

9

JUAN CARLOS JIMENEZ DE LA PUERTA

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD  
DEL PCA-4248  
EN EL  
TRASPLANTE CARDIACO  
HETEROTOPICO  
EN LA RATA LEWIS**

**DIRECTORES: FIDEL SAN ROMAN ASCASO \***  
**CARLOS SUNKEL LETELIER \*\***

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL II

1993

\* DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL II-FACULTAD DE  
VETERINARIA

\*\* DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION-LABORATORIOS ALTER S.A.

A mi hijo Guillermo

FIDEL SAN ROMAN ASCASO, CATEDRATICO TITULAR DE CIRUGIA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE MADRID, CARLOS SUNKEL LETELIER, DIRECTOR DE INVESTIGACION DE LOS LABORATORIOS ALTER S.A.; COMO DIRECTORES

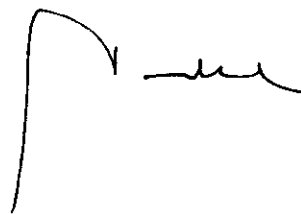
CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado "ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL PCA-4248 EN EL TRASPLANTE CARDIACO HETEROTOPICO EN LA RATA LEWIS", presntado por el Licenciado JUAN CARLOS JIMENEZ DE LA PUERTA y realizado bajo nuestra dirección reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para poderse presentar como Tesis Doctoral.

Y para que así conste a los efectos oportunos firmamos el presente en Madrid a veinticinco de Enero de mil novecientos noventa y tres.



Fdo. F. San Roman Ascaso



Fdo. C. Sunkel Letelier

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en primer lugar al Profesor Fidel San Roman Ascaso, Catedrático de Cirugía de la Facultad de Veterinaria y al Dr. Carlos Sunkel Letelier, Director de Investigación de los Laboratorios Alter, quienes como Directores de esta Tesis, han aportado las orientaciones y sugerencias que me han resultado decisivas para la elaboración de la misma.

Ambos no solo me dedicaron su amplio bagaje científico y técnico, sino que su apoyo moral y humano nunca me fue escatimado.

En segundo lugar, quiero agradecer al Profesor Julio Escalona Zapata, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Gregorio Marañón, su amable y desinteresada ayuda en todo lo relacionado con la histología de esta Tesis. Sus consejos unidos a su paciencia y su buen humor, supusieron para mí un estímulo constante.

A D. Fco. Javier Cillero Corral, Jefe del Departamento de Farmacología y Director Médico de los Laboratorios Alter, por su ayuda e interés, así como por el apoyo recibido para permitirme desarrollar la actividad que profesionalmente más me satisface.

Al profesor Manuel Rodríguez Sánchez, Director del Departamento de Patología Animal II, por las facilidades

prestadas para el desarrollo de esta Tesis, acogiendo mis problemas en todo momento con el mayor interés y proporcionándoles siempre la solución más idónea.

A la Dra. M<sup>a</sup> Antonia Gonzalez Morales, quien con sus conocimientos en el campo de la cardiología, me ayudo en numerosos aspectos de este trabajo, haciendo siempre alarde, frente a mis continuos requerimientos, de una paciencia sin límites.

Al Dr. Juan Sanabria Valdez, que me introdujo en las técnicas de microcirugía y de trasplante.

A D. Fernando Naranjo de la Puerta por su ayuda en el estudio estadístico y por todos los consejos recibidos.

A todo el personal del Departamento de Investigación de los Laboratorios Alter S.A., por su ayuda y apoyo constante durante estos años, sin ellos y sin su afecto, el trabajo de esta Tesis nunca habría sido tan satisfactorio.

A todo el personal del estabulario y muy particularmente a D<sup>a</sup> Paula Pérez Fernández, por su excelente labor profesional con los animales de experimentación, por la ayuda prestada, por su buen humor y su amistad.

A D<sup>a</sup> Adoración Real Zarco por la ayuda prestada.

A todos los miembros del Departamento de Patología Animal II, por su apoyo y ayuda incondicional.

Quiero también expresar mi agradecimiento a todas las entidades que han colaborado en el buen fin de esta Tesis, y muy especialmente a los Laboratorios Alter S.A., por toda la ayuda recibida, por su interés y por los medios

prestados para la consecución final del trabajo.

A mis padres por su ilusión y por los ánimos recibidos en todos los momentos difíciles.

Quiero por último dar las gracias a mi mujer, por su constante estímulo y apoyo moral, por la comprensión, por el tiempo que esta Tesis le ha robado y porque sin ella ésta nunca habría visto la luz.

A todos, GRACIAS.

## **INDICE**

## INTRODUCCION

1.-	<b>Introducción</b>	2
-----	---------------------	---

## REVISION BIBLIOGRAFICA

1.-	<b>Trasplante de órganos</b>	5
1.1.-	Trasplante	5
1.2.-	Trasplante experimental	7
2.-	<b>Rechazo de órganos</b>	9
2.1.-	Complejos de histocompatibilidad	9
2.2.-	Diferenciación de células T	12
2.3.-	Clasificación de reacciones de rechazo	13
2.4.-	Histología del rechazo	15
3.-	<b>Tratamiento</b>	18
3.1.-	Técnicas de inmunosupresión	18
3.2.-	Ciclosporina	22
3.3.-	Efectos adversos de la medicación inmunosupresora	29
3.4.-	Tratamientos experimentales en el trasplante de órganos	31
4.-	<b>Factor de activación plaquetaria</b>	34
4.1.-	Factor de activación plaquetaria	34
4.2.-	Efectos como mediador	35
4.3.-	El PAF y otros mediadores inflamatorios	38
4.4.-	PAF y citokinas	39
4.5.-	PAF en rechazo de órganos	42
5.-	<b>Antagonistas del Factor de activación plaquetaria</b>	43

5.1.-	Compuestos con actividad antagonista de PAF . . . . .	43
5.2.-	PCA-4248 . . . . .	48
5.3.-	Antagonistas de PAF como agentes terapéuticos . . . . .	50
5.4.-	Antagonistas de PAF en el trasplante de órganos . . . . .	54

## **OBJETIVOS**

1.-	Objetivos . . . . .	56
-----	---------------------	----

## **MATERIAL Y METODOS**

1.-	Cepas y condiciones de estabulación . . . . .	58
2.-	Grupos de estudio . . . . .	59
3.-	Técnica quirúrgica . . . . .	63
4.-	Control de viabilidad . . . . .	71
5.-	Histología . . . . .	72
6.-	Análisis estadístico . . . . .	73

## **RESULTADOS**

1.-	Técnica quirúrgica . . . . .	76
2.-	Evolución de pesos . . . . .	76
3.-	Control de viabilidad . . . . .	79
3.1.-	Palpación . . . . .	79
3.2.-	Electrocardiografía . . . . .	81
4.-	Valoración de grupos de ciclosporina . . . . .	101

5.-	<b>Supervivencia</b>	101
6.-	<b>Histología</b>	105
6.1.-	Intensidad inflamatoria	108
6.2.-	Blastos	114
6.3.-	Edema	120
6.4.-	Necrosis miocelular	125
6.5.-	Vasculitis	130
6.6.-	Infarto subendocárdico	139

## **DISCUSION**

1.-	<b>Técnica quirúrgica</b>	142
2.-	<b>Evolución de pesos</b>	144
3.-	<b>Control de viabilidad</b>	145
4.-	<b>Valoración de la dosis de ciclosporina</b>	147
5.-	<b>Supervivencia</b>	148
6.-	<b>Histopatología</b>	150
6.1.-	Intensidad inflamatoria total	151
6.2.-	Blastos	153
6.3.-	Edema	154
6.4.-	Necrosis miocelular	155
6.5.-	Vasculitis	156
6.6.-	Infarto	157
7.-	<b>Evaluación conjunta</b>	158

## **CONCLUSIONES**

1.-	<b>Conclusiones</b>	163
-----	---------------------	-----

**RESUMEN**

1.- **Resumen** . . . . . 166  
2.- **Summary** . . . . . 167

**BIBLIOGRAFIA**

1.- **Bibliografía** . . . . . 169

## Relación de abreviaturas:

A-V.- Aurículo-ventricular  
BCDF.- Factor de estimulación de células B  
BN.- Rata de cepa Brow Norway  
BSA.- Seroalbúmina bovina  
CTL.- Linfocitos T citotóxicos  
CVP.- Complejo ventricular prematuro  
CyA.- Ciclosporina  
DT.- Desviación típica  
ECG.- Electrocardiograma  
ETM.- Error típico de la media  
F<sub>1</sub>.- Animal híbrido de la primera generación  
GM-CSF.- Factor estimulador de granulocitos-monocitos  
H-E.- Hematoxilina-eosina  
HLA.- Antígeno leucocitario humano  
IFN.- Interferón  
IL.- Interleukina  
IV.- Vía intravenosa  
LPS.- Lipopolisacárido  
LT.- Leucotrieno  
LW.- Rata de cepa Lewis  
MDP.- Muramil dipéptido  
MHC.- Complejo Principal de Histocompatibilidad  
PAF.- Factor de activación plaquetaria  
PAF-aceter.- Factor de activación plaquetaria  
Tc.- Linfocitos T citóxicos  
Th.- Linfocitos T cooperadores  
TNF.- Factor necrosante de tumores  
TX.- Tromboxano

## **INTRODUCCION**

El trasplante de corazón es el tratamiento de elección para los estados finales de insuficiencia cardíaca.

La introducción de la ciclosporina en los años 80, representó el mayor avance terapéutico en el trasplante de órganos. La inclusión de ésta como parte del régimen inmunosupresor trajo como consecuencia una reducción en la presentación de episodios de rechazo y de las complicaciones infecciosas.

Pero la ciclosporina no es un arma inocua y sus efectos secundarios, sobre todo su importante nefrotoxicidad, pueden limitar la terapia prolongada con esta droga.

Las actuales pautas terapéuticas tienden por ello a disminuir la dosis de ciclosporina, usando la asociación de varias drogas inmunosupresoras, siendo la basada en una triple terapia con ciclosporina, azathioprina y prednisona, la más ampliamente difundida en la actualidad. Aun con esta forma de tratamiento que reduce considerablemente la dosis de ciclosporina, los niveles de ésta en sangre deben monitorizarse cuidadosamente para evitar la variaciones de los mismos que pudieran desequilibrar el estrecho margen terapéutico en un sentido u otro.

La supervivencia a mejorado significativamente, superando

un 72% los primeros 5 años, pero la mortalidad durante el primer año está relacionada en más de un 70% con infecciones o rechazo y por tanto con problemas asociados con la medicación inmunosupresora.

Es por todo ello que son numerosos los trabajos encaminados a conseguir la mejoría de esta terapia, bien por el desarrollo de nuevos agentes inmunosupresores, o por combinación de éstos con drogas que afectan de algún modo al conjunto de acontecimientos que tienen lugar cuando un alotrasplante es introducido y reconocido por el organismo.

En este sentido, distintas drogas que afectan al sistema prostaglandina-tromboxano, han sido y son en este momento una vía importante de trabajo, tanto a nivel experimental como clínico.

Un grupo de drogas con unas características no inmunosupresoras per se, pero que actúan reduciendo la permeabilidad vascular y protegiendo al endotelio por un efecto antagonista sobre el denominado Factor de Activación Plaquetaria, podrían tener una acción protectora en combinación con la ciclosporina sobre la evolución de los alotrasplantes.

El propósito de este trabajo es estudiar la acción de una de estas drogas antagonistas del Factor de Activación Plaquetaria, la denominada PCA-4248, un derivado de la 1,4-dihidropiridina desarrollado por los Laboratorios Alter S.A.

**REVISION BIBLIOGRAFICA**

## **1.- TRASPLANTE DE ORGANOS**

### **1.1.- Trasplante**

El trasplante de órganos es en estos momentos, una técnica incorporada al arsenal terapéutico con sus indicaciones y contraindicaciones perfectamente establecidas.

En la actualidad se realizan aproximadamente 15 formas de trasplante de tejidos y órganos, siendo los de córnea, riñón y médula ósea los más extendidos, seguidos de los de corazón e hígado.

Los últimos datos publicados por el Ministerio de Sanidad y Consumo en el año 1989, reflejan a través del informe presentado por el grupo de expertos de la Organización Nacional de Trasplantes, el estado evolutivo, el desarrollo y el futuro del trasplante de órganos. Desde que se realiza el primer trasplante renal en España, el 23 de Abril de 1965, el incremento ha sido espectacular, siendo la fecha de 1983, cuando se produce la estabilización de los programas de trasplante renal, córnea y médula ósea y la aparición de los de corazón e hígado; en el año 1987 se sobrepasa la cifra de 1.000 trasplantes renales y 50 cardíacos.

Los factores responsables del progreso en este campo son:

1 - La óptima selección de receptores y donantes, gracias a los grandes avances en el campo de la inmunología e histocompatibilidad.

2 - La mejora de las técnicas quirúrgicas.

3 - La mejora en la preservación de órganos (para trasplantes que como el de corazón e hígado presentan cortos períodos de preservación).

4 - El avance en el diagnóstico precoz del rechazo agudo y de las complicaciones. Actualmente se realizan biopsias endomiocárdicas como procedimiento de elección para el diagnóstico de rechazo en pacientes mayores de 6 meses o con un peso superior a los 5 kg.

5 - Las nuevas drogas inmunosupresoras.

Las infecciones causadas por bacterias, virus, hongos, protozoos y otros son, no obstante, sin lugar a dudas una de las complicaciones temidas de los trasplantes, a causa de este tipo de medicación inmunosupresora.

Los trasplantes de órganos no son una cura, ya que debemos tener en cuenta que un adecuado tratamiento a largo plazo es imprescindible para un resultado satisfactorio. Debido a que la mayoría de las complicaciones son el resultado de los efectos adversos de la inmunosupresión, se requiere un adecuado equilibrio entre la correcta inmunosupresión y el control de la morbilidad relacionada con las drogas utilizadas. Por ejemplo, la esperanza de supervivencia después de un trasplante cardíaco es de un 80-90% para un año y de un 60-70% para 5 años (O'Connell et al.1992).

Además de los efectos adversos de la inmunosupresión, otro de los factores limitantes para la supervivencia a largo plazo de los trasplantes cardíacos es la vasculopatía del corazón trasplantado, que presenta una prevalencia aproximada de un 10-15% en el primer año, 15-25% en el 2º año y 35-50% a los 5 años del trasplante (O'Connell et al.1992). Aunque la inmunopatogénesis de esta alteración es actualmente desconocida las evidencias sugieren que deriva de una lesión inmuno-mediada (Uretsky et al.1987, O'Connell et al.1992, Mann, 1992).

### **1.2.- Trasplante experimental**

Los primeros estudios con éxito de trasplantes experimentales, comienzan posiblemente en el año 1912, cuando Guthrie (Guthrie, 1912) persuade a Carrel de incluir la íntima en la anastomosis arterial. Aunque los trasplantes de pulmón-corazón de Carrel no funcionaron, la técnica de la anastomosis de pequeños vasos fue crucial para el futuro de los estudios de trasplantes. En el año 1933 Mann (Mann et al. 1933) realiza trasplantes cardíacos heterotópicos en perros, situando el corazón en el cuello del receptor, y observando un rechazo dentro de los ocho días siguientes al trasplante.

Demikhov en los años 1948-50 (Demikhov et al. 1950, Sinitsyn, 1948) consigue con éxito el trasplante de corazón y pulmón-corazón de forma hetero y ortotópica en perros. Sayegh, (Sayegh et al. 1957) consigue supervivencias, en trasplantes cardíacos en conejos, de 24 días . El trasplante cardíaco heterotópico en la rata, fue conseguido por Abbot

(Abbot et al. 1964), estableciendo una anastomosis termino-terminal entre la aorta cardíaca del donante y la aorta abdominal del receptor, y entre el tronco pulmonar y la vena cava caudal, dando como consecuencia una obstrucción del flujo sanguíneo en el receptor y una frecuente parálisis de los miembros posteriores. Dos años después Tomita (Tomita, 1966), modifica esta técnica usando una anastomosis término-lateral y en 1969 Ono y Lindsey (Ono y Lindsey 1969) establecen un modelo, a partir del modelo de Abbot, así mismo con anastomosis término-laterales en los vasos abdominales, que pasa a ser la base de la gran mayoría de las técnicas de trasplante cardíaco heterotópico.

En los últimos años, numerosos modelos se han desarrollado para el estudio experimental de los trasplantes:

Lee (Lee et al. 1982) presenta un modelo de trasplante cardíaco en rata, realizado con una única anastomosis entre la aorta del donante y la aorta abdominal del receptor, dejando para que ello sea posible el lóbulo pulmonar anterior derecho, simplificando por lo tanto la técnica de anastomosis y acortando el tiempo de isquemia caliente, pero siendo algo más compleja y delicada la disección y extracción del corazón donante.

