana celular serían iguales a los de las células nativas. Por tanto, la capacidad del PCA-4248 para inhibir los efectos de LPS y TNF podrían estar no sólo relacionados con una actividad directa anti-TNF, sino también con su capacidad para anular la modulación que estos mediadores ejercen sobre los receptores del PAF.

Estos resultados sugieren de nuevo la posible actividad anti-TNF descrita en el apartado anterior. Resultados de experimentos no recogidos en esta tesis y realizados por los laboratorios Knoll¹⁶⁴, demostraron que el PCA-4248 inhibía la síntesis de TNF inducida por estimulación de monocitos humanos con LPS, mientras que la eficacia del compuesto era menor cuando la citoquina liberada era IL-1. Los valores de IC_{50} del compuesto para la producción de TNF e IL-1 eran de $IC_{50} = 32\mu M$ e $IC_{50} > 40\mu M$ respectivamente, mejores que los obtenidos por este mismo laboratorio para la pentoxifilina (un inhibidor de fosfodiesterasa que se utiliza como referencia en modelos inflamatorios, por su capacidad para inhibir la síntesis de TNF, $IC_{50} > 40\mu M$ en ambos casos), o para otro importante antagonista del PAF: el WEB 2086, también $IC_{50} > 40\mu M$ en ambos casos.

Esta característica del PCA-4248, que no poseen otros antagonistas del PAF, podría

darle un interés especial desde el punto de vista terapéutico en situaciones patológicas como el shock séptico, fuertemente dependientes de la interacción PAF-TNF.

CONCLUSIONES.

1. El PCA-4248 antagoniza los efectos del PAF "in vitro":

- Es capaz de inhibir la agregación plaquetaria y la liberación de ATP de una manera dependiente de la dosis. Esta inhibición es de tipo competitivo.
- La actividad antiagregante es específica para PAF, y no se observa frente a otros agonistas como colágeno, epinefrina, ADP y AA.
- El PCA-4248 suprime la entrada de Ca^{2+} extracelular en plaquetas asociada a la unión del PAF a su receptor.
- El PCA-4248 inhibe la producción de O_2^- inducida por PAF, en macrófagos alveolares de cobaya. Esta actividad, también es específica para PAF, pues no se observa cuando el estímulo utilizado es fMLP.

2. El PCA-4248 inhibe, también, algunos efectos directos del TNF "in vitro".

- En macrófagos alveolares de cobaya, el compuesto suprime parcialmente la producción de O_2^- inducida por TNF.
- Suprime parcialmente la respuesta a fMLP de macrófagos alveolares pre-activados por TNF.

3. El PCA-4248 presenta capacidad para suprimir las acciones debidas a las interacciones PAF-TNF "in vitro".

- En macrófagos alveolares de cobaya suprime totalmente la producción de anión O_2^- inducida por LPS.

-
- Es capaz de suprimir la producción de O_2^- inducida por TNF y PAF en macrófagos pre-activados por LPS.
 - En macrófagos pre-activados por PAF, también suprime la producción de O_2^- debida a PAF y TNF.
 - En monocitos humanos, inhibe la síntesis de TNF en respuesta a LPS.
4. El compuesto ejerce su actividad por su capacidad de unión al receptor del PAF en plaquetas, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos.
- El PCA-4248 es capaz de desplazar de manera dependiente de la dosis al [3H] PAF del receptor del PAF en plaquetas de conejo y humanas, en leucocitos polimorfonucleares de conejo, polimorfonucleares humanos y en macrófagos alveolares de cobaya.
 - El antagonismo frente al receptor del PAF es de tipo competitivo y reversible.
 - Aunque TNF y LPS modifican las características de unión de [3H] PAF al receptor de macrófagos alveolares de cobaya, el PCA-4248 es capaz de desplazar al [3H] PAF del receptor en macrófagos alveolares de cobaya modificados tras pre-incubación con LPS y TNF.
5. El PCA-4248 es capaz de ejercer su antagonismo frente a PAF "in vivo".
- Es capaz de inhibir la agregación plaquetaria inducida por PAF en plaquetas de conejos tratados con el compuesto.
 - Protege y revierte la hipotensión y la hemoconcentración inducida por PAF en rata.
 - Aumenta el grado de supervivencia a la inyección de PAF en ratones.
 - Presenta una rápida absorción, por vía parenteral y entérica.
 - El efecto es prolongado y reversible.