Olausson (Olausson et al. 1984) sitúa su modelo en el cuello del receptor, utilizando una técnica de no-sutura mediante cuff vasculares (con tubo plástico de 1,19-1,40 mm Ø) entre la aorta y la arteria carótida común derecha y entre el tronco pulmonar y la vena yugular.

Rao (Rao et al. 1985) realiza un estudio sobre el trasplante cardíaco situado en la rodilla de la rata, con

dos tipos de anastomosis, una término-lateral entre la aorta y la arteria femoral y otra término-terminal entre la arteria carótida común izquierda en su origen en el arco aórtico y la arteria femoral y entre la arteria pulmonar izquierda y la vena femoral. Modelo útil en estudios de evaluación del trasplante.

Umeki (Umeki et al. 1987) describe una técnica para anastomosar vasos de distinto calibre, realizando con ella una anastomosis término-terminal de la aorta y el troco pulmonar con los vasos femorales, ubicando el corazón en la rodilla de la rata.

## **2.- RECHAZO DE ORGANOS**

### **2.1.- Complejos de histocompatibilidad**

Los trasplantes realizados entre individuos genéticamente dispares (alotrasplantes) son rechazados en gran parte a causa de la barrera que suponen los aloantígenos codificados por los MHC (major histocompatibility complex). El MHC humano, llamado complejo HLA (human leukocyte antigen) comprende más de  $3,5 \times 10^6$  parejas de ADN en una corta rama del cromosoma 6 (2% del cromosoma) (Robinson et al. 1989). Codifica las glucoproteínas de superficie celular Clase I (HLA-A, B y C) y Clase II (HLA-DP, DQ y DR) que determinan el reconocimiento de antígenos por linfocitos T. Las moléculas Clase I son expresadas por la mayoría de células y tejidos mientras que las moléculas Clase II son expresadas por solo

un pequeño número de células (linfocitos B, macrófagos, monocitos y células dentríticas foliculares), pero pueden ser inducidas por interferón y otros agentes en otros varios tipos celulares (linfocitos T, células endoteliales, células del túbulo renal y células  $\beta$  pancreáticas)(Krensky et al. 1990).

El proceso por el cual las diferencias de MHC derivan en un rechazo del órgano es debido a una variación del normal funcionamiento de estas moléculas. El receptor antigénico de un linfocito T interacciona específicamente con un compuesto formado por un fragmento de péptido de una proteína exterior y la ranura de unión peptídica de una molécula de MHC, por tanto la función fisiológica de una molécula de MHC es presentadora de antígenos a los receptores de células T (Davis et al. 1988).

Esta interacción dispara señales transmembrana que derivan en una activación celular. Durante este proceso, los linfocitos T en relativo reposo, sufren complejos cambios intracelulares que culminan en la diferenciación y proliferación de linfocitos T antígeno-específicos. A los pocos segundos o minutos de la adición a las células T de antígeno se produce un aumento de unas diez veces en los niveles de calcio libre que es mantenido durante horas y también se produce una activación de la protein-kinasa C (Nishizuka, 1986). La idea por la cual la iniciación de estos eventos es fisiológicamente importante, se mantiene por la observación de como determinados agentes farmacológicos, que los inducen, consiguen que las células T produzcan linfokinas, proliferen, se diferencien en células citolíticas y activen mecanismos

citolíticos (Weis et al. 1987).

Existen una serie de factores que influyen en la expresión de los MHC (Halloran et al. 1986) y que pueden sumariarse en:

<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>
1. Ontogenia y diferenciación	1. Transformación maligna
2. Activación celular	2. $\alpha$ -fetoproteína
3. Interferón	3. Ciclosporina
4. Interleukinas en general	4. Glucocorticoides
5. Calcitriol	5. Cloramfenicol
6. Infección vírica	6. Infección vírica
7. Lipopolisacáridos	7. Lipopolisacáridos
8. Indometacina	8. Prostaglandinas
9. Butirato sódico	9. Membrana vesicular de células tumorales
10. Hormonas lactogénicas	10. Unión con receptores $F_c$
11. Genes no-MHC	11. Berilio

Otros antígenos de histocompatibilidad (no MHC) pueden tener un importante papel en el rechazo de órganos, éstos incluyen los antígenos eritrocíticos humanos ABO, Lewis y Rh.

En rata el sistema antigénico eritrocítico RT2, podría ser comparado con el ABO humano, tiene dos alelos condominantes, el a y el b, no ligados al MHC. El RT3 es otro antígeno eritrocítico comparable al Rh humano, que tiene un único

alelo dominante, el a, y uno nulo, el b. El RT8, de desconocido significado funcional en trasplantes y encontrado el dominante a, únicamente en la cepa SHR. Otro aloantígeno codificado por genes no-MHC que es serológicamente activo es el RT6(ART2,Ag.F), un antígeno de linfocitos T, ligado al locus albino (c), su significado funcional no está claro, y podría no ser un antígeno de histocompatibilidad. (Katz et al. 1983)

## **2.2.- Diferenciación de células T**

Las células T en reposo reconocen los antígenos solo después de ser éstos mostrados en la superficie de un macrófago u otra célula presentadora de antígenos, en asociación física con una molécula de histocompatibilidad, y en presencia de una citokina, la interleukina-1, se convierten en una célula T activada; como consecuencia de esta activación los linfocitos sintetizan una variedad de proteínas, de las cuales algunas son secretadas y otras quedan asociadas a la membrana, a estas proteínas se las denomina genéricamente linfocinas y actúan sobre una gran variedad de células involucradas en la respuesta inmune (Dinarello et al. 1987). Los genes que codifican la interleucina-2 y el receptor de interleucina-2 están entre los primeros en ser activados y sus productos son esenciales en la proliferación de las células T.

La interleucina-2 es una proteína con un peso molecular de 15.000 que tiene varias funciones inmunológicas, siendo la más importante la capacidad para iniciar la proliferación

de células T activadas (Morgan et al. 1976). Los receptores de interleucina-2 aparecen dentro de las primeras horas de la activación, la unión de la interleucina-2 con estos receptores origina la expansión clonal de células T activadas para un antígeno específico, la eliminación del antígeno deriva en la involución del receptor de interleucina-2 y el cese de la proliferación de células T (Cantrel et al. 1983). Al mismo tiempo la interleucina-2 es fundamental en la expansión clonal de las células T citotóxicas.

Las células T activadas producen además  $\gamma$ -Interferon ( $\gamma$ -IFN) que aumenta la expresión de MHC clase I y clase II, y otros antígenos de superficie en una gran variedad de células, y aumenta la actividad de las células NK (natural-killer cell).

La interleucina-3, junto con el GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) promueven el crecimiento de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos a partir de médula ósea.

La interleucina-4, en unión con el factor de estimulación de las células B (BCDF), y también junto con la IL-1 y la IL-2, actúan sobre células B ya activadas por el antígeno, induciendo su proliferación y su diferenciación en células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas (Dinarello et al. 1987).

### **2.3.- Clasificación de las reacciones de rechazo.**

El momento del comienzo, gravedad y duración de las reacciones de rechazo, vienen determinadas por varios

factores. La importancia de la disparidad genética entre el donante y el receptor, la posibilidad de que el receptor haya sido sensibilizado a tejidos antigénicos del donante, por previas transfusiones de sangre o previos procedimientos de trasplante. Podemos clasificar tres tipos de reacciones de rechazo (Kirkpatrick et al. 1992).

1) **Rechazo hiperagudo.**- Ocurre entre unos minutos y unos pocos días después de la implantación, la reacción hiperaguda es mediada por anticuerpos preexistentes del receptor que actúan directamente contra el órgano del donante. La fase de lesión tisular es iniciada por activación del complemento y mediada por productos inflamatorios y la activación del sistema de coagulación. Existe una forma hiperaguda, denominada acelerada, que puede ocurrir a los pocos días del trasplante que es mediada por linfocitos T y sus productos, pero no por anticuerpos.

2) **Rechazo agudo.**- Comienza durante la segunda semana después del trasplante, pero puede no observarse durante varias semanas, si se aplica terapia inmunosupresora. Dos mecanismos pueden producirlo, uno es mediado por linfocitos T, y otro por anticuerpos de nueva formación producidos por el receptor.

3) **Rechazo crónico.**- La reacción puede no aparecer durante meses e inclusive años, después de un trasplante con éxito. Los cambios son debidos a procesos inflamatorios inmunológicos crónicos que actúan directamente contra el endotelio vascular con formación de agregados de fibrina y plaquetas. Los linfocitos T y las inmunoglobulinas participan en este proceso.

#### 2.4.- Histología del rechazo.

Como hemos visto anteriormente los linfocitos T en reposo, también denominados células T helper (Th), reconocen un antígeno de histocompatibilidad mediante sus receptores antigénicos específicos, siendo estimuladas a proliferar mediante el "coestimulador" IL-1 producido por las células presentadoras de antígenos "estimuladoras", estas células pueden transformarse en células de memoria, capaces de responder cuando son reexpuestas al mismo antígeno in vitro (HÄyry 1976). Los linfocitos citotóxicos precursores, capaces de reconocer antígenos clase I en las células presentadoras de antígenos, son inducidos a proliferar por la IL-2 producida por los Th, produciéndose linfocitos T citotóxicos maduros (CTL). A partir por tanto del reconocimiento antigénico, comienza a producirse la fuerte respuesta inmunitaria encaminada a la destrucción del trasplante.

Los conceptos básicos de los fenómenos inflamatorios que tienen lugar durante el rechazo de un alotrasplante fueron desarrollados en estudios clásicos durante los años cincuenta y sesenta, utilizando técnicas histológicas comunes, comenzando poco después las técnicas de inmunofluorescencia que facilitaron el análisis del componente humoral y también del inflamatorio.

Excluyendo el rechazo hiperagudo, el análisis histopatológico pone de manifiesto dos vías principales para el rechazo temprano de un alotrasplante. El *rechazo celular* indica el acúmulo de células inflamatorias, predominantemente linfocitos, blastos y fagocitos mononucleares, primeramente

alrededor de los vasos sanguíneos y posteriormente a través del parénquima (Porter 1967). La principal característica del *rechazo vascular* es un engrosamiento de la fibroíntima de las arterias del trasplante que eventualmente puede producir la obliteración de dichas arterias. A la primera vía se le ha denominado *inmunidad celular* y a la segunda, *inmunidad humoral*, obviamente la mayoría de los rechazos son una mezcla de las dos vías.

Strom (Strom et al. 1977) analiza el infiltrado de un alotrasplante cardíaco en rata, señalando que la mayoría de las células inflamatorias son linfocitos T y un 20% son linfocitos B, siendo los macrófagos menos de un 10% del infiltrado. La primera célula inflamatoria que invade un alotrasplante no modificado por fármacos son los linfocitos y monocitos; siendo entre las diferentes subcepas de células linfoides la de los gruesos linfocitos granulares las primeras en aparecer (Häyry et al. 1979). Estos aumentan rápidamente en número, alcanzando el máximo al cuarto día y desapareciendo poco después (Nemlander et al. 1983). El primer blasto linfoide aparece al segundo día con un máximo entre los días cinco y siete, declinando después lentamente; la maduración de monocitos provenientes de sangre en macrófagos de tejidos es una característica de rechazo irreversible. Los granulocitos son relativamente escasos hasta últimas fases del rechazo, cuando ya aparecen cambios necróticos en el mismo (Häyry 1984).

Las plaquetas están también íntimamente ligadas al rechazo, la agregación plaquetaria en un alotrasplante renal, ocurre muy rápidamente después del comienzo de la inflamación

y la línea ascendente de acúmulo prácticamente se solapa con la línea ascendente de la respuesta inflamatoria (Häyry et al. 1979).

Se conoce poco sobre como los diferentes tipos de células inflamatorias en colaboración con los anticuerpos, destruyen el trasplante. Considerando la directa actividad lítica de los leucocitos inflamatorios, existen singulares variaciones en la sensibilidad de los diferentes componentes del trasplante.

Células linfoides inmunes, recolectadas del bazo de una rata receptora de un alotrasplante cardíaco, son directamente citotóxicas para las células linfoides de la cepa donante in vitro (Parthenais et al. 1979). Cuando se analizan frente a diferentes fracciones de corazón de la cepa donante, las células del bazo destruyen las células endoteliales, pero no las miocárdicas, si se añaden pequeñas cantidades de aloantígeno, se produce una sensibilidad de la célula miocárdica a la actividad lítica. Una razón para esta diferencia podría estar en la diferente distribución antigénica en estas estructuras, determinadas cantidades de MHC clase I se han demostrado en células endoteliales del corazón de rata, pero no se han detectado en células miocárdicas (von Willebrand et al. 1980).

Los estudios experimentales del mecanismo del **rechazo hiperagudo** han demostrado que el primer lugar para el comienzo de la reacción es el endotelio capilar del órgano trasplantado (Busch et al. 1975, Forbes et al, 1975). Después del trasplante, se produce un extenso bloqueo del sistema microvascular por agregados de plaquetas, neutrófilos y

fibrina. Esta reacción depende de la activación del complemento y da como resultado una vasoconstricción y una coagulación intravascular diseminada del lecho microvascular, lo que produce una necrosis isquémica del órgano trasplantado.

### **3.- TRATAMIENTO**

#### **3.1.- Técnicas de inmunosupresión.**

El actual nivel de éxito del trasplante de órganos está íntimamente ligado a la disponibilidad de agentes que previenen o atenúan el rechazo. Entre ellos cabe destacar.

**La azathioprina** es uno de los primeros fármacos inmunosupresores utilizados en el campo de los trasplantes, iniciándose su uso a principios de los años sesenta, es rápidamente metabolizada en 6-mercaptopurina, derivando su efecto inmunosupresor de la inhibición de la síntesis de purina, disminuyendo como consecuencia la síntesis de DNA, RNA, proteínas y coenzimas (Chan et al. 1990) y finalmente la proliferación de linfocitos. Es degradada por la xantina-oxidasa a ácido 6-tioúrico, el cual es excretado por los riñones y no tiene efectos inmunosupresores (Chan et al. 1989). La principal consecuencia clínica con el uso de la azatioprina es la supresión de la médula ósea, manifestada por una intensa leucopenia, con un incremento importante del riesgo de infección; este efecto limita la dosis de droga que puede ser usada dentro de los márgenes de seguridad. El uso de alopurinol (inhibidor de la xantina-oxidasa) aumenta el efecto de la azatioprina, debiendo reducir la dosis a un cuarto de la habitual.

### **Efectos adversos de la Azathioprina**

---

Leucopenia  
Pancreatitis  
Hepatitis  
Alopecia  
Colestasis  
Aumento del riesgo de cáncer

---

**Los corticoides** (prednisona, prednisolona y metil-prednisolona) han sido usados en la profilaxis y en el tratamiento del rechazo de órganos, desde el comienzo de los trasplantes clínicos. Modifican la transcripción del RNA mensajero en células B y T y la producción de citocinas, bloqueando el reconocimiento antigénico y la acción linfocítica (Woodley et al.1990). Sus efectos adversos son múltiples, lo que lleva a importantes esfuerzos para reducir la dosis empleada, con un uso en la mayoría de los casos de altas dosis de metil-prednisolona en el período perioperatorio inmediato y posteriormente la administración de prednisona a dosis mucho más reducidas e inclusive con una administración discontinua (Renlund et al. 1987, O'Connell et al. 1992). Las interacciones con otras drogas son múltiples, pero generalmente carecen de significación clínica.

### **Efectos adversos de los corticoides**

---

Síndrome de Cushing  
Necrosis aséptica ósea  
Osteoporosis  
Hiperglucemia  
Miopatía  
Ulceraciones  
Hipercolesterolemia

---

**Las globulinas policlonales antilinfocíticas**, que incluyen globulinas antitimocitos, antilinfocitos y

antilifoblastos, que son obtenidas por sensibilización de animales por la inyección de estas células. La administración del antisuero disminuye de forma selectiva la población de células T. Su indicación fundamental está en el tratamiento del rechazo agudo. Sus efectos secundarios varían en relación a la exacta naturaleza de la preparación utilizada, dada la gran variación de los lotes en términos de eficacia y pureza (Chan et al. 1990).

#### **Efectos adversos de las G.P.A.**

---

Fiebre  
Dolores articulares  
Enfermedad del suero  
Leucopenia  
Trombocitopenia

---

**Los anticuerpos monoclonales.** El principal (único comercializado en la actualidad) se trata de una inmunoglobulina de ratón (IgG2a), denominada OKT3, que es específica contra el marcador antigénico CD3 que existe en todos los linfocitos maduros (Tood et al. 1989). Su unión al receptor CD3 produce la opsonización de las células T circulantes y facilita su eliminación por el sistema reticulo-endotelial (Tood et al. 1989). La disminución de células T circulantes es completa aproximadamente una hora después de la administración de OKT3 (Bach et al. 1987). Al mismo tiempo, incluso sin la eliminación de estas células, el OKT3 altera el receptor CD3, dejando a las células T inmunológicamente inertes. La administración inicial de OKT3 produce una liberación masiva, aunque transitoria, de linfocinas lo que ocasiona numerosos efectos no deseables que deben ser

atenuados con una apropiada premedicación (Chan et al. 1990, Charpentier et al. 1991). El OKT3, puede ser antigénico y producir una respuesta de anticuerpos anti-OKT3, que en pacientes inmunodeprimidos, rara vez debería de notarse, pero que habrían de monitorizarse en caso de reutilizar el OKT3 para el tratamiento de un rechazo agudo. Se utiliza de forma efectiva en la terapia inmediata postrasplante (unos 14 días) y como tratamiento en el rechazo agudo.

#### **Efectos adversos del OKT3**

---

Fiebre elevada  
Temblores  
Trastornos digestivos (vómitos, diarrea)  
Enfermedad del suero  
Hipotensión  
Edema pulmonar  
Meningitis

---

**La irradiación linfoide total** ha sido efectiva en pacientes que han tenido episodios recurrentes de rechazo (Levin et al. 1989). En el protocolo más habitual se realizan 10 sesiones de 80 rad en un tiempo de dos semanas, llevando a cabo una especial vigilancia del hemograma (McGoon et al. 1992)

**El Metotrexate** es un análogo del ácido fólico que inhibe la síntesis de DNA y la división celular por unión competitiva a la hidrofólico-reductasa, es una potente droga citostática, utilizada en neoplasias y enfermedades autoinmunes. Se ha utilizado en rechazos recurrentes con óptimos resultados (Constanzo-Nordin et al. 1988, Olsen et al. 1990)

**El FK-506** es un nuevo macrólido fúngico descubierto en 1984, con una potente acción inmunosupresora (Morris et al. 1989). Sus propiedades inmunosupresoras son muy similares a las de la ciclosporina suprimiendo la activación de linfocitos T, la producción y expresión de interleucina-2 y la inhibición de otras citocinas. Su potencia en la inhibición de linfocitos se manifiesta a una concentración 100 veces menor que la de la ciclosporina.

Su uso en sustitución de la ciclosporina en la fase inmediatamente posterior al trasplante está en fase de ensayo. Entre los problemas que se han presentado está la nefrotoxicidad, que disminuye al bajar las dosis, la hipertensión, mucho menos común que con la ciclosporina, al mismo tiempo parece producir una importante neurotoxicidad, (34% de incidencia, 6% con muerte en coma. Congress of the transplantation society - Paris, 1992) y un efecto diabetógeno. (Armitage et al. 1991) (Starzl et al. 1991)

**La Rapamicina** es un metabolito fúngico del *Streptomyces higoscopicus* que además de sus efectos como antibiótico inhibe la proliferación de linfocitos y también inhibe la activación de las células T y B (McGoon et al. 1992).

### **3.2.- Ciclosporina**

La ciclosporina es un endecapéptido cíclico, extraído del *Tolypocladium inflatum* Gams; que rápidamente se ha

convertido en el soporte principal de la terapia inmunosupresora.

Primeramente descrita como un agente antilinfocítico (Borel et al. 1976), mostró ser un poderoso agente inmunosupresor en trasplantes experimentales (Kostakis et al. 1977, Calne et al. 1977, Morris 1981) y posteriormente su potencial en trasplantes humanos (Calne et al. 1979, Najarian et al. 1983, Hakala et al. 1983).

Los aminoácidos en posiciones 11, 1, 2 y 3 integran el lugar hidrofílico inmunosupresor (Fig. 1). Todas las estructuras relacionadas, tanto naturales como sintéticas, por sustitución o pérdidas en la estructura del anillo, tienen menor actividad inmunosupresora que la ciclosporina (Wenger R.M. 1988).

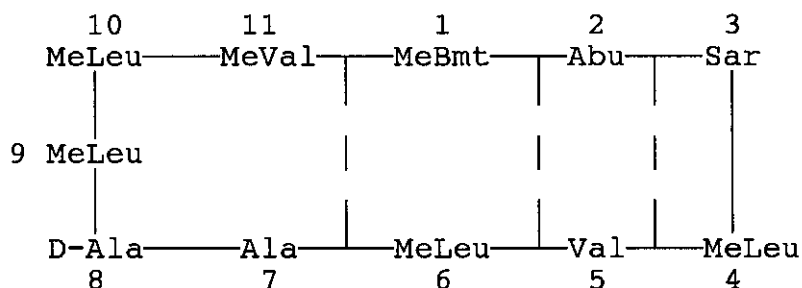


Fig.1.- Alineamiento de aminoácidos en la ciclosporina.

La ciclosporina es metabolizada por vía hepática mediante el sistema citocromo P-450 (Bertault-Peres et al. 1987), por lo tanto la coadministración de drogas que interaccionen con este sistema (Tabla 1), puede afectar al metabolismo de la ciclosporina. Los inhibidores (antagonistas de canales de calcio, metil prednisolona, Ketoconazol, etc.) aumentan

los niveles de ciclosporina, disminuyendo la dosis a administrar y su costo; mientras los inductores (rifamicina, fenobarbital, valproato, etc.) los disminuyen.

Aumento	Disminución
Cimetidina	Etanol
Ciprofloxacina	Isoniacida
Eritromicina	Fenobarbital
Ketoconazol	Fenitoina
Metoclopramida	Sulfametoxazol
Ranitidina	Colestiramina
Verapamil	Rifamicina
Nicardipina	Valproato
Diltiazem	

Tabla n° 1.- Drogas que pueden afectar el metabolismo de la ciclosporina.

Por ello es fundamental la medición de niveles de ciclosporina frecuentemente, sobre todo cuando se añaden nuevas drogas al régimen terapéutico.

La ciclosporina, no inhibe los acontecimientos de Jenkinsmembrana inmediatos al disparo del receptor antigénico como son la generación de inositol 1,4,5-trifosfato o la movilización del calcio sino que tiene una acción selectiva sobre las células T, que deriva de su capacidad para bloquear la activación transcripcional de los genes de linfocinas como son la interleukina 2, interleukina 4 y gamma interferón durante el proceso de producción y proliferación de las células T (Larsson, 1982, Bunjes et al. 1981, Pereira et al. 1987, Emmel et al. 1989).

El timo puede representar un importante lugar de acción de la ciclosporina, la droga disminuye el número total de timocitos y también anula el desarrollo intratímico de las

células T. Esto trae como consecuencia la reducción en la producción de linfocinas y de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de las células T (Jenkins et al. 1988).

La presencia de ciclosporina no afecta la unión de antígenos extraños a las distintas regiones de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de los receptores de células T y el estímulo del mensaje de transducción a través del complejo CD3, de la misma manera la vía mediada por el complejo CD2, la cual activa la proteincinasa-C, es resistente a la droga (Kahan, 1989).

La ciclosporina no altera la actividad fagocítica, quimiotáctica o citotóxica de los macrófagos, teniendo solo un muy ligero efecto sobre las células accesorias, inhibiendo la maduración linfocina-dependiente de elementos secretorios y catabolismo antigénico, disminuyendo la expresión en la superficie celular del MHC tipo II y alterando la síntesis de prostaglandina  $E_2$ ; más probablemente, el único efecto apreciable de la ciclosporina sobre las células accesorias sea la ruptura de la interacción, mediada por linfocinas, de linfocitos T y macrófagos (Kahan, 1989).

La absorción de esta droga altamente lipofílica está afectada por el contenido graso de comidas y la liberación de ácidos biliares en el yeyuno proximal (Kahan et al. 1983), por tanto las anomalías en la función gastrointestinal, pueden disminuir intensamente la absorción de la droga. En general su farmacocinética varía no solo de un paciente a otro sino en el mismo paciente a lo largo del tiempo, encontrando marcadas diferencias en la biodisponibilidad (Ginsberg, 1991). La monitorización de los niveles sanguíneos de ciclosporina es de gran utilidad; 250 ng/mL se requieren en el momento

del trasplante que serán reducidos a 50-100 ng/mL 3 a 6 meses después para evitar la toxicidad orgánica de la ciclosporina (Keown, 1988).

Las ventajas de la ciclosporina sobre otros tratamientos son su efectividad, carencia de mielotoxicidad, (Granelli-Piperno et al. 1986) baja incidencia de infecciones postoperatorias, reducido porcentaje y severidad de los episodios de rechazo, consiguiendo una disminución de esteroides. También se produce un importante sinergismo con otras drogas inmunosupresoras (Kahan, 1989). Por todo ello ha revolucionado el campo del trasplante de órganos.

Como contrapartida están los efectos tóxicos, siendo numerosos, debemos de ellos destacar:

- Neurológicos.- Parestesias, depresión, cefaleas, somnolencia y aparición de cuadros convulsivos. La existencia de neurotoxicosis, podría estar relacionada con un aumento del contenido cerebral de agua.

- Dérmicos.- Hipertricosis, aumento de fibroblastos gingivales y de la producción de colágeno por ellos, ocasionando hiperplasia gingival.

- Endocrinos.- Aumenta los niveles de prolactina y disminuye los de testosterona, dando lugar a la aparición de ginecomastia. También ocasionalmente puede producir hiperglucemia, que puede ser reflejo de una alteración en la síntesis de glucógeno hepático.

- Hepáticos.- Aumenta la incidencia de colestasis con hiperbilirrubinemia y elevación de alanino aminotransferasa.

- Huesos.- Generalmente se elevan los niveles de fosfatasa alcalina, reflejando un aumento de la actividad

remodeladora ósea.

- Complicaciones vasculares y hematológicas.- Incremento de la incidencia de trombosis, aumento en la liberación de tromboxano A<sub>2</sub>, aumento de tromboplastina y disminución de la producción de prostaciclina por las células endoteliales, lo que podría explicar la arteriopatía y adhesión plaquetaria que dan como resultado una trombosis glomerular.

- Hipertensión.- Se han descrito dos síndromes, una elevación aguda de la presión arterial durante el inicio de la terapia y una elevación crónica durante la administración por largos períodos de tiempo, desarrollándose ésta entre un 30 a un 90% de los pacientes tratados (Weidle et al. 1988). El mecanismo por el que se produce no es conocido, si bien parece ser estaría implicado el sistema nervioso simpático (Morgan et al. 1991). También se produce un incremento (principalmente nocturno) de la retención de sal (Curtis et al. 1988)

- Nefrotoxicidad.- Sin lugar a dudas el principal efecto secundario es la alteración de la función renal consecutiva al tratamiento con ciclosporina, produciéndose una vasoconstricción de la arteriola glomerular aferente; el mecanismo de esa vasoconstricción aún no está claramente definido. Se ha sugerido un efecto simpaticomimético, dado que la administración de una dosis intravenosa de ciclosporina produce una liberación de catecolaminas y una estimulación neural (Murray et al. 1985), este efecto no es probable en pacientes. Otra hipótesis propone que la ciclosporina potencia el flujo del ión calcio a través de la membrana, causando una exagerada respuesta contráctil en el músculo liso

arteriolar y en las células mesangiales (Goldberg et al. 1989). La hipótesis más apoyada sugiere que la ciclosporina altera el valance vasodilatador de la prostaciclina y su vasoconstrictor antagonista el tromboxano A<sub>2</sub> en el tejido cortical renal. Aunque los efectos en los niveles de prostaciclina son controvertidos, la droga produce un aumento en los niveles de tromboxano A<sub>2</sub>, el cual produce no solo vasoconstricción renal, sino también proliferación de las células musculares lisas de la íntima y acumulación de colesteril-ésteres en macrófagos. La capacidad de los inhibidores de la tromboxano-sintetasa para disminuir la disfunción renal inducida por la ciclosporina, también sugiere el papel que tiene en la patogenia la excesiva producción de tromboxano A<sub>2</sub> (Coffman et al. 1987).

Parece existir además una nefrotoxicidad aguda por daño tubular directo, y una nefrotoxicidad crónica con una alteración progresiva de la función renal y unas lesiones histológicas no específicas: fibrosis intersticial y atrofia tubular debida a un incremento de la resistencia en la arteriola aferente debido a un engrosamiento de la pared arteriolar por un material mucoide subendotelial. (Mourad et al. 1991).

## **Efectos adversos de la Ciclosporina**

---

Hipertensión  
Retención de sodio  
Hiperkalemia  
Acidosis tubular renal  
Disfunción renal  
Convulsiones  
Parestesia  
Conjuntivitis  
Hipertrofia gingival  
Hipertricosis  
Colestasis  
Cefaleas  
Ginecomastia

---

### **3.3.- Efectos adversos de la medicación inmunosupresora.**

Segun informe de la Sociedad Internacional de Trasplante Cardíaco la infección es la causa más común de muerte postoperatoria (Kriett et al. 1991).

Las infecciones más frecuentes son:

- Citomegalovirus
- Toxoplasmosis
- Pneumocistes carinii
- Legionella pneumophila
- Listeria monocytogenes

La hipertensión es otra importante complicación desarrollada por la mayoría de los receptores de órganos tratados con ciclosporina. La nefrotoxicidad aguda es otra importante alteración, sobre todo cuando se administra ciclosporina en el perioperatorio, aquí los efectos vasoconstrictores inducidos por la ciclosporina se suman a la pérdida de albúmina y fluidos y a la mala distribución del flujo sanguíneo (drogas anestésicas), agravada en los

trasplantes cardíacos por la circulación extracorporea y la hipoperfusión renal debido al fallo cardíaco congestivo (McGiffin et al. 1985). Esta incidencia se puede disminuir retrasando el inicio de la ciclosporina hasta los 5-7 días posteriores a la cirugía, mientras que se administran preparaciones antilinfocíticas. La nefrotoxicidad crónica está caracterizada por una fibrosis intersticial irreversible (Myers et al. 1984). El aclaramiento de la creatinina estará disminuido y los niveles de creatinina sérica elevados el año posterior al trasplante, en virtualmente todos los pacientes tratados con ciclosporina. La nefrotoxicidad no suele progresar después del año, en parte porque los niveles séricos de ciclosporina para prevenir el rechazo pueden ser reducidos.

La terapia con corticoides puede inducir diabetes mellitus.

Los corticoides aceleran la osteoporosis por aumento de la resorción y disminución de la formación ósea. Pueden causar necrosis aséptica de cadera, rodilla u hombro. El crecimiento está retardado en pacientes pediátricos.

Los corticoides y la ciclosporina causan hipercolesterinemia.

Los receptores de trasplantes tienen por encima de un 6% de riesgo de desarrollar cáncer (principalmente cáncer de piel), este riesgo está correlacionado con el grado de inmunosupresión total (Penn, 1987).

Las complicaciones que afectan a los receptores de trasplantes implican varios sistemas orgánicos y varían en tipo y frecuencia en el tiempo, debido a que la mayoría son

a causa de la inmunosupresión, se requiere un delicado balance entre la adecuada inmunosupresión y el control de los efectos adversos relacionados con las drogas.

### **3.4.- Tratamientos experimentales en el trasplante de órganos.**

Se debe resaltar que en los trasplantes existe polémica sobre lo que es "Experimental". La evolución de conocimientos y técnicas en este campo es tan grande que lo experimental pasa a convertirse en rutina en muy poco tiempo. El tratamiento peri y postoperatorio, así como el tratamiento a largo plazo y el del rechazo agudo, son en la actualidad un campo de investigación para el desarrollo de nuevas drogas inmunosupresoras, como de otras que en unión de las ya existentes disminuyan los efectos indeseables de éstas.

El acúmulo de plaquetas que tiene lugar en órganos trasplantados durante el rechazo se conoce desde hace al menos 20 años (Burrows et al. 1973). La agregación y degranulación pueden contribuir al daño del órgano al menos de dos maneras: Primero, el endotelio puede ser dañado por productos de degranulación facilitando la infiltración celular. Segundo, el bloqueo de arteriolas y capilares por agregados plaquetarios y la vasoconstricción por productos de degranulación plaquetaria pueden reducir el flujo sanguíneo causando necrosis isquémica. Varios estudios se han realizado usando anticoagulantes y drogas que afectan a la actividad plaquetaria, mostrando en general mínimas mejoras en la supervivencia del trasplante durante el rechazo (Kauffman

et al. 1980) (Soper et al. 1982), aunque algunos han mostrado más prometedores resultados (Kostakis et al. 1982, Shaw, 1983).

Intimamente ligado a lo anterior, el papel de los metabolitos del ácido araquidónico tiene un interés considerable en el rechazo de órganos. Se ha demostrado que el tromboxano se eleva durante los rechazos renales (Foegh et al. 1981) y cardíacos (Khirabadi et al. 1985). La inhibición en la formación de tromboxano está asociada con la inhibición de la proliferación y citotoxicidad de linfocitos (Leung et al. 1980) y puede actuar como un regulador de la inmunidad celular. Al mismo tiempo el tromboxano producido por las células del infiltrado perivascular en el rechazo agudo, causa vasculitis arterial, y la consiguiente lesión en la íntima produce activación plaquetaria, lo que acelera la síntesis de tromboxano, con formación de trombo, vasoconstricción e isquemia del órgano, lo cual explicaría el efecto beneficioso de la asociación de inhibidores del tromboxano con bajas dosis de ciclosporina, en el rechazo de órganos (Sakurai et al. 1990).