-
6. El PCA-4248 inhibe también algunos efectos del TNF "in vivo".
 - Aumenta el grado de supervivencia frente a la inyección intravenosa de TNF a ratones.

 7. El PCA-4248 es capaz de aliviar el colapso circulatorio inducido por LPS.
 - El compuesto muestra capacidad de protección y reversibilidad sobre la hipotensión, trombocitopenia y leucopenia inducida por LPS en rata.
 - Aumenta la supervivencia en ratones tratados con LPS.
 - Presenta mejor efecto cuando la administración es por vía entérica.

 8. El conjunto de actividades desarrolladas por PCA-4248 sugiere que se trata de un compuesto con actividad farmacológica dual: antagonización del PAF y supresión de los efectos de TNF.

V BIBLIOGRAFIA

-
1. Barbaro, J.F., Zvailer, N.J. (1966). **Proc. Soc. Exp. Biol. Me.** 122, 1245.
 2. Siraganian, R.P., Olivera, B. (1968). **Fed. Proc.** 27, 315.
 3. Siraganian, R.P., Osler, B. (1969). **J. Allergy.** 43, 167.
 4. Benveniste, J., Henson, P.M., Cochrane, C.G. (1972). **J. Exp. Med.** 136, 1356.
 5. Benveniste, J., Tencé, M., Varenne, P., Bidault, J., Boulet, C., Polonsky, J., Hebd, C.R. (1979). **Seances Acad. Sci. Series D.** 289, 1037.
 6. Demopoulos, C.A., Pinckard, R.N., Hanahan, D.J. (1979). **J. Bio. Chem.** 254, 9355.
 7. Blank, M.L., Snyder, F., Byers, L.W., Brooks, B., Muirhead, E.E. (1979). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 90, 194.
 8. Hanahan, D.I., Demopoulos, C.A., Liehr, J., Pinckard, R.N. (1980). **J. Biol. Chem.** 255, 5514.
 9. Ludwig, J.C., Pinckard, R.N. (1987). **Horizons in Platelet Activating Factor Research.** Ed. C.M. Winslow y J.L. Lee. J. Wiley and sons, New York. 59.
 10. Albert, D.H., Snyder, F. (1983). **J. Biol. Chem.** 258, 97.
 11. Touqui, L., Rothhut, B., Shaw, A.M., Fradin, A., Vargaftig, B.B., Russo-Marie, F. (1986). **Nature.** 321, 177.
 12. Billah, M.M., Siegel, M.I. (1984). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 118, 629.

-
13. Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., Carter, M.E., Prescott, S.M. (1987). **J. Biol. Chem.** 262, 4215.
 14. Blank, M.L., Lee, T.C., Fitzgerald, V., Snyder, F. (1981). **J. Biol. Chem.** 256, 175.
 15. Wykle, R.L., Olson, S.C., O'Flaherty, J.T. (1986). **Adv. Inflam. Res.** 11, 71.
 16. Chignard, M., Le Couedic, J-P., Coeffier, E., Benveniste, J. (1984). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 124, 637.
 17. Uemura, Y., Lee, T.C., Snyder, F. (1991). **J. Biol. Chem.** 266, 8268.
 18. García, C., Montero, M., Alvarez, J., Sanchez-Crespo, M. (1993). **J. Biol. Chem.** 268, 1.
 19. Renooij, W., Snyder, R. (1981). **Biochim. Biophys. Acta.** 663, 545.
 20. Zanglis, A., Lianos, E.A. (1984). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 124, 637.
 21. Lee, T.C., Malone, B., Snyder, F. (1986). **J. Biol. Chem.** 261, 5373.
 22. Chignard, M., Le Couedic, J.P., Vargaftig, B.B., Benveniste, J. (1980). **Br. J. Haematol.** 46, 5373.
 23. Iñarrea, P., Gómez-Cambronero, J., Nieto, M.L., Sanchez-Crespo, M. (1984). **Eur. J. Pharmacol.** 105, 309.
 24. Sanchez-Crespo, M., Alonso, F., Iñarrea, P., Alvarez, V., Egido, J. (1982). **Inmunopharmacol.** 4, 173.

-
25. Seiss, W., Weber, P.C., Lapetina, E.G. (1984). **J. Biol. Chem.** 259, 8286.
 26. Valone, F.H., Johnson, B. (1985). **Thromb. Res.** 40, 385.
 27. Klopogge, E., Haas, G.H., Gorter, G., Akkerman, J.W.N. (1983). **Thromb. Res.** 29, 595.
 28. Lapetina, E.G., Siegel, F.L. (1983). **J. Biol. Chem.** 258, 7241.
 29. Vargaftig, B.B., Chignard, M., Benveniste, J. (1981). **Biochem. Pharmacol.** 30, 263.
 30. Valone, F.H. (1987). **PAF and Related Lipids Mediators**. Ed. Snyder. Plenum Press. IV, 137.
 31. Sanchez-Crespo, M., Alonso, F., Egido, J. (1980). **Inmunol.** 40, 645.
 32. Ludwig, J.C., McManus, L.M., Clark, P.O., Hanahan, D.J., Pinckard, R.N. (1985). **Arch. Biochem. Biophys.** 24, 337.
 33. Camussi, G., Bussolino, F., Tetta, C., Piacibello, W., Aglietta, M. (1983). **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.** 70, 245.
 34. Lee, T.C., Lenittan, J., Malone, B., Roddy, U., Wasserman, S.I. (1984). **J. Biol. Chem.** 259, 5526.
 35. Lee, T.C., Snyder, F. (1986). **Phospholipids and cellular regulation**. Ed. J.F. Kuo. CRC. Press. 1, 1.
 36. Shaw, J.O., Pinckard, R.N., Ferrigni, K.S., McManus, L.M., Hanahan, D.J. (1981). **J.**

-
- Inmunol.** 127, 1250.
37. Gorman, R.R., Morton, D.R., Hopkin, S., Lin, A.H. (1983). **Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.** 12, 57.
38. Czarnetzki, B.M., Benveniste, J. (1981). **Chem. Phys. Lipids.** 29, 317.
39. Smith, R.J., Bowman, B.J., Iden, S.S. (1984). **Biochem. Pharmacol.** 33, 973.
40. Wardlaw, A.J., Moqbel, R., Cromwell, O., Kay, A.B. (1986). **J. Clin. Invest.** 78, 1701.
41. Sanjar, S., Aoki, S., Boubekeur, K., Burrows, L., Colditz, I. (1989). **Japanese J.Pharmacol.** 51, 167.
42. Yukawwa, T., Kroegel, C., Evans, P., Fukuda, T., Chung, K.F. (1989). **Inmunol.** 68, 140.
43. Yasaka, T., Boxer, S.C., O'Flaherty, J.T. (1986). **Adv. Inflam. Res.** 11, 71.
44. Fitzgerald, M.F., Parente, L., Whittle, B.J. (1989). **Eur. J. Pharmacol.** 169, 539.
45. Conrad, G.W., Rink, T.J. (1986). **J. Cell. Biol.** 103, 439.
46. Jouvin-Marche, E., Ninio, E., Beawvain, G., Tence, M., Niaudet, P., Benveniste, J. (1984). **J. Inmunol.** 133, 892.
47. Malavasi, F., Tetta, C., Funaro, A., Bellone, G., Ferrero, E., Franzone, A.C., Dellabona, P., Rusci, R., Matera, L., Camusi, G. (1986). **Proc. Natl. Acad. Sci.** 83, 2443.
48. Bussolino, F., Foa, R., Malavasi, F., Ferrando, M.L., Camusi, G. (1984). **Exp. Haematol.**