La proliferación de la interleucina-2 es un componente esencial de la respuesta alogénica. La utilización de anticuerpos monoclonales que bloqueen el receptor de IL-2 puede ser una posibilidad específica de inmunoterapia, y su asociación con ciclosporina y dosis bajas de corticoides, además de una óptima tolerancia permite reducir la incidencia de infecciones virales (Hiesse et al. 1991)

El calcio tiene un importante papel en la activación de linfocitos (Wedner et al. 1976). No obstante los efectos

inmunosupresores de los agentes bloqueantes de los canales de calcio, no han sido bien estudiados, aunque algunos trabajos parecen indicar que la asociación de verapamil o nifedipina con azatioprina, mejora la supervivencia de los trasplantes cardíacos (Foegh et al. 1985). Además de su efecto sobre la proliferación de linfocitos, poseen propiedades cardiovasculares y hematológicas que pueden afectar a la supervivencia del órgano por diferentes mecanismos, inhiben la agregación plaquetaria y provocan vasodilatación mejorando la entrega de oxígeno a regiones isquémicas, y por último previenen el perjudicial acúmulo de calcio en la mitocondria isquémica.

También está presente el papel que juega el binomio isquemia/reperfusión en la producción de radicales libres (mediadores en la respuesta inflamatoria y de la lesión tisular) y la influencia que el tiempo y las condiciones de preservación tienen sobre los mismos. Los radicales libres, degradan macromoléculas como el ácido hialurónico, producen lesión de biomembranas por peroxidación lipídica, lo cual da lugar a oxidación no enzimática del ácido araquidónico e inactivan los inhibidores naturales de proteinasas, permitiendo que éstas degraden la matriz (Humbria, 1990). La administración de la enzima superóxido-dismutasa, que bloquea el anión superóxido, se ha demostrado eficaz en la prevención de la lesión de reperfusión (López-Boado et al. 1990).

#### 4.- FACTOR DE ACTIVACION PLAQUETARIA

##### 4.1.- Factor de activación plaquetaria.

Benveniste (Benveniste et al. 1982) describe por primera vez el PAF (Platelet-Activating Factor) como un mediador liberado por b6sofilos de conejos sensibilizados por un 6ntigeno. El PAF ha sido qu6micamente definido con una estructura molecular de 1-O-hexadecil/octadecil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina (Benveniste et al. 1989, Demopoulos et al. 1979). (Fig.2)

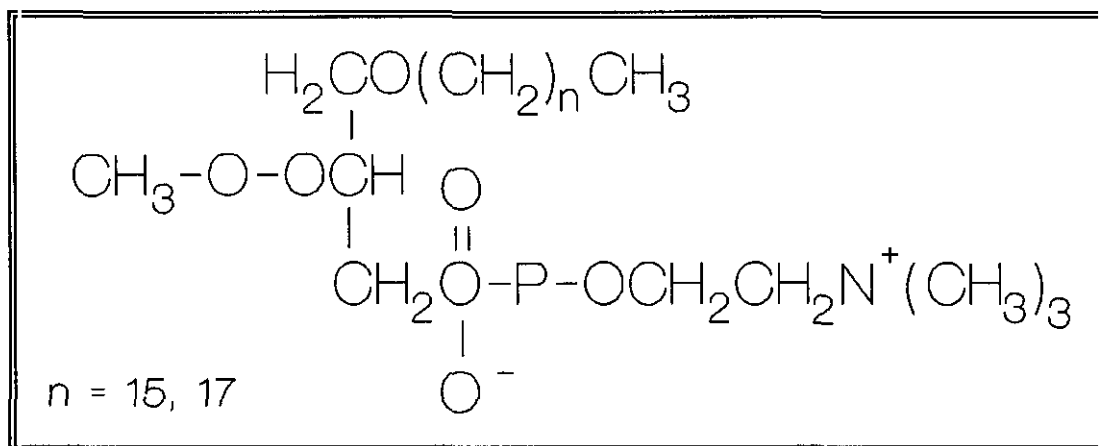


Fig. 2.- Estructura qu6mica del PAF

Aunque su estructura b6sica ha sido firmemente establecida, se han detectado variaciones en la composici3n de la cadena 1-O-alkil, Keith (Keith et al. 1984) con neutr3filos humanos estimulados, ha encontrado solo 1-O-hexadecil PAF, mientras que Oda (Oda et al. 1985) ha detectado 16:0, 17:0 y 18:1 cadenas alkil. Debemos notar que la variaci3n molecular de PAF es especie-espec6fica (Mueller et al. 1984, Ramesha et al. 1987) e independiente del est6mulo

celular. El conocimiento de la detallada composición del PAF específico es interesante porque la longitud y grado de saturación de la cadena 1-álquil influencia su actividad biológica (Satouchi et al. 1981, Tencé et al. 1981, Blank et al. 1982, O'Flaherty et al. 1983).

El PAF es un potente mediador autacoide implicado en un amplio rango de enfermedades como el asma, shock, anafilaxia, isquemia miocárdica y cerebral, enfermedad renal, ovoimplantación, rechazo de trasplantes y una gran variedad de procesos inflamatorios (Braquet et al. 1987a, 1989a, Piroty et al. 1988, Mencia-Huerta et al. 1989a, 1989b). Es producido y actúa en una gran variedad de células como son: basófilos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos de la sangre periférica, plaquetas, células de epitelios glandulares, células endoteliales y tejido neuronal (Braquet et al. 1989a, Koltai et al. 1991).

#### **4.2- Efectos como mediador.**

Entre los más importantes efectos del PAF-aceter como mediador debemos incluir: a) Leucopenia, debida a agregación y/o quimiotaxis, diapedesis e infiltración de la pared de los vasos, b) Formación de estancamiento microcirculatorio y c) Extravasación de plasma, seguida de edema, hipotensión arterial y shock (Braquet et al. 1987a, 1989a).

Acción sobre plaquetas.- El PAF estimula la agregación y liberación de plaquetas en numerosas especies animales,

incluyendo al hombre, produciéndose esta reacción a concentraciones tan bajas como 0.1 nM. y es consecuencia de la unión a receptores específicos acoplados a proteínas G y a canales de calcio (Klocking et al. 1986, Sanchez-Crespo et al. 1991). Ya cuando fue descrito por vez primera (Benveniste et al. 1972) se habló de la capacidad de disparar la reacción de liberación plaquetaria, lo que explica el uso del termino PAF.

Concentraciones nanomolares de PAF, liberan activador del plasminógeno tisular, de las células endoteliales "in vitro" a través de un mecanismo  $Ca^{++}$  dependiente, que comprende la activación de la fosfolipasa  $A_2$  y liberación de metabolitos del ácido araquidónico (Hofmann et al. 1990).

Acción sobre neutrófilos polimorfonucleares.- Los neutrófilos son una de las células diana de PAF, siendo el primer tipo de leucocito en el que se describió la estimulación por PAF, la cual produce la agregación, degranulación y secreción de radicales libres y eicosanoides a concentraciones de  $0,1\mu M$  (Shaw et al. 1981, Chilton et al. 1982).

Acción sobre eosinófilos.- La presencia de receptores de PAF en los eosinófilos se demostró en 1989 (Ukena et al. 1989). Se han descrito efectos similares a los producidos por los neutrófilos (Elliot Sigal et al. 1987) e igualmente sobre monocitos (Yasaka et al. 1982). El PAF induce infiltración eosinofílica, siendo uno de los más potentes agentes quimotácticos sobre estas células (Wardlaw et al. 1986), este infiltrado es un factor crucial en el daño microvascular;  $LTC_4$  y  $O_2^-$ , dos agentes tóxicos para la integridad endotelial, son producidos por eosinófilos.

Acción sobre células endoteliales.- Las células endoteliales, expuestas a varios estímulos, son muy activas generando PAF (Whatley et al. 1988), al mismo tiempo el PAF produce un intenso deterioro de estas células (Braquet et al. 1989a), entre las alteraciones a destacar, están:

- Cambios de forma.
- Alteraciones en el citoesqueleto.
- Formación de vesículas.
- Desaparición de actina-F.
- Aumento de la permeabilidad endotelial a las macromoléculas del plasma, con exudación de plasma rico en proteínas.
- Aumento del calcio intracitosólico.
- Induce el efluvo de calcio.
- Activación de proteinkinasa C.
- Hiperpolarización de membrana.
- Disminución de la actividad de la adenilato ciclasa.
- Aumento de la adhesión de leucocitos sobre éstas.

La lesión de la célula endotelial, el aumento del infiltrado, la formación de vesículas en endotelio y el edema son alteraciones microvasculares (todas ellas emuladas por el PAF) características de diversas afecciones como la isquemia (Braquet et al. 1989b), shock, sepsis (Sanchez-Crespo et al. 1991, Nordstoga et al. 1979), rechazo de trasplantes (Nonomura et al. 1988) y asma (Beasley et al. 1989) y por lo tanto el PAF podría ser uno de los mediadores implicados en estas patologías (Braquet et al. 1989a).

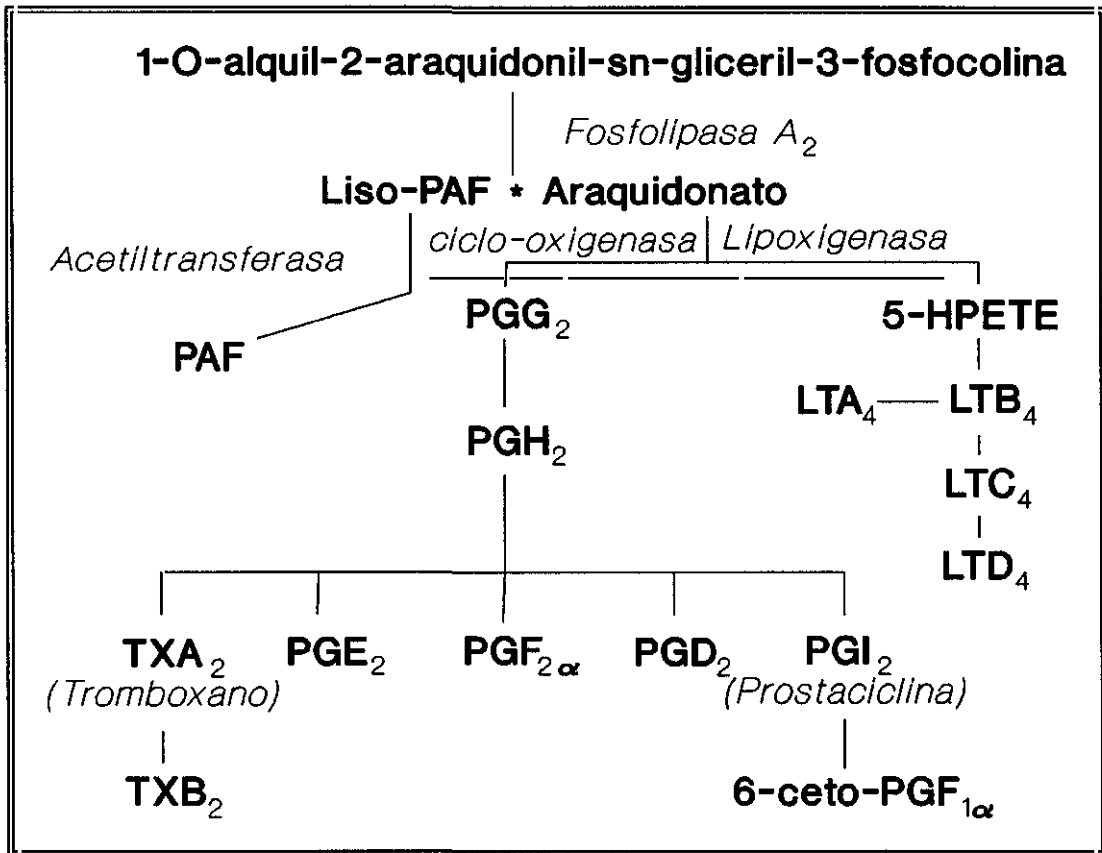
#### 4.3.- El PAF y otros mediadores inflamatorios

Debe destacarse la acción pro-inflamatoria del PAF-aceter debida a la capacidad de estimular la adhesión y agregación de neutrófilos seguida de la liberación de enzimas lisosomales y activación de la cascada del ácido araquidónico.

El proceso inflamatorio es el resultado de la acción de una gran variedad de autacoides generados simultánea o sucesivamente y el conocimiento de cómo y cuándo se liberan y sus interacciones son de suma importancia (Sanchez-Crespo et al. 1991). De hecho se ha demostrado una fuente común de PAF y araquidonato en leucocitos polimorfonucleares humanos a partir de 1-0-alkil-2-araquidonil-sn-gliceril-3-fosfocolina.(Chilton et al. 1984) (fig.3)

El PAF actúa a través de la formación de eicosanoides intermediarios en algunos sistemas como es en el corazón (Piper et al. 1986).

Existen también estrechas relaciones entre citokinas, PAF y eicosanoides; en polimorfonucleares humanos se ha demostrado la formación de PAF y Leucotrieno B<sub>4</sub>, por estímulo de TNF (Tumor Necrosis Factor)(Camussi et al. 1989), y células endoteliales pueden producir PAF en respuesta a un estímulo por IL-1 (Interleukina 1)(Bussolino et al. 1986).



**Fig.3.- Biosíntesis de PAF y Eicosanoides en leucocitos humanos.**

#### **4.4.- PAF y citokinas**

Los TNF poseen importantes efectos inmunomoduladores, pueden activar los macrófagos para producir IL-1, GM-CSF (granulocyte-monocyte colony-stimulating factor) y prostaglandinas, y modulan la generación de INF- $\gamma$  por linfocitos. La exposición de neutrófilos a TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ , estimula la producción de radicales superóxido, induce la respuesta fagocítica y aumenta la toxicidad celular anticuerpo-dependiente (Aggarwal, 1987).

Estudios recientes sugieren que la relación entre PAF y TNF es de particular importancia en la mediación del daño

endotelial, el PAF activa monocitos periféricos para producir y secretar TNF (Bonavida et al. 1989) y a muy bajas dosis amplifica de forma significativa la producción de TNF inducida por INF- $\gamma$ , IL-1, MDP (muramil dipeptido) o LPS (lipopolisacárido) (Rola-Pleszczynski 1990). Estos datos sugieren que la actuación del PAF sobre los monocitos puede constituir un importante paso en la amplificación de las respuestas inflamatoria e inmune. Este concepto es sostenido además al demostrarse que los monocitos estimulados con IL-1, TNF o INF- $\gamma$  son capaces de producir PAF de una forma bifásica, con un primer pico entre la primera y segunda hora, ampliamente retenido intracelularmente y un último pico entre las seis y ocho horas en el que la mayoría del PAF es liberado en el medio (Valone et al. 1988).

Cuando las células endoteliales sufren un estímulo nocivo un gran número de propiedades hemostáticas celulares se alteran incluyendo un aumento en la síntesis de PAF (Camussi et al. 1983a, 1983b). Las células endoteliales producen PAF en respuesta a una activación por IL-1 y TNF, la cual requiere síntesis proteica, produciéndose en mayor cantidad y más rápidamente en las estimuladas con TNF (Bussolino et al. 1987, Camussi et al. 1987a). Además otros agentes inducen la producción de PAF por estimulación de células endoteliales de una forma más inmediata al no requerir síntesis proteica (Tabla 2).

Agentes que inducen la formación de PAF en células endoteliales	
<u>Estimulación</u>	<u>Activación</u>
Trombina	IL-1
Histamina	TNF
ATP	Linfotoxina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Bradiquinina	
LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub>	
Proteasas	

TABLA - 2

Hay evidencias de que el PAF es un potente modulador de la proliferación de linfocitos y de la producción de IL-2 (Braquet et al. 1987b, Hosford et al. 1988).

A muy bajas concentraciones, no solo induce la liberación de IL-1 y TNF de monocitos/macrófagos activados sino también la producción de leucotrienos (McColl et al. 1990) y radicales libres (Vercellotti et al. 1988) de polimorfonucleares activados.

El PAF producido por células endoteliales, puede amplificar la producción de TNF y IL-1 y aumentar al mismo tiempo, a través de ellos, la producción de GM-CSF y IL-6 por el endotelio.

#### 4.5.- PAF en rechazo de órganos

La producción de una gran variedad de mediadores inflamatorios en órganos en condiciones de rechazo se ha demostrado extensamente, Mangino (Mangino et al. 1986, 1987) muestra el aumento significativo en la producción de metabolitos del araquidónico durante el rechazo de un alotrasplante renal. Dado que las células del infiltrado inmunocompetente son capaces de sintetizar PAF como células aisladas in vitro, podría deducirse que la producción de PAF puede ocurrir durante el rechazo de alotrasplantes y jugar un significativo papel en el proceso de rechazo y en el deterioro funcional del órgano trasplantado.

El PAF se ha mostrado como una llave biológica en el conjunto inflamatorio que tiene lugar en el rechazo hiperagudo de órganos, que depende principalmente de la presencia de anticuerpos-antidonante-circulantes que se unen al trasplante inmediatamente precipitando un rechazo en pocos minutos, tanto sobre riñón (Ito et al. 1984) como sobre corazón (Camussi et al. 1987b, Makowka et al. 1990).

La presencia de grandes cantidades de PAF así como de sus precursores en timo (Salem et al. 1989) puede también tener importantes implicaciones dada la importancia que este órgano tiene en la capacitación funcional de los linfocitos T.

Recientemente se ha demostrado que la producción de PAF por el córtex y la médula renal, aumenta de forma significativa en alotrasplante renal, durante el rechazo celular (Mangino et al. 1991). La ruta de remodelación de fosfolípidos podría

ser la ruta predominante de síntesis de PAF durante el rechazo celular, dado que éste está caracterizado por la afluencia de células mononucleares, plaquetas, leucocitos polimorfonucleares y otras células inmunocompetentes y que estas células sintetizan PAF por la vía de remodelación de fosfolípidos. El tejido renal produce por tanto grandes cantidades de eicosanoides durante el rechazo, siendo probable que el aumento en la síntesis de eicosanoides resulte en la generación de ácido araquidónico no esterificado, primer paso enzimático en la ruta de remodelación para producir PAF. El aumento en la producción de PAF durante el rechazo puede sugerir un papel biológico del mismo en el rechazo. El PAF estimula la agregación, quimiotaxis y secreción de neutrófilos, células mononucleares y plaquetas (Snyder 1989). Al mismo tiempo aumenta la permeabilidad vascular, pudiendo ser un mediador llave en la migración, extravasación y activación de numerosos tipos celulares implicados en el rechazo. La producción de PAF por células inmunocompetentes activadas podría también estimular la hidrólisis de fosfolípidos y liberación de araquidonato no esterificado, dando como resultado la formación de eicosanoides y toxicidad celular.

## **5.- ANTAGONISTAS DEL FACTOR DE ACTIVACION PLAQUETARIA**

### **5.1.- Compuestos con actividad antagonista de PAF**

Se conocen algunos compuestos con actividad antagonista

de receptor del PAF que pueden ser englobados en tres tipos fundamentales:

- Antagonistas basados en modificaciones de la estructura química del PAF-aceter (análogos estructurales)
- Productos naturales y sus derivados
- Estructuras sintéticas

\* Análogos estructurales.- Dentro de ellos tenemos los de **cadena abierta**, similares al mediador, el primer producto descrito en esta serie fue el **CV-3988** (Terashita et al. 1983), mostrando inhibir la agregación plaquetaria inducida por PAF y el shock endotóxico en la rata. El **SRI-63-119** (Sandoz)(Winslow et al. 1985), inhibe la agregación plaquetaria humana inducida por PAF, inhibe la hipotensión inducida en ratas y cobayo y contrarresta el broncoespasmo en éstos. El **RO 19-3704** (Hoffmann Laroche)(Barner et al. 1984), un potente antagonista que inhibe la agregación plaquetaria inducida por PAF en conejos, cobayos y humanos al igual que la broncoconstricción, hipotensión, trombocitopenia, leucopenia y extravasación en cobayo.

Otros análogos presentan ciclación de parte de la estructura, produciéndose una segunda familia de antagonistas derivados de la estructura del PAF. El **SRI-073** (Sandoz) o los derivados de la **Dioxanona** (Roche), son ejemplos de este grupo, compuestos con relativa baja potencia, buena absorción oral y carencia de agonismo parcial son las principales características de la serie

\* Productos naturales.- Tenemos tres grupos principales:

1) Lignanós.- Lignanós y neolignanós son una inmensa familia química formada por dimerización oxidativa de fenoles; estos compuestos han llamado considerablemente la atención por estar muy difundidos en la naturaleza y por su extenso rango de efectos biológicos. Un neolignano, aislado de una planta usada en la región meridional de China (*Piper futokadsurae*), como antirreumático y antialérgico, se manifestó como un potente inhibidor de la unión de [<sup>3</sup>H]-PAF-aceter a una preparación de membrana plaquetaria de conejo (Shen et al. 1985). Denominado **Kadsurenona**, ésta inhibe la agregación y degranulación inducida por PAF en neutrófilos humanos, bloquea la permeabilidad cutánea inducida por PAF en cobayos y antagoniza parcialmente el shock endotóxico en ratas (Doebber et al. 1985).

Varias estructuras de la serie de los lignanos son también potentes antagonistas de PAF como ocurre con algunos tetrahidrofuranos, el grupo de Shen, sintetiza el **L-652731**, (Hwang et al. 1985) activo por vía oral y mucho más potente que la Kadsurenona in vitro e in vivo. El tioisostero **L-653150** tiene una superior eficacia y una mayor duración.

Aunque la mayoría de los lignanos se encuentra en plantas, unos pocos han sido descubiertos en la orina de animales (incluyendo la humana), siendo el principal identificado una enterolactona (Setchel et al. 1980).

2) Terpenos.- Una segunda familia de potentes PAF-antagonistas la constituyen los Ginkgolidos, terpenoides aislados del árbol *Ginkgo biloba*, el **BN 52020**, **BN 52021**, **BN 52022**, **BN 52023** y **BN 52024** pertenecen a dicha familia,

el más potente de ellos, el **BN 52021**, demuestra su fuerte unión al receptor, por el hecho de que cuando las plaquetas eran tratadas y después lavadas, la actividad prácticamente no cambia, inhibe la agregación y degranulación, inducida por PAF, de neutrófilos humanos aislados (Braquet et al. 1985a), al igual que la quimiotaxis causada por el autacoide (Wardlaw et al. 1986) inhibe la hipotensión, hemoconcentración y extravasación producida por PAF o IgG en ratas (Sánchez-Crespo et al. 1985, Baranes et al.), contrarresta la trombosis inducida por PAF en cobayos (Bourgain et al. 1985), antagoniza la broncoconstricción inducida por PAF y el broncoespasmo pasivo homólogo y heterólogo en el cobayo (Braquet et al. 1985b, Lagente et al. 1985).

3) Gliotoxinas y sustancias afines.- La gliotoxina y otras epipolítiodioxopiperacinas son toxinas producidas por una gran variedad de cepas fúngicas o microbianas, investigadores de la Fujisawa Pharmaceutical Company, aislaron antagonistas de PAF de algunas de estas cepas (Okamoto et al. 1986a, 1986b, 1986c). Los más potentes del grupo, el **FR-900452** y el **FR-49175** inhiben la agregación plaquetaria inducida por PAF, inhiben la broncoconstricción inducida por PAF en cobayos, pero fallan en prevenir la hipotensión en ratas o el aumento de la permeabilidad vascular en ratón y no inhiben la inmunoanafilaxis en cobayo. Estos resultados sugieren la existencia de diferentes tipos de receptores específicos en plaquetas y vasos (Hosford et al. 1990).

\* Estructuras sintéticas.- Existen relativamente pocos antagonistas de PAF que no estén relacionados estructuralmente

con él o con los distintos antagonistas naturales. No obstante este grupo contiene compuestos que muestran una gran potencia como antagonistas de PAF.

El **RP 48740** derivado de una estructura de (3-piridil)-1H,3H-pirrolo[1,2-c] tiazol, el bloqueante de los canales de calcio, diltiazem y varios derivados benzodiazepínicos como el **WEB 2086** son ejemplos de este grupo. El **RP 48740** inhibe la agregación plaquetaria inducida por PAF en conejos y humanos (Sedivy et al. 1985), antagoniza la broncoconstricción inducida en el cobayo y la trombocitopenia en el conejo (Sedivy et al. 1985).

El **diltiazem** utilizado clínicamente como antagonista del calcio, muestra propiedades como antagonista del PAF, esta propiedad del diltiazem y de otros bloqueantes del  $Ca^{2+}$ , sugieren que estos pueden estar ligados de alguna manera en la plaqueta (Valone 1987).

Las triazolobenzodiazepinas **alprazolam** y **triazolam**, drogas psicotrópicas, son inhibidores específicos de la agregación plaquetaria inducida por PAF en humanos y conejos (Cox et al. 1987). El brotizolam utilizado clínicamente como un hipnótico, inhibe la agregación de plaquetas y de neutrófilos en humanos, la broncoconstricción en el cobayo y la hipotensión en la rata (Casals-Stenzel 1987a).

La separación de las propiedades sobre sistema nervioso central y como antagonistas de PAF, en la serie de las triazolobenzodiazepinas, ha sido coseguido con la síntesis del **WEB 2086**, este compuesto inhibe la agregación de plaquetas y neutrófilos inducida por PAF en humanos, la trombocitopenia y neutropenia en el cobayo y la hipotensión en la rata

(Casals-Stenzel 1987a), disminuye la broncoconstricción y leucopenia inducida por antígeno en cobayos sensibilizados y disminuye los efectos anafilácticos inducidos por ovoalbúmina en ratón y cobayo (Casals-Stenzel 1987a).

Por formación de un anillo ciclopentano entre el carbono  $\alpha$ C y C-7 se produce el **WEB 2170** y el  $\text{CH}_2$  análogo **STY 2108**, ambos inhiben la broncoconstricción en el cobayo y la hipotensión en la rata (Casals-Stenzel 1987b).

### **5.2.- PCA-4248.**

Dentro de la línea de investigación desarrollada por los Laboratorios ALTER S.A., sobre el diseño de 1,4-dihidropiridinas con capacidad de interferir en la agregación plaquetaria, pero carentes de efectos cardiovasculares (Sunkel et al. 1988), se observó que algunos derivados eran potentes antagonistas del PAF.

Uno de ellos, el PCA-4248 [2-(feniltio)etil-5-metoxicarbonil-2,4,6-trimetil-1,4-dihidropiridina-3-carboxilato] (fig. 4).

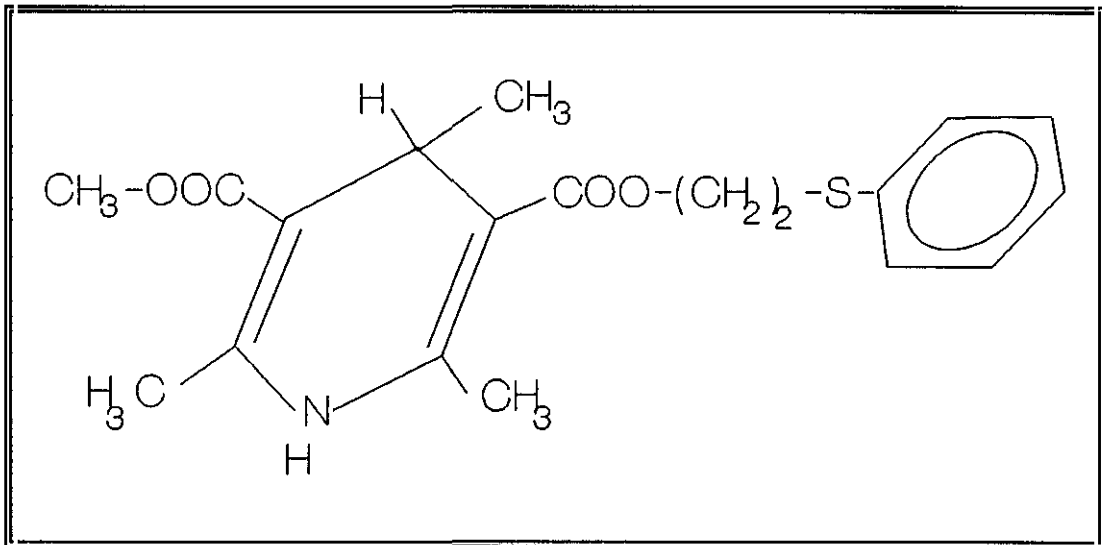


Fig. 4.- PCA-4248

Si comparamos los efectos cardiovasculares de este compuesto con los de la nitrendipina (Sunkel et al. 1990), encontramos:

1.- Una disminución importante de la capacidad inhibitoria de la contracción inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  sobre aorta de conejo.

2.- Una ausencia de efecto inotrópico negativo sobre aurícula de conejo a concentraciones de 100 nM y solo un débil efecto a 1  $\mu\text{M}$ , siendo la nitrendipina activa a 100 nM.

El PCA-4248 está desprovisto de efectos inhibitorios sobre la agregación plaquetaria inducidos por agonistas diferentes al PAF.

Induce una inhibición dosis-dependiente de la activación plaquetaria inducida por PAF en conejos y humanos; mostrándose también como un potente inhibidor de la unión de PAF a sus

receptores en polimórfico-nucleares, incluso con una mayor potencia que al receptor plaquetario (Ortega et al. 1990).

El PCA-4248 a la dosis de 5 mg/kg IV revierte la hipotensión inducida por la administración por vía intravenosa de 0,66  $\mu$ g/kg de PAF en ratas. También produce una inhibición, dosis-dependiente, en la extravasación de plasma inducida en ratas por: a) la administración de 1  $\mu$ g/kg IV de PAF, b) la administración de 40 mg/kg de inmunoagregados solubles y c) la administración de 0,5 mg/kg de endotoxina (Fernández-Gallardo et al. 1990).

El PAF inyectado intradérmicamente produce un acúmulo en el lugar de inyección de seroalbúmina bovina marcada ( $^{125}$ I-BSA), que alcanza el máximo a los 30 minutos, esta acción es bloqueada por la inyección IV previa de 1 mg/kg de PCA-4248. Si se inyecta TNF (Tumor Necrosis Factor) intradérmicamente a la dosis de 0,2 mg causa un acúmulo de  $^{125}$ I-BSA que es así mismo bloqueado por el PCA-4248, esta inhibición podría no estar relacionada con PAF (Fernández-Gallardo et al. 1990), pudiendo encontrarse por lo tanto una cierta actividad por parte del PCA-4248 como anti-TNF.

### **5.3.- Antagonistas de PAF como agentes terapéuticos.**

Sobre toda la base anteriormente expuesta, los antagonistas del PAF-aceter podrían ser efectivos en una serie amplia de modelos patológicos, representando una nueva clase de agentes terapéuticos.

### **Efecto sobre corazón.**

Los efectos vasoconstrictores sobre coronarias e inotrópicos negativos del PAF han sido bien establecidos (Koltai et al. 1989), estos efectos son inhibidos por el WEB 2086 (Felix et al. 1990) y por BN 52021 (Viossat et al. 1989)

El BN 52021 mejora la función cardíaca después del cambio antigénico (Tosaki et al. 1989) sugiriendo que podrían tener valor terapéutico contra los síntomas cardíacos durante el shock anafiláctico.

El PAF se sintetiza por granulocitos bajo estímulo hipóxico, por lo tanto puede ser un importante mediador en la isquemia miocárdica (Lefer, 1989). Los antagonistas de PAF, pueden presentar efectos cardioprotectores, previniendo las arritmias durante la isquemia y reduciendo el tamaño del infarto. El BN 50739, disminuye la incidencia de arritmias ventriculares inducidas por isquemia (Koltai et al. 1989), y el área de infarto después de 90 minutos de oclusión coronaria y 48 horas de reperfusión (Schaer et al. 1990).

### **Efectos sobre circulación periférica.**

La administración de CV-3988 antes o simultáneamente con endotoxina de E. coli, previene la hipotensión sistémica desarrollada por ésta (Terashita et al. 1985). A partir de este trabajo, han sido numerosos los publicados sobre los efectos de los antagonistas de PAF en la mejoría de las características patofisiológicas de distintos modelos de shock (Sánchez-Crespo et al. 1991).

### **Efectos en asma.**

La hiperreactividad bronquial debida a reacciones de hipersensibilidad, pueden dividirse en varios subtipos con diferente sensibilidad farmacológica, lo que explica las variadas características clínicas e intervenciones terapéuticas del asma bronquial. El PAF, parece actuar más como un modulador que como un mediador en la hiperreactividad bronquial, los efectos terapéuticos de los antagonistas del PAF, podrían estar limitados a un retraso de la broncoconstricción y la respuesta inflamatoria (Koltai et al. 1991).

### **Efectos en sistema gastrointestinal.**

La microcirculación juega un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad funcional de la mucosa gastrointestinal (Esplugues et al. 1989). Los cambios en el flujo sanguíneo por liberación de mediadores vasoactivos o citotóxicos, incluyendo radicales libres de oxígeno, eicosanoides y PAF, están implicados en la patogénesis de la ulceración péptica y la gastritis erosiva. El BN 50727, presenta al igual que otros antagonistas de PAF, importantes propiedades gastroprotectoras (Braquet et al. 1990).