-
- 12, 688.
49. Pignol, B., Henane, S., Mencia-Huerta, J.M., Braquet, P., Rola-Pleszczynski, M. (1987). **Int. Congress Pharmacol.**
50. Fennell, D.F., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Currus, J.A., Prescott, S.M. (1989). **Platelets and Vascular Occlusion.** Ed. Patrono, C., Fitzgerald, G.A. Raven Press.
51. Halonen, M., Palmer J.D., Lohman, I.C., McManus, L.M., Pinckard, R.N. (1981). **Am. Rev. Resp. Dis.** 124, 416.
52. Camussi, G., Pawlowski, I., Tetta, C., Roffinello, C., Alberton, M., Bretjens, J., Andres, G. (1983). **Am. J. Pathol.** 112, 78.
53. Fitzgerald, M.F., Moncada, S., Parente, L. (1984). **Br. J. Pharmacol.** 88, 149.
54. Piper, P.J., Stewart, A.C. (1986). **Br. J. Pharmacol.** 88, 595.
55. Tanaka, S., Kasuya, Y., Masuda, Y., Shigenobu, K. (1983). **J. Pharmacobio-Dyn.** 6, 866.
56. Rosam, A.C., Wallace, J.L., Whittle, B.J. (1986). **Nature.** 319, 54.
57. Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N. (1984). **Am. J. Physiol.** 258, 158.
58. Tokumura, A., Fukuzawa, K., Tsukatani, H. (1984). **J. Pharm. Pharmacol.** 36, 210.
59. Hsueh, W., Gonzalez-Cruci, F., Arroyave, J.L. (1986). **Am. J. Pathol.** 122, 231.
60. Shukla, S.D., Buxton, D.B., Olson, M.S., Hanahan, D.J. (1983). **J. Biol. Chem.** 258,

-
- 10212.
61. Buxton, D.B., Shukla, S.D., Hanahan, D.J., Olson, M.S. (1984). **J. Biol. Chem.** 259, 1468.
62. Mendlovic, F., Corvera, S., García-Sainz, J.A. (1984). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 123, 507.
63. Bessin, D., Bonnet, J., Apffel, P., Soulard, C., Desgrou, L., Peassi, I., Benveniste, J. (1983). **Eur. J. Pharmacol.** 86, 403.
64. O'Flaherty, J.R., Wykle, R.L., Miller, C.H., Lewis, J.C., Waite, M., Bass, D.A., McCall, C.E., DeChatelet, L.R. (1981). **Am. J. Pathol.** 103, 70.
65. Vargaftig, B.B., Braquet, P. (1987). **Br. Med. Bull.** 43, 312.
66. Vargaftig, B.B., Lefort, J., Chignard, M., Benveniste, J. (1980). **Eur. J. Pharmacol.** 65, 185.
67. Lefort, J., Rotilio, D., Vargaftig, B.B. (1984). **Br. J. Pharmacol.** 82, 565.
68. Cuss, F.M., Dixon, C.M.S., Barnes, P.J. (1986). **Lancet.** 2, 189.
69. Rubin, A.E., Smith, L.J., Patterson, R. (1986). **Am. Rev. Respir. Dis.** A91, 133.
70. Lefer, A.M. (1989). **Pro. Clin. Biol. Res.** 301, 53.
71. Feuerstein, G., Boyd, L.M., Ezna, D., Goldstein, R.E. (1984). **Am. J. Physiol.** 246, H466.