### **Efectos sobre riñón.**

El PAF produce una importante reducción del flujo plasmático renal, de la filtración glomerular y de la excreción urinaria de Na<sup>+</sup> de forma paralela a la hipotensión que produce. El ginkgolido B y el SRI 63675 mejoran el cuadro renal producido por la infusión de endotoxina (Tolins et al. 1989).

El PAF producido por distintas células y órganos, puede estar implicado en los mecanismos de proteinuria y otras nefropatías (Koltai et al. 1991).

La nefrotoxicidad de la ciclosporina, podría estar relacionada con la liberación de PAF (Lamas et al. 1990), habiéndose notado cierta prevención de sus efectos nocivos mediante la utilización de ginkgolido B (Pavao dos Santos et al. 1989).

### **Efectos en inflamación y piel**

El PAF, inyectado en la zona plantar o en cavidad pleural de ratón, produce una temprana respuesta inflamatoria, que es inhibida de una forma dosis-dependiente por el WEB 2170 mientras que el WEB 2086 no actúa, lo que sugiere diferentes receptores de PAF en el foco inflamatorio (Henriques et al. 1990).

También se ha descrito (Maestre et al. 1990) la cooperación entre PAF y TNF en la producción de radicales libres por polimorfos neutrófilos in vitro y en la artritis inducida por antígeno in vivo.

Antagonistas de PAF, relacionados estructuralmente con éste, inhiben parcialmente la formación de edema producido por la inyección intradérmica de PAF más PGE<sub>2</sub> en piel de conejo, mientras que antagonistas no relacionados estructuralmente con el PAF y derivados sintéticos inhiben de forma intensa solo la respuesta al PAF (Hellewell et al. 1989).

El PAF es un potente mediador inflamatorio que interacciona con otros mediadores como las citocinas, dando como resultado un aumento autocatalítico de la respuesta

inflamatoria. Los antagonistas de PAF, son capaces de interrumpir este círculo vicioso, por lo que podría ser incluido su uso, solos o en combinación con otras drogas antiinflamatorias, en la estrategia terapéutica de numerosas situaciones patológicas relacionadas con la inflamación (Koltai et al 1991).

#### **5.4.- Antagonistas de PAF en el trasplante de órganos.**

Varios trabajos se han realizado con antagonistas del PAF para valorar su acción en el trasplante de órganos; el BN 52021 (Foegh et al. 1986, Khirabadi et al 1987), es el primer antagonista de PAF, que se prueba en un trasplante cardíaco experimental en ratas, utilizándolo siempre en unión de azatioprina o de ciclosporina y consiguiendo un aumento en la supervivencia que en ningún caso sobrepasa los 4 días. El RP 48740 se ha probado en un modelo de trasplante renal en ratas (Freiche et al. 1990), solo o en combinación con ciclosporina, consiguiendo un aumento significativo de la supervivencia, pero no un efecto sinérgico en su asociación con la ciclosporina.

El WEB 2170 por si solo no produce aumento de la supervivencia en un trasplante cardíaco en rata, pero si lo produce de forma significativa en asociación con una dosis de ciclosporina de 2mg/kg.(Da Costa et al.1990)

## **OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo se basa en conocer el efecto que sobre el rechazo de un alotrasplante cardíaco heterotópico en rata, puede presentar el antagonista del factor de activación plaquetaria PCA-4248.

Para ello valoraremos:

1.- El efecto sobre la supervivencia de alotrasplante en los animales tratados con el PCA-4248.

2.- El efecto sobre el cuadro histopatológico final en los animales tratados con el PCA-4248.

3.- El efecto de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis subterapéuticas en relación con esas mismas dosis de ciclosporina como único tratamiento.

## **MATERIAL Y METODOS**

## **1.- CEPAS Y CONDICIONES DE ESTABULACION.**

Para la realización de este trabajo se han empleado un total de 117 ratas machos de 230 a 300 gr., de la cepa Lewis/CrlBR, que fueron las receptoras de los alotrasplantes; 112 ratas hembras de 200 a 250 gr., híbridos  $F_1$  (Lewis x Brown Norway) que se utilizaron como donantes. Además se utilizaron 15 ratas Sprague-Dawley y 15 ratas Wistar, para la puesta a punto de la técnica y como modelo de trasplante singénico.

### **Características de las cepas:**

1.- La cepa Lewis deriva de la cepa Wistar, fue desarrollada por Margaret Lewis en Scripps Clinic, La Jolla, California, es la cepa de elección para el estudio de los procesos de tipo inflamatorio.

Posee los aloantígenos (RT1-1, RT2-a, RT3-a, RT4-b)

2.- Los híbridos  $F_1$  (Lw x BN), son animales producto del cruce de una hembra de la cepa consanguínea Lewis con un macho de la cepa consanguínea Brown Norway (cepa obtenida de una mutación marrón de ratas salvajes; desarrollada por King con acoplamiento consanguíneo a partir de 1958 desarrollado por Silvers).

Posee los aloantígenos (RT1-1-n, RT2-a, RT3-a-b, RT4-b)

ya que los genes de histocompatibilidad son expresados de forma codominante en los animales F<sub>1</sub>.

La elección de estas cepas, nos proporciona una barrera de histocompatibilidad que puede permitir observar efectos menores en la supervivencia del trasplante.

Todos los animales fueron estabulados con una temperatura entre 21-24°C y una humedad del 50% con un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, se les suministró agua y comida en gránulo para roedores en mantenimiento "ad libitum", manteniéndose en jaulas individuales después de la cirugía.

## **2.- GRUPOS DE ESTUDIO**

Se realizaron los siguientes grupos (Tabla 3):

GRUPO DE PUESTA A PUNTO DE LA TECNICA.- se utilizaron ratas Sprague-Dawley y ratas Wistar con trasplantes singénicos y alotrasplantes. Ningún animal de los que sobrevivieron más de dos días después del trasplante dentro de este grupo, ha sido introducido en este estudio.

GRUPO SINGENICO.- Se utilizó como grupo control de la efectividad de la técnica quirúrgica, así como para valorar la evolución a largo plazo de un corazón trasplantado, se realizaron un total de cuatro trasplantes siendo tanto los receptores como los donantes ratas de la cepa Sprague-Dawley.

GRUPOS ALOGENICOS. Cepa Lewis receptora, Híbridos F<sub>1</sub>

donantes:

GRUPO EVOLUTIVO.- Este grupo consta de un total de 10 animales trasplantados que fueron sacrificados en días sucesivos, entre día 1 y día 5, para valorar la evolución histológica del rechazo. A todos los animales se les suministró Metil-celulosa al 0,5% a la dosis de 0,5 ml./día por cada 100 gr. de peso, mediante sonda por vía oral.

GRUPO CONTROL.- Grupo al que se administró Metil-celulosa al 0,5% a la dosis de 0,5 ml./día por cada 100 gr. de peso, mediante sonda por vía oral.

GRUPO PCA-4248.- Grupo al que se administró 10 mg./kg/día de PCA-4248 suspendido en una gota de Tween 80 y Metil-celulosa al 0,5% para conseguir un volumen de administración para vía oral de 0,5 ml. por cada 100 gr. de peso, la preparación y administración se realizó bajo protección de la luz. La administración comenzó dos horas antes del comienzo de la cirugía y se prolongó durante los 28 días posteriores al trasplante.

GRUPOS DE CICLOSPORINA.- Se valoraron distintas dosis consideradas dentro de la bibliografía como dosis subterapéuticas (0,25; 0,5; 2 y 10 mg/kg/día). La ciclosporina en forma del preparado comercial Sandimmun ampollas (50 mg/ml), fue administrada por vía subcutánea, previa dilución en suero fisiológico hasta ajustar a un volumen de 100  $\mu$ l. por cada 100 gr. de peso. La administración se comenzó inmediatamente

después del cierre de la laparotomía y se continuó durante los 14 días posteriores al trasplante.

GRUPOS DE PCA-4248 Y CICLOSPORINA.- Se utilizaron dos rangos de dosis de ciclosporina, 0,25 y 2 mg/kg/día, por vía subcutánea durante 14 días, en la forma anteriormente descrita, ambas en unión de la dosis de 10 mg/kg de PCA-4248 administrado durante 28 días como así mismo se ha descrito.

Todos los animales que sobrevivieron más de 48 horas, fueron incluidos en el estudio.

	<u>Nº DE ANIMALES</u>	<u>TRATAMIENTO UTILIZADO</u>	<u>DOSIS</u>	<u>FINALIDAD</u>
PUESTA A PUNTO	11	NINGUNO	-	Puesta a punto de la técnica
SINGENICO	4	NINGUNO	-	Evolución sin rechazo
EVOLUCION	10	VEHICULO	5 ml/kg	Evolución del rechazo
CONTROL	15	VEHICULO	5 ml/kg	ESTUDIO
CyA 0,25	10	CICLOSPORINA	0,25 mg/kg	ESTUDIO
CyA 0,5	5	CICLOSPORINA	0,5 mg/kg	Valoracion dosis de ciclosporina
CyA 2	14	CICLOSPORINA	2 mg/kg	ESTUDIO
CyA 10	4	CICLOSPORINA	10 mg/kg	Valoración dosis de ciclosporina
PCA-4248	12	PCA-4248	10 mg/kg	ESTUDIO
PCA+CYA 0,25	10	PCA-4248 y CICLOSPORINA	10 mg/kg y 0,25 mg/kg	ESTUDIO
PCA+CYA 2	15	PCA-4248 y CICLOSPORINA	10 mg/kg y 2 mg/kg	ESTUDIO

Tabla 3.- Esquema de grupos

### 3.- TECNICA QUIRURGICA

El modelo quirúrgico utilizado, se basa en el desarrollado por Ono y Lindsey (Ono y Lindsey, 1969). Para la manipulación microquirúrgica se utilizó una lupa binocular American Optical, con fuente de luz fría externa. Las anastomosis vasculares se hicieron con nylon monofilamento de 10-0 y aguja de sección cilíndrica de 3/8 de círculo.

**Fase donante.**- Los animales fueron anestesiados con una solución de pentobarbital al 5% por vía intraperitoneal a la dosis de 50 mg./kg., al mismo tiempo se inyectaron 200 UI de heparina, por la misma vía.

Se rasura la parte ventral del tórax y abdomen, realizando una laparotomía media y una toracotomía bilateral a nivel de las líneas medias costales, hasta las clavículas, se incide el diafragma y la zona libre de la caja torácica es reflejada cranealmente, quedando expuesto el corazón, se debe tener precaución para no lesionar los vasos mamarios internos. El timo es disecado para una mejor exposición de los grandes vasos.

Bajo lupa y a 7 aumentos la vena cava craneal izquierda en unión con la vena ázigos se disecciona y liga doblemente con seda de 5-0; posteriormente se disecciona y ligan la vena cava craneal derecha y la vena cava caudal, no anudando en ésta la ligadura proximal. La aorta es seccionada a nivel de la arteria innominada y el corazón es perfundido a través de la vena cava caudal mediante una aguja calibre 27G (0.4 mm) con solución salina a 4°C conteniendo 200 UI de heparina

por ml. (2-3 ml), anudando en este momento la ligadura proximal de la vena cava caudal. Se secciona la arteria pulmonar a nivel de su bifurcación y las venas cavas entre las ligaduras. Las venas pulmonares son ligadas conjuntamente, extirpándose los pulmones. Se perfunde el corazón a través de la aorta con 1 ml. de la solución anteriormente citada y se sumerge en solución salina a 4°, después de haber realizado una escrupulosa limpieza de cualquier resto de tejido en la base cardíaca. En todos estos pasos la manipulación sobre el corazón debe ser mínima.

**Fase receptora.-** Después de anestesiar al animal (pentobarbital 5%, 50 mg/kg) se rasura el abdomen y se practica una laparotomía xifo-púbica. El paquete abdominal se desplaza al lado izquierdo del animal y se envuelve en gasas humedecidas con solución salina atemperada, a continuación bajo lupa y a 15 aumentos se exponen y disecan la aorta abdominal y la vena cava caudal, posteriormente a la bifurcación de los vasos renales; la disección debe ser lo suficientemente amplia para permitir el trabajo con facilidad (1-1.5 cm). Se debe tener especial cuidado para no lesionar los vasos ni las ramificaciones de los mismos, especialmente los vasos lumbares.

La aorta es clampada con un doble clamp aproximador de Acland, la adventicia es eliminada y se realiza una incisión elíptica con tijeras microquirúrgicas de un diámetro similar al de la aorta del donante.

La vena cava caudal es ligada en cada extremo de la zona disecada con seda de 5-0 y se realiza una incisión con

bisturí de un diametro igual al de la arteria pulmonar del donante.

El corazón es situado transversalmente en el lado derecho del abdomen para proceder a la realización de la cara izquierda de la anastomosis aórtica, con sutura continua; finalizada esta cara el corazón es reflejado sobre el lado derecho abdominal para completar la anastomosis aórtica. La arteria pulmonar es anastomosada a la vena cava caudal igualmente en posición termino-lateral con sutura continua, debiendo tener cuidado con el lado izquierdo, ya que la anastomosis aórtica nos impide el acceso directo a esta zona, debiendo por tanto realizarla a traves del lumen de los vasos. La cara derecha se completa sin ningun problema (fig. 5).

Fig. 5.- Fases de la anastomosis microvascular.

1.- Sutura de zona lateral de aorta abdominal del receptor (AR) con aorta del donante (A).

2.- Sutura cara medial de aorta del receptor (AR) con aorta del donante (A).

3.- Sutura de cara medial de vena cava caudal del receptor (C) con arteria pulmonar del donante (P). La sutura en esta anastomosis es realizada por la cara interna.

4.- Sutura de cara lateral de vena cava caudal del receptor (C) con arteria pulmonar del donante (P).

AD - Auricula derecha del donante

AI - Auricula izquierda del donante

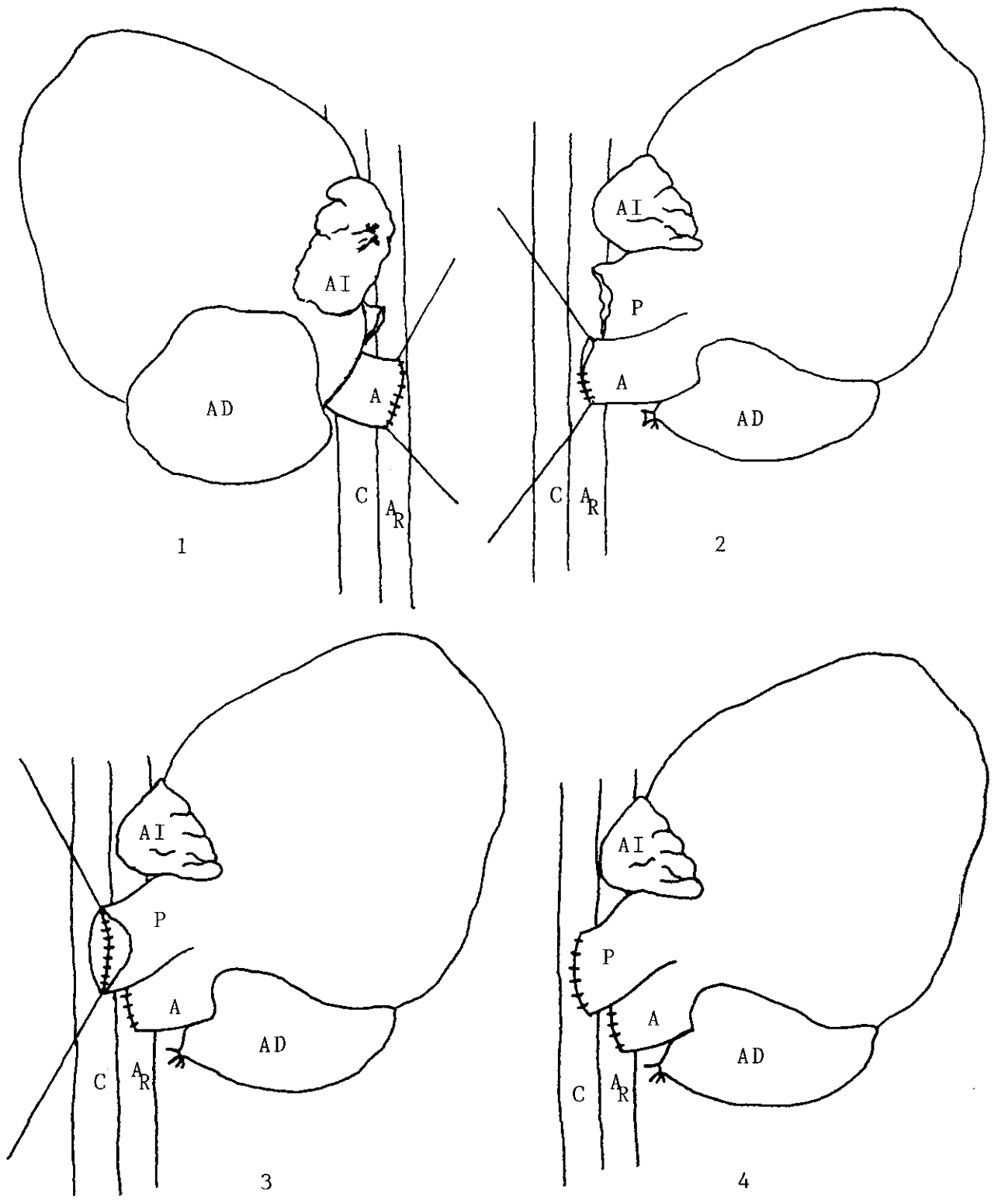


Fig.5.- Fases de la anastomosis microvascular.