-
72. Handley, D.A., Lee, M.L., Saundres, R.N. (1985). **Thromb. Haemostasis.** 54, 756.
73. Satoh, K., Imaizumi, T., Kawamura, Y., Yoshida, H., Takamatsu, M. (1989). **Prostaglandins.** 37, 673.
74. Short, B.L., Gardiner, W.M., Mishik, A.N., Ramwell, P.N., Walker, D., Fletcher, J.R. (1983). **Adv. Shock Res.** 10, 143.
75. Iñarrea, P., Gómez-Cambronero, J., Pascual, J., Del Carmen Ponte, M., Hernando, L., Sánchez-Crespo, M. (1985). **ImmunoPharmacol.** 9, 45.
76. Stenzel, H., Sannwal, U., Halm, H.L. (1986). **VI Int. Conf. Prostaglandins and Related Compounds.** 306.
77. Ziegler, E.J. (1988). **N. Engl. J. Med.** 318, 1533.
78. DeForge, L.E., Nguyen D.T., Kunkel, S.L., Remick, D. G. (1991). **Chicago Meetings.** 116, 429.
79. Braquet, P., Paubert-Braquet, M., Bourgain, R., Bussolino, F., Hosford, D. (1989). **J. Lipid Med.** 1, 75.
80. Koltai, M., Hosford, D., Braquet, P. (1993). **J.Lipid Med.** 6, 183.
81. Kornechi, E., Erhlich, Y.H. (1988). **Science.** 240, 92.
82. Bito, H., Kudo, Y., Shimizu, T. (1993). **J. Lipid Med.** 6, 169.
83. Bito, H., Nakamura, M., Honda, Z., Izumi, T., Iwatsubo, T., Seyama, Y., Osura, A., Kudo,

-
- Y., Shimizu, T. (1992). **Neuron**. 9, 285.
84. Billah, M.M., DiRenzo, G.C., Bar, C., Truong, C.I., Hoffman, D.R., Anceschi, M.M., Bleasdale, J.E., Johnston, J.M. (1985). **Prostaglandins**. 30, 841.
85. O'Neil, C., Collier, M., Ryan, J.P., Spinks, N.R. (1989). **J. Reprod. Fertil.** 37, 19.
86. Vargaftig, B.B., Benveniste, J. (1983). **Trends. Pharmacol. Sci.** 4, 341.
87. Valone, F.H., Cole, E., Reinhold, V.R., Goetzl, E.J. (1982). **J. Immunol.** 129, 1637.
88. Iñarrea, P., Gómez-Cambronero, J., Nieto, M., Sanchez-Crespo, M. (1984). **Eur. J. Pharmacol.** 105, 309.
89. Honda, Z., Nakamura, M., Miki, I., Minami, M., Watanabe, T., Seyama, Y., Okado, H., Toh, H., Ito, K., Miyamoto, T., Shimizu, T. (1991). **Nature**. 349, 342.
90. Nakamura, M., Honda, Z., Izumi, T., Sakanaka, C., Mutoh, H., Minami, M., Bito, H., Seyama, Y., Matsumoto, T., Noma, M., Shimizu, T. (1991). **J. Biol. Chem.** 266, 20400.
91. Nakamura, M., Honda, Z., Matsumoto, T., Noma, M., Shimizu, T. (1993). **J. Lipid Med.** 6, 163.
92. Hwang, S.B., Lam, M.H. (1986). **Biochem. Pharmacol.** 35, 4511.
93. Hanahan, D.J., Munder, P.G., Satouchi, K., McManus, L., Pinckard, R.N. (1981). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 99, 183.
94. Surles, J.R., Wykle, R.L., O'Flaherty, J.T., Salzer, W.L., Thomas, M.J., Snyder, F. (1985). **J. Med. Chem.** 28, 73.

-
95. Wissner, A., Schaub, R.E., Sum, P.E., Kohler, C.A., Goldstein, B.M. (1985). **J. Med. Chem.** 27, 1174.
96. Snyder, F., Lee, T.C., Blank, M.L., Cabot, M.C., Malone, B., Albert, D.H. (1983). **Symposium Platelet Activating Factor and Structurally Related Ether Lipids.** 23, 253.
97. Tence, M., Coeffier, E., Lalau Keravy, C., Braquet, C. (1983). **PAF and related Ether-Lipids.** Benveniste, J., Arnoux, B. Ed. Elsevier. 41.
98. Ostermann, G., Brachwitz, H., Till, U. (1984). **Biomed. Biochim. Acta.** 43, 349.
99. Tokumura, A., Homma, H., Hanahan, D.J. (1985). **J. Biol. Chem.** 266, 12710.
100. Wissner, A., Schaub, R.E., Sum, P.E., Kohker, C.A., Goldstein, B.M. (1985). **J. Med. Chem.** 28, 1181.
101. Braquet, P. (1987). **Drug Future.** 12, 643.
102. Guinot, P., Braquet, P. (Sept. 1992). **Abstract Book, IV Congreso Internacional PAF and Related Lipid Mediators.** P3.4.
103. Shen, T.Y., Hwang, S.B., Chang, M.N., Doebber, T.W., Lam, M.H., Wu, M.S., Wang, X., Han, G.Q., Li, R.Z. (1985). **Proc. Natl. Acad. Sci.** 82, 672.
104. Okamoto, M., Yoshida, K., Uchida, I., Nishikawa, M., Kohsaka, M., Aoki, H. (1986). **Chem. Pharm. Bull.** 34, 340.
105. Terashita, Z., Tsushima, S., Yhoshioka, Y., Nomura, H., Inada, Y., Nishikawa, K. (1983).

-
- Life. Sci.** 32, 1975.
106. Handley, D.A., Anderson, R.C., Saundres, R.N. (1987). **Eur. J. Pharmacol.** 141, 409.
107. Houlihan, W.J. (1991). **CRC Handbook of PAF and PAF antagonists**. CRC Press. 157.
108. Braquet, P., Gofroid, J.J. (1987). **Platelet Activating Factor and Related Lipid Mediators**. F. Snyder Ed. Plenum Press. 191.
109. Heuer, H., Birke, F.W., Casais-Stenzel, J., Weber, K.H. (1988). **Prostaglandins.** 35, 838.
110. Gofroid, J.J., Braquet, P. (1986). **TIPS.** 7, 368.
111. Dive, G., Gofroid, J.J., Lamotte-Brasseur J., Batt, J.P., Heymans, F., Dupont, L. Braquet, P. (1989). **J. Lipids Mediators.** 1, 201.
112. Batt, J.P., Lamouri, A., Tavet, F., Heymans, F., Dive, G., Gofroid, J.J. (1991). **J. Lipid Mediators.** 4, 343.
113. Sunkel, C.E., Fau de Casa-Juana, M., Santos, L., Gómez, M.M., Villarroya, M., González-Morales, M.A., Priego, J.G., Ortega, M.P. (1990). **J. Med. Chem.** 33, 3205.
114. C.I.F.A. (Centro de investigación en farmacobiología aplicada). (1991). Pamplona.
115. Fax, H., Lewis, J., Wenner, W. (1951). **J. Org. Chem.** 16, 1259.
116. Klopogge, E., Akkerman, J.W. (1984). **Biochem. J.** 223, 901.