A continuación liberaremos las ligaduras de la vena cava, primero la craneal y después la caudal y posteriormente los clamps aórticos, primero la zona caudal y después la craneal. Como medida hemostática realizaremos una ligera presión con una gasa sobre la zona anastomosada durante 1-2 minutos, siendo esto en la mayor parte de los casos suficiente para controlar la hemorragia.

En unos 30 segundos el corazón se distiende y cambia su coloración; comienzan contracciones ventriculares multifocales e inefectivas que empiezan a ser efectivas entre 1-3 minutos.

La pared abdominal se cierra con sutura de seda de 4-0 en dos planos.

El tiempo total de isquemia caliente no sobrepasó en ningún caso los 45 minutos.

Mecanismo de circulación.- Fue inicialmente descrito por Mann (Mann et al. 1933). El corazón trasplantado es perfundido vía aorta abdominal a la aorta donante y a sus arterias coronarias, vía seno coronario vierte en aurícula derecha, ventrículo derecho y arteria pulmonar pasando a vena cava caudal del receptor (fig. 6). En este modelo el lado izquierdo del corazón es evitado, si bien, obviamente, la perfusión del miocardio izquierdo se mantiene.

El flujo a través del corazón trasplantado es un 5% del volumen minuto total.

Fig.6.- La sangre penetra en el corazón trasplantado vía aorta receptor aorta donante (A), pasando a arterias coronarias (C), después de irrigar el miocardio vierte en aurícula derecha (AD) a través del seno coronario (SC), de aquí a ventrículo derecho (VD) y vía arteria pulmonar (P) a vena cava abdominal del receptor.

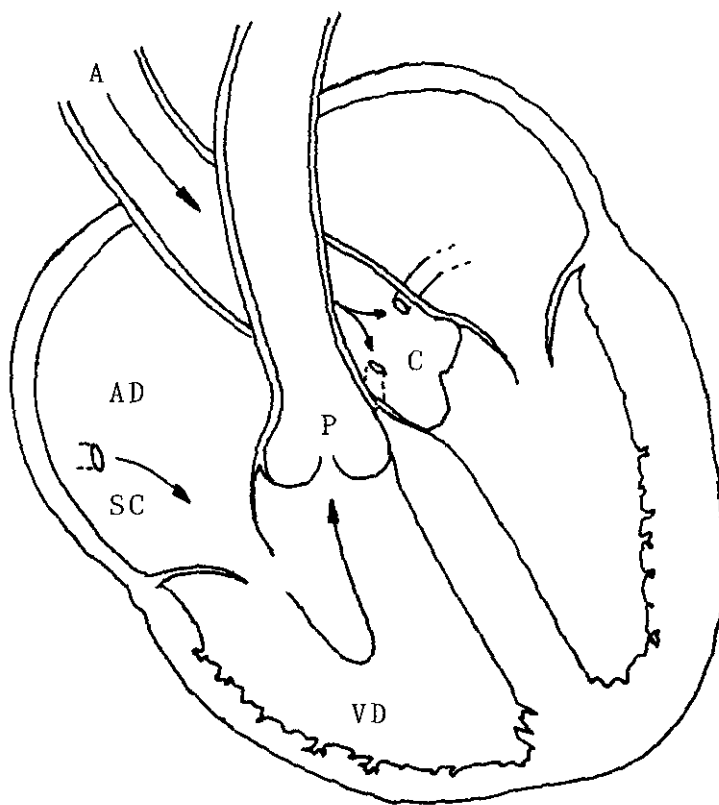


Fig.6.- Esquema de circulación en el corazón trasplanta-  
do.

#### 4.- CONTROL DE VIABILIDAD

La viabilidad del trasplante fue valorada por palpación directa y registros electrocardiográficos diarios hasta la fecha del sacrificio. Para la palpación directa se adoptó el esquema de Tauber y cols., con la siguiente clasificación:

- 4º - Buena
- 3º - Menos buena, no difiere del anterior en funcionalidad y la disminución en la percepción del latido solo es debida a la formación de adherencias con los tejidos que rodean al trasplante.
- 2º - Disminuida, con aumento siempre de la masa palpable, se interpreta como signo de rechazo
- 1º - Muy disminuida, tan solo se aprecian débiles y esporádicas contracciones.
- 0º - Ausente, ausencia total de contracciones, apreciándose solo una masa sólida a la palpación.

Los registros electrocardiográficos fueron realizados en un aparato Hewlett-Packard 7758B System en derivación II (D II), a velocidad de 25 mm/sg., así mismo se realizaron registros en un aparato Grass Model 7 polygraph, monitorizando en un osciloscopio Hewlett Packar 54501 A Digitizing oscilloscope 100 MHz con impresión a través de una impresora Think Jet.

El control electrocardiográfico se efectuó siempre con el animal anestesiado (pentobarbital, 40 mg/kg), con registros fijos a las 24, 48 y 72 horas, y siempre que se produjo un cambio en la intensidad del latido.

La colocación de los electrodos se realizó según la

técnica de Lee (Lee et al. 1982) situando los correspondientes a las extremidades anteriores a nivel de la zona lateral del último reborde costal para anular del registro el corazón propio; los electrodos posteriores fueron colocados en posición habitual. Se utilizó la aparición de bradicardia y las alteraciones de la conducción como criterios de viabilidad.

## **5.- HISTOLOGIA.**

La determinación final del estado del trasplante fue valorada por examen histológico; el material fue fijado en formol tamponado con carbonato magnésico a saturación, procesado en forma rutinaria en series de alcoholes y xileno e incluido en parafina y los cortes de 7  $\mu$  teñidos con hematoxilina-eosina, el grado de rechazo fue evaluado atendiendo al cuadro lesional, teniendo como base para ello las lesiones de:

Intensidad inflamatoria.- Valorando el infiltrado inflamatorio total en cuatro niveles.

- 0.- ausencia de infiltrado.
- 1.- Ligera infiltración.
- 2.- Infiltración moderada.
- 3.- intenso infiltrado inflamatorio.

Blastos.- Expresados como porcentaje del infiltrado inflamatorio total. Nos dan una aproximación del estado de actividad inmunológica, correspondiendo los porcentajes menores con un mayor grado de inmunosupresión.

Edema.- Valorando la presencia de edema perivascular

e intersticial total. Clasificado en cuatro niveles.

0.- Ausencia de edema.

1.- Ligero edema perivascular e intersticial.

2.- Edema perivascular e intersticial moderado.

3.- Intenso edema perivascular e intersticial.

Necrosis miocelular.- Valorado según el grado de destrucción de miocitos. Cuatro niveles.

0.- Ausencia total de necrosis de miocitos.

1.- Ligera necrosis miocelular.

2.- Necrosis miocelular moderada.

3.- Intensa destrucción miocítica.

Vasculitis ligera o endotelial.- Cuando se presenta lesión fundamentalmente endotelial, con tumefacción citoplásmica del endotelio, desprendimiento o desaparición del mismo, presencia de edema en la subíntima. Se clasifica como presencia o ausencia de lesión de vasculitis ligera o endotelial.

Vasculitis en pared.- Lesión de carácter más intenso que la anterior, endotelio parcial o totalmente perdido, infiltración leucocitaria de la pared del vaso, con presencia en algunos casos de necrosis fibrinoide de la pared con o sin trombosis parietal. Se clasifica como presencia o ausencia de vasculitis en pared.

La presencia de infarto subendocárdico (de aparición frecuente) no se ha tenido en cuenta por considerarla como una lesión sobreañadida, sin relación directa con el cuadro lesional del rechazo.

## **6.- ANALISIS ESTADISTICO**

El análisis estadístico se efectúa sobre la base de la reducción de las series de datos a sus estadísticos simples, en porcentajes y tamaño de la muestra para las variables cualitativas y en media aritmética, desviación típica y tamaño de la muestra para las variables cuantitativas.

La comparación de los diferentes grupos se ha realizado mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Obteniendo el valor de F, y siendo éste significativo se han realizado pruebas paramétricas para las variables cuantitativas (Prueba de la "t" de Student para datos no apareados).

Las variables cualitativas se han analizado mediante pruebas no paramétricas (Chi-cuadrado).

Se considera la existencia de significación estadística para un valor de la probabilidad menor de 0,05.

El análisis se ha realizado en un ordenador Macintosh Classic II de Apple Computer, Inc. utilizando el programa StatWorks<sup>TM</sup> versión 1.1.

## **RESULTADOS**

## **1.- TECNICA QUIRURGICA**

En 95 de los 107 trasplantes efectuados (88,78%). se obtuvo un éxito quirurgico con una supervivencia mayor de 24 horas y presentando en ese momento una óptima palpación cardíaca y actividad eléctrica,

En las 12 restantes intervenciones, en 5 no se presentó latido cardíaco después del desclampaje aórtico, en 3 se presentó, pero éste cesó instantes después, cuando aún no se había efectuado el cierre de la laparotomía, los 4 restantes presentaron latido que resultó ausente a las 24 horas con silencio electrocardiográfico.

En ninguno de los casos se presentaron problemas de tipo infeccioso en el postoperatorio, tampoco hubo deiscencias en ninguna de las suturas.

## **2.- EVOLUCION DE PESOS.**

Todos los casos presentaron un descenso en el peso a las 24 horas de realizada la cirugía, este descenso estuvo entre los 10 y los 20 gr. de media para todos los grupos, menos para el grupo de Ciclosporina 0,5 mg. en el que las

pérdidas medias a las 24 horas no sobrepasaron los 2 gr. La pérdida de peso continuó produciéndose a las 48 horas, menos para el grupo Control que inició a ese tiempo una progresiva recuperación del peso, que no se produciría en los restantes grupos hasta las 72 horas.

Solamente los individuos del grupo Control recuperan el peso previo a la cirugía antes de una semana, siendo la ganancia de peso mucho más lenta en los restantes grupos (fig. 7).

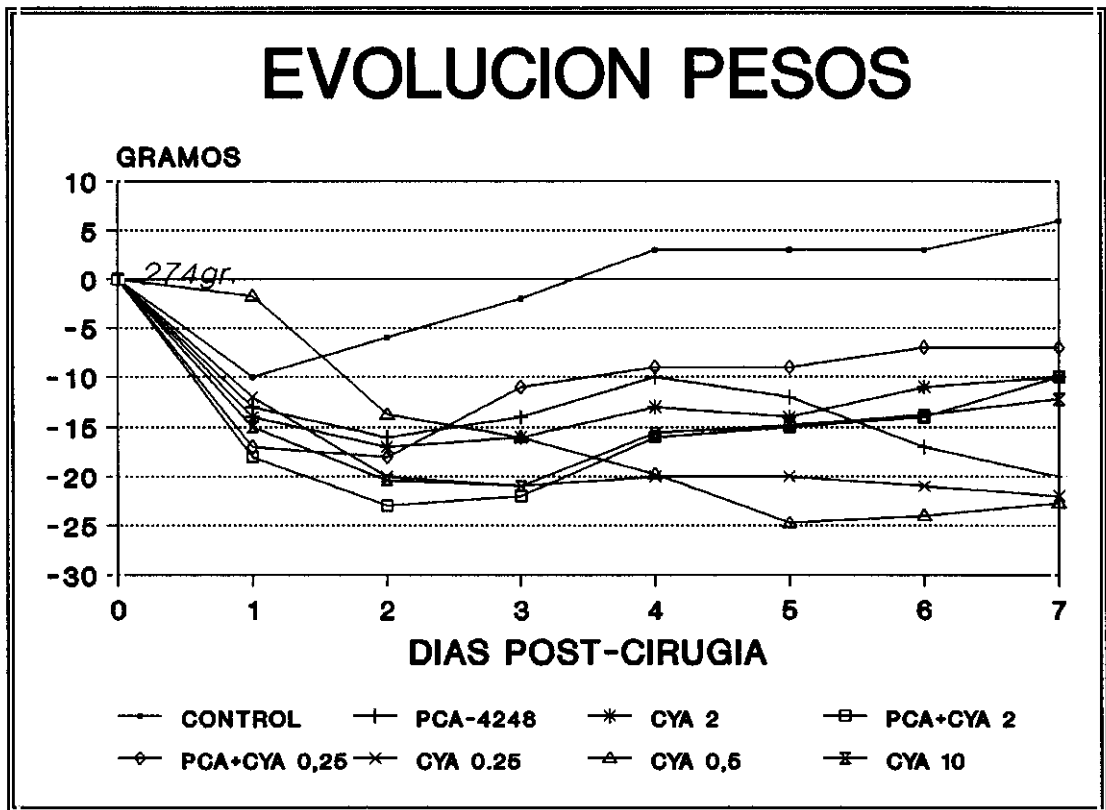


Fig. 7.- Evolución de pesos en los diferentes grupos en la primera semana postrasplante.

### 3.- CONTROL DE VIABILIDAD

#### 3.1.- Palpación.

Las variaciones que se producen en la palpación del latido cardíaco están lógicamente relacionadas con el rechazo del órgano y por tanto con el tiempo de supervivencia. En la tabla nº 4 se reflejan los días en que se producen las variaciones en un grado de latido al grado inmediato inferior.

En los diferentes grupos debemos destacar lo siguiente:

Grupo Singénico.-

En este grupo el latido grado 4 tuvo una duración media de  $3,75 \pm 0,95$ . Todos los casos presentaron en el momento en que fueron sacrificados latido grado 3.

Grupo Control.-

- Un caso no presentó latido grado 3, pasando directamente del grado 4 al 2.

- Dos casos no presentaron latido grado 2, pasando directamente del grado 3 al 1.

- Tres casos no presentaron latido grado 1, pasando directamente del grado 2 a la ausencia de latido palpable.

Grupo PCA-4248.-

- Dos casos no presentaron latido grado 2, pasando directamente del grado 3 al 1.

GRUPO	CAMBIOS EN EL GRADO DE PALPACION		
	4°-3°	3°-2°	2°-1°
CONTROL	3,4±0,73 n=14	5,14±0,66 n=13	6,23±0,83 n=12
PCA-4248	3,66±0,77 n=12	4,91±0,79 n=10	6,1±0,73 n=12
CyA 0,25	3,33±1,11 n=10	5,7±1,82 n=10	7,3±2,58 n=10
PCA+CyA 0,25	4,2±1,22 n=10	6,2±1,31 n=10	8,7±1,76 n=10
CyA 0,5	4,4±0,89 n=5	6,8±1,64 n=5	14,8±7,52 n=3
CyA 2	4,18±0,98 n=14	7,76±1,73 n=14	23,71±16,60 n=7
PCA+CyA 2	4,71±1,58 n=15	21,06±14,30 n=15	35,26±16,49 n=9
CyA 10	4,25±0,95 n=4	24±2,94 n=4	27±2,58 n=4

Tabla nº 4.- Días en que se produce el cambio de un grado de palpación al grado inferior, se ha expresado como media ± desviación típica.

Grupo Ciclosporina 0,25 mg/kg.-

- Todos los casos de este grupo pasaron por las distintas graduaciones de latido.

Grupo de PCA y Ciclosporina 0,25 mg/kg.-

- Todos los casos de este grupo pasaron por las distintas graduaciones de latido.

Grupo de Ciclosporina 0,5 mg/kg.-

- Dos casos no presentaron latido grado 1, pasando directamente del grado 2 a la ausencia de latido.

Grupo de Ciclosporina 2 mg/kg.-

- Siete casos de este grupo no presentaron latido grado 1, pasando directamente del grado 2 a la ausencia de latido.

Grupo de PCA y Ciclosporina 2 mg/kg.-

- Seis casos de este grupo no presentaron latido grado 1, pasando directamente del grado 2 a la ausencia de latido.

Grupo de Ciclosporina 10 mg/kg.-

- Todos los casos de este grupo pasaron por las distintas graduaciones de latido.

### **3.2.- Electrocardiografía.**

Como los electrodos se situaron a un nivel caudal al corazón del receptor, éste no fue registrado, por lo que no se presentaron interferencias.