-
117. Vargas, J.R., Randomski, M., Moncada, S. (1982). **Prostaglandins** 23, 929.
118. Born, G.V.R. (1962). **Nature** 194, 927.
119. Caen, J., Legrand, Y. (1968). **Rev. Française et Clin. Biol.** 13, 1028.
120. Feinman, R.D., Lubowsky, J., Charo, I., Zabinski, M.P. (1977). **J. Lab. Clin. Med.** 90, 125.
121. Munson, P.J., Rodbard, K. (1980). **Anal. Biochem.** 107, 220.
122. McPherson, G.A. (1985). **J. Pharmacol. Methods.** 14, 213.
123. Cheng, Y., Prusoff, W.H. (1973). **Biochem. Pharmacol.** 22, 3099.
124. Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. (1985). **J. Biol. Chem.** 260, 3440.
125. Stewart, A.G., Dusing, G.J. (1988). **Br. J. Pharmacol.** 94, 1225.
126. Boyum, A. (1986). **Scand. J. Clin. Lab. Investig.** 21, 77.
127. Maridonneau-Parini, I., Lagente, V., Lefort, J., Random, J., Russo-Marie, F., Vargaftig, B.B. (1985). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 131, 42.
128. Descamps-Latsha, B., Nguyen, A.T., Mouton, D. (1988). **Exptl. Clin. Immunogenet.** 5, 226.
129. Terashita, Z.I., Imura, Y., Nishikawa, K., Sumida, S. (1985). **Eur. J. Pharmacol.** 109, 257.

-
130. Handley, D.A., Van Valen, R.G., Melden, M.K., Houlihan, W.J., Saundres, R.N. (1988). **J. Pharmacol. and Experimen.Therap.** 247, 617.
131. Koltai, M., Hosford, D., Guinot, P., Esnau, A., Braquet, P. (1991). **Drugs.** 42, 9.
132. Koltai, M. (1991). **Drugs.** 42, 174.
133. Ortega, M.P., Sunkel, C.E., Gómez, M.M., Santos, L., Fau de Casa-Juana, M., Priego, J.G. (1993). **Trends Med. Chem. Council of Scientific Research Ed.** (in press).
134. Ortega, M.P., García, M.C., Gijón, M.A., Fau de Casa-Juana, M., Priego, J.G., Sánchez-Crespo, M., Sunkel, C.E. (1990). **J. Pharmacol. Exptl. Ther.** 255, 28.
135. Fernandez-Gallardo, S., Ortega, M.P., Priego, J.G., Fau de Casa-Juana, M., Sunkel, C., Sánchez-Crespo, M. (1990). **J. Pharmacol. Exptl. Ther.** 255, 34.
136. Hwang, S.-B. (1990). **J. Lipid Med.** 2, 123.
137. Kramer, R.M., Patton, G.M., Pritzer, C.R., Deykin, D. (1984). **J. Biol. Chem.** 259, 13316.
138. Homma, H., Tokomura, A., Hanahan, D.J. (1987). **J. Biol. Chem.** 262, 10582.
139. Herbert, J.M., Laplace, M.CL., Maffrand, J.P. (1993). **Biochem. Pharmacol.** 45, 58.
140. Hwang, S.-B., Lam, M.-H., Hsu, A.H.-M. (1989). **Mol. Pharmacol.** 35, 48.
141. Hwang, S.-B. (1988). **J. Biol. Chem.** 263, 3225.
142. Venable, M.E., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. (1993). **J. Lipid Res.**

-
- 34, 691.
143. Criscuoli, M., Subíssi, A. (1987). **Br. J. Pharmacol.** 90, 203.
144. Terashita, Z.I., Imura, Y., Nishikawa, K. (1985). **J. Pharmacol. Exptl. Ther.** 243, 378.
145. Handley, D.A., Van Valen, R.G., Meladen, M.K., Flury, S., Saunders, R.N. (1986). **Immunopharmacol.** 12, 11.
146. Koltay, M., Hosford, D., Esanu, A., Braquet, P. (1991). **CRC Handbook of PAF and PAF antagonist**. CRC Press. 3.
147. Fernandez-Gallardo, S., Cano, E., Braquet, P., Sánchez-Crespo, M. (1988). **Int. J. Immunopharmacol.** 10, 353.
148. López-Díez, F., Nieto, M.L., Fernandez-Gallardo, S., Gijón, M.A., Sánchez-Crespo, M. (1989). **J. Clin. Invest.** 83, 1733.
149. Kreger, B.E., Craven, D.E., Carling, P.C., McCabe, W.R. (1980). **Am. J. Med.** 68, 332.
150. Sanchez-Crespo, M., Fernandez-Gallardo, S. (1991). **J. Lipid Med.** 4, 125.
151. Glauser, M.P., Zanetti, G., Baumgartner, J.-D., Cohen, J. (1991). **Lancet.** 338, 732.
152. Van der Poll, T. (1992). **B. J. Intens. Care.** 2, 99.
153. Ibbotson, G.C., Wallace, J.L. (1989). **Prostaglandins.** 37, 1237.
154. Aggarwal, B.B., Kohr, W.J., Hass, P.E. y col. (1985). **J. Biol. Chem.** 260, 2345

-
155. Michie, H.R., Manogle, K.R., Spriegs, D.R. y col. (1988). **N. Engl. J. Med.** 318, 1481.
156. Neilson, I.R., Neilson, K.A., Yunis, E.J., Rowe, M.I. (1989). **Surgery.** 106, 439.
157. Sun, X., Hseu, W., Torre-Amione, G. (1990). **Am. J. Pathol.** 136, 949.
158. Ferguson-Chanowitz, K.M., Katocs, Jr. A.S., Pickett, W.C., Kaplan, J.B., Sass, P.M., Oronski, A.L., Kerwar, S.S. (1990). **J. Inf. Dis.** 162, 1081.
159. Everaerd, B., BrouckAert, P., Shaw, A., Fiers, W. (1989). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 163, 378.
160. Rabinovici, R., Yue, T., Feuerstein, G. (1990). **Paf antagonists: New Development for Clinical Application.** Ed. P. Ramwll, Portfolio Publishing Co. 215.
161. Casals-Stenzel, J. (1987). **Eur. J. Pharmacol.** 135, 177.
162. Rabinovici, R., Yue, T., Farhat, M., Smith III, E.F., Esser, K.M., Slivjak, M., Feuerstein, G. (1990). **J. Pharmacol. Exp. Therap.** 255, 256.
163. Casals-Stenzel, J., Muacevic, G., Weber, K.H. (1987). **J. Pharmacol. Exptl. Ther.** 241, 974.
164. Thiemermann, C., Wu, C.C., Szabo, C., Perretti, M., Vane, J.R. (1993). **British J. Pharmacol.** 110, 177.
165. Mozes, T., Ben-Efraim, S., Bonta, I.L. (1992). **Phatologie Biologie.** 40, 807.
166. Roman, J., Fernández, F., Velasco, F., Rojas, R., Roldan, M.R., Torres, A. (1993). **Acta**

-
- Paediatrica.** 82, 352.
167. Informe personal del Dr. F. Emling (1993).
168. Lin, Lin y DeWitt. (1992). **J. Biol. Chem.** 267, 23451.
169. Roscoff y col. (1988). **Cell.** 54, 73.
170. Wiegman y col. (1992). **J. Biol. Chem.** 267, 17997.
171. Dubois, C., Bissonnette, E., Rola-Pleszczyinsk, R. (1989). **J. Inmunol.** 143, 964.
172. Kunkel, S.L. (1988).**Lab. Invest.** 58, 119.
173. Heuer, H.O., Letts, G., Meade, C.J. (1990). **J. Lipid Med.** 2, S101.
174. Stewart, A.G., Harris, T. (1991). **J. Lipid Med.** 3, 125.
175. Bonavida, B., Mencia-Huerta, J.M., Braquet, P. (1989). **Int. Arch. Allergy Appl. Inmunol.** 88, 157.
176. Liu, H., Chao, W., Olson, M.S. (1992). **J. Biol. Chem.** 267, 20811.
177. Weher, C., Aepfelbacher, M., Heinrich, H., Löms Ziegler-Heitbrock, H.W., Weber, P.C. **Eur. J. Immunol.** (1993). 23, 852.