La actividad eléctrica del corazón trasplantado, presenta cambios importantes en el tiempo, siendo algunos de estos cambios comunes a todos los grupos, ya sean singénicos o no.

En el registro realizado al finalizar el acto quirúrgico,

todos los animales, presentaron alteraciones del ritmo con frecuencias cardíacas que tienden desde una moderada a una intensa bradiardia (fig. 8), también hubo frecuente aparición de complejos ventriculares prematuros y bloqueos auriculo-ventriculares de distinto grado. Al mismo tiempo apareció una importante desnivelación del segmento ST. El ventriculograma puede aparecer ensanchado, y presenta fundamentalmente un intenso predominio de onda Q.

El ritmo cardíaco tiende a aumentar en las horas siguientes a la finalización de la cirugía (fig. 9).

Entre las 24 y 48 horas el segmento ST tiende a la normalización, la frecuencia cardíaca adquiere unos valores similares a la frecuencia sinusal del corazón del receptor, las arritmias, si estuvieron presentes, también desaparecen.

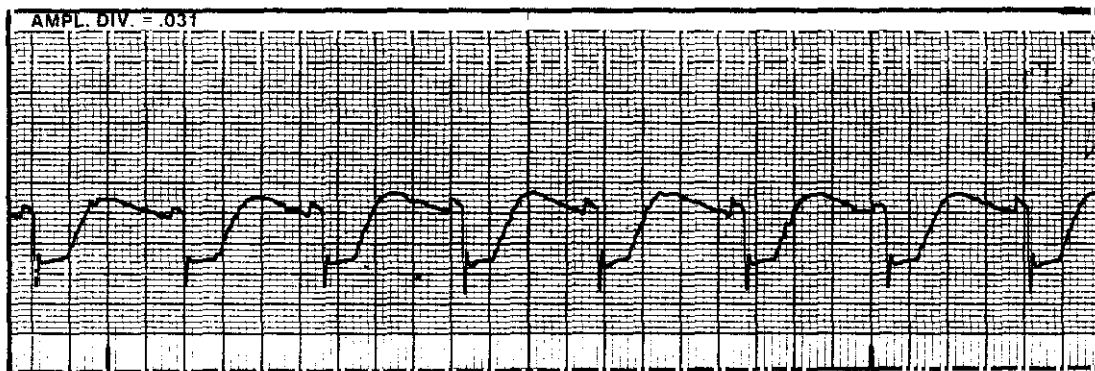
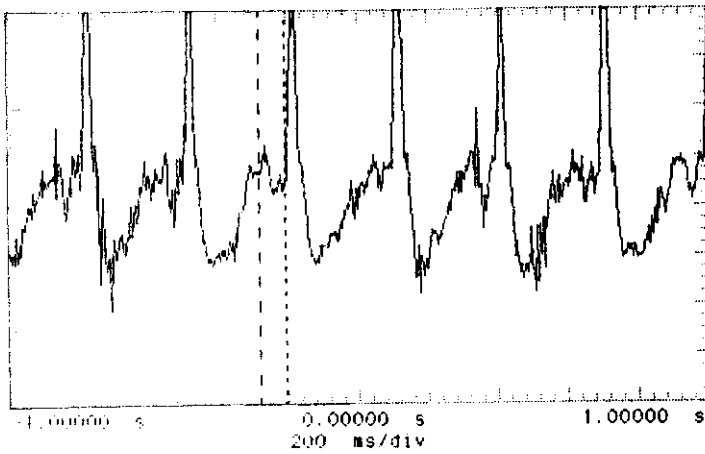


Fig. 8.- Bradicardia sinusal, QRS con onda Q profunda, importante depresión del segmento ST. Bloqueo A-V de 1<sup>er</sup> grado, PR= 80 ms. (D II, 25 mms).

Fig. 9.- Registro efectuado a los 30' de realizarse el trasplante. El corazón trasplantado presenta bradicardia sinusal con frecuencia de 198 ppm. y presencia de bloqueo A-V de 1<sup>er</sup> grado (PR= 76 ms) con conducción normal; desnivelación del segmento ST. (D II, base de tiempo 200 ms/div).

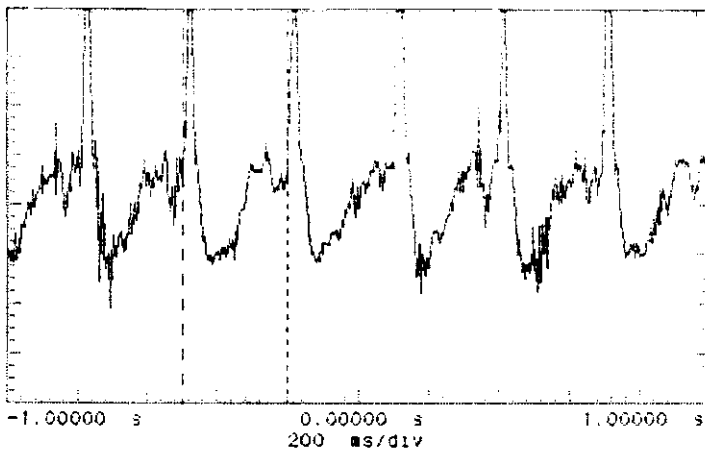


2 200 mV/div  
 offset:-100.0 mV  
 1.000 : 1 dc

step marker: -204.000ms  
 start marker: -280.000ms  
 delta t: 76.000ms  
 1/delta t: 13.1579 Hz

2 f 50.00 MHz

hp stopped

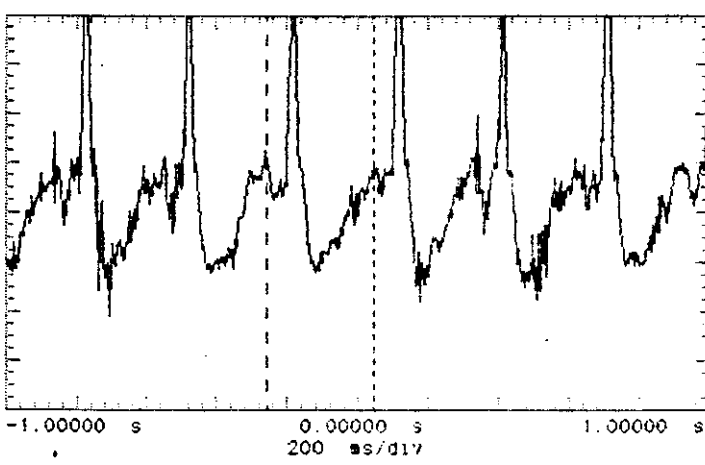


2 200 mV/div  
 offset:-100.0 mV  
 1.000 : 1 dc

stop marker: -200.000ms  
 start marker: -500.000ms  
 delta t: 300.000ms  
 1/delta t: 3.33333 Hz

2 f 50.00 MHz

hp stopped



2 200 mV/div  
 offset:-100.0 mV  
 1.000 : 1 dc

stop marker: -44.0000ms  
 start marker: -256.000ms  
 delta t: 300.000ms  
 1/delta t: 3.33333 Hz

2 f 50.00 MHz

Generalmente entre las 48 y las 72 horas el corazón trasplantado adquiere su máxima frecuencia, apareciendo a partir de este momento en la mayoría de los casos un bloqueo aurículo-ventricular completo con el establecimiento de ritmos idioventriculares de frecuencia generalmente elevada (próximas a las 300 ppm.). Este ritmo es el que persiste generalmente, con solo algunas variaciones en su frecuencia, que no suele descender por debajo de las 200 ppm., durante la fase de latido grado 3, esto es, mientras no hay evidencia de rechazo.

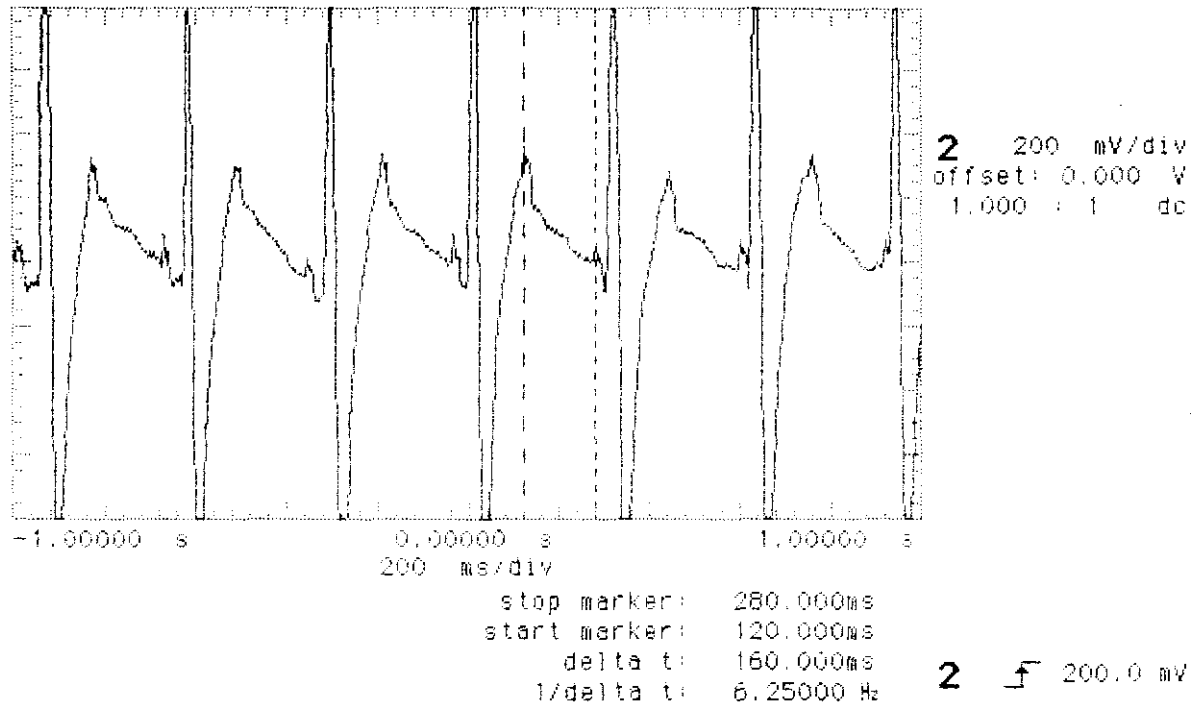
Cuando empieza el rechazo del órgano comienzan a producirse nuevamente alteraciones, el ritmo idioventricular va enlenteciéndose haciéndose más bradicárdico en los días sucesivos, según disminuye la intensidad en el grado de palpación (figs.10 y 11).

La amplitud del complejo QRS, también disminuye (fig. 12) y al aumentar el grado de rechazo se hacen frecuentes las arritmias.

La principal alteración que encontramos en el ritmo cardíaco idioventricular establecido, es la presencia de nuevos focos de actividad eléctrica en el miocardio ventricular, originando complejos ventriculares prematuros (fig. 13), que aumentan en frecuencia con la evolución del rechazo (fig. 14).

Los complejos ventriculares prematuros, pueden aparecer aislados o asociados (dipletes) (fig.15), o de focos diferentes, dando lugar a latidos ventriculares

hp stopped



hp stopped

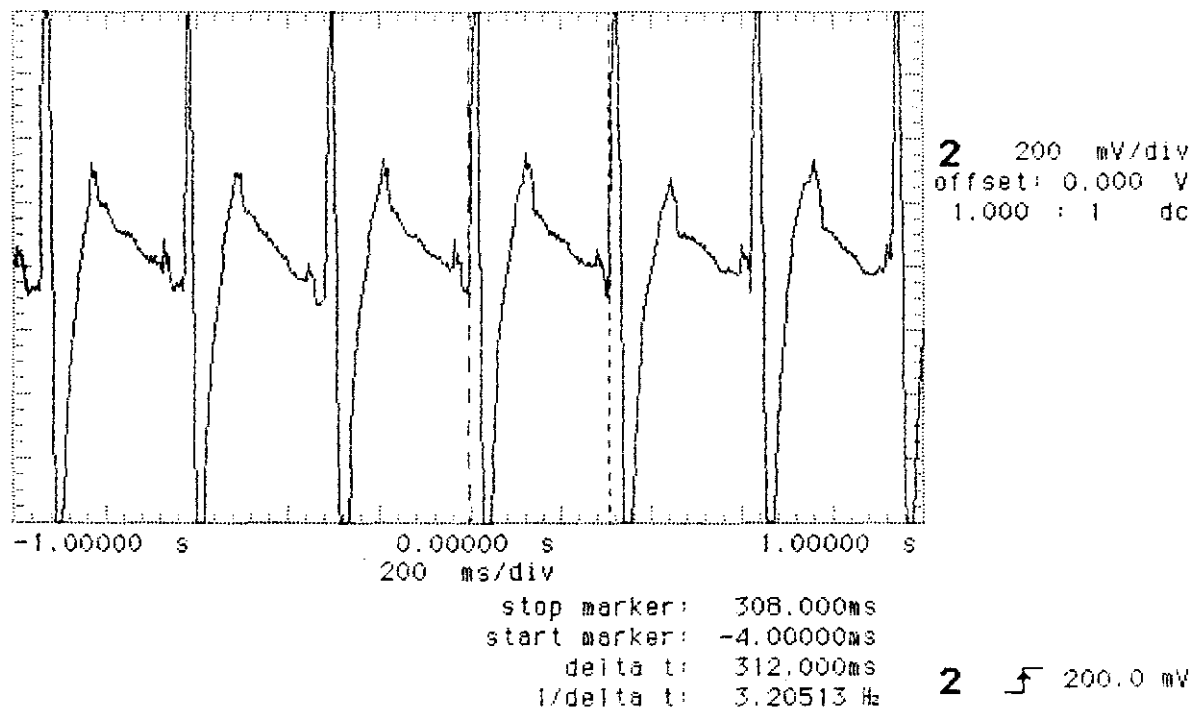
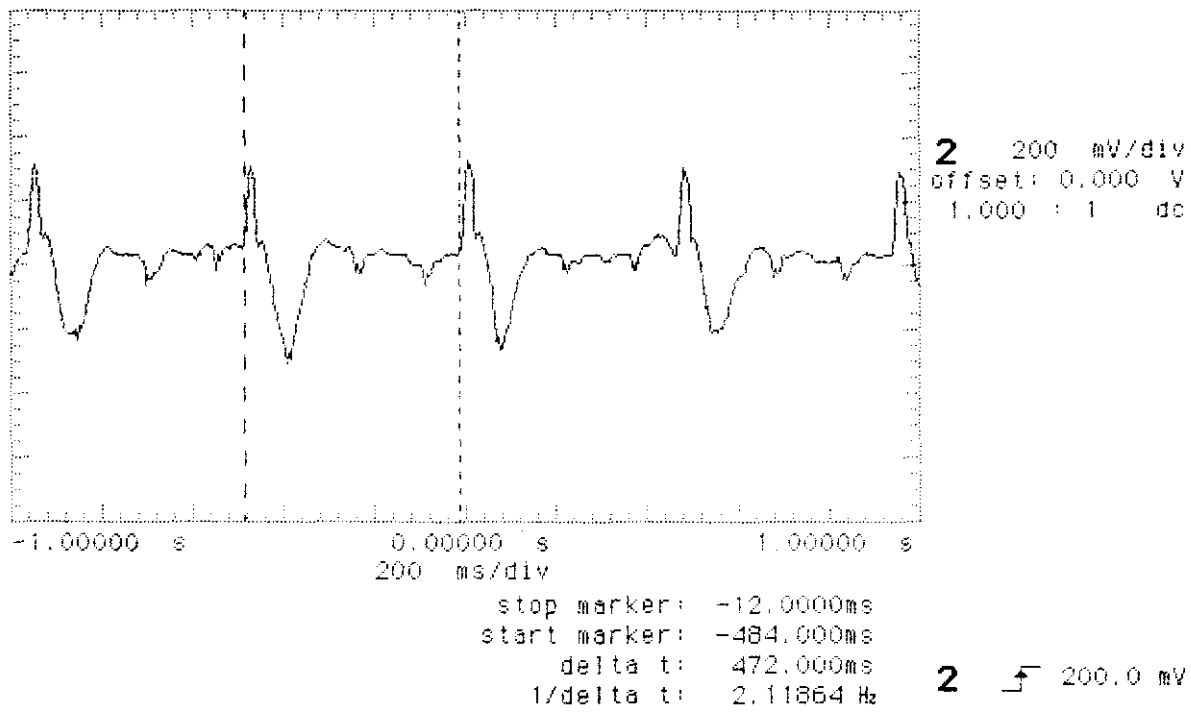


Fig. 10.- Registro efectuado a los 6 días postrasplante. El corazón en un grado 2 de palpación, presenta bloqueo A-V completo, con ritmo idioventricular, con una frecuencia auricular de 375 ppm y ventricular de 192 ppm. (D II, base de tiempo 200 ms/div).

Ap stopped



Ap stopped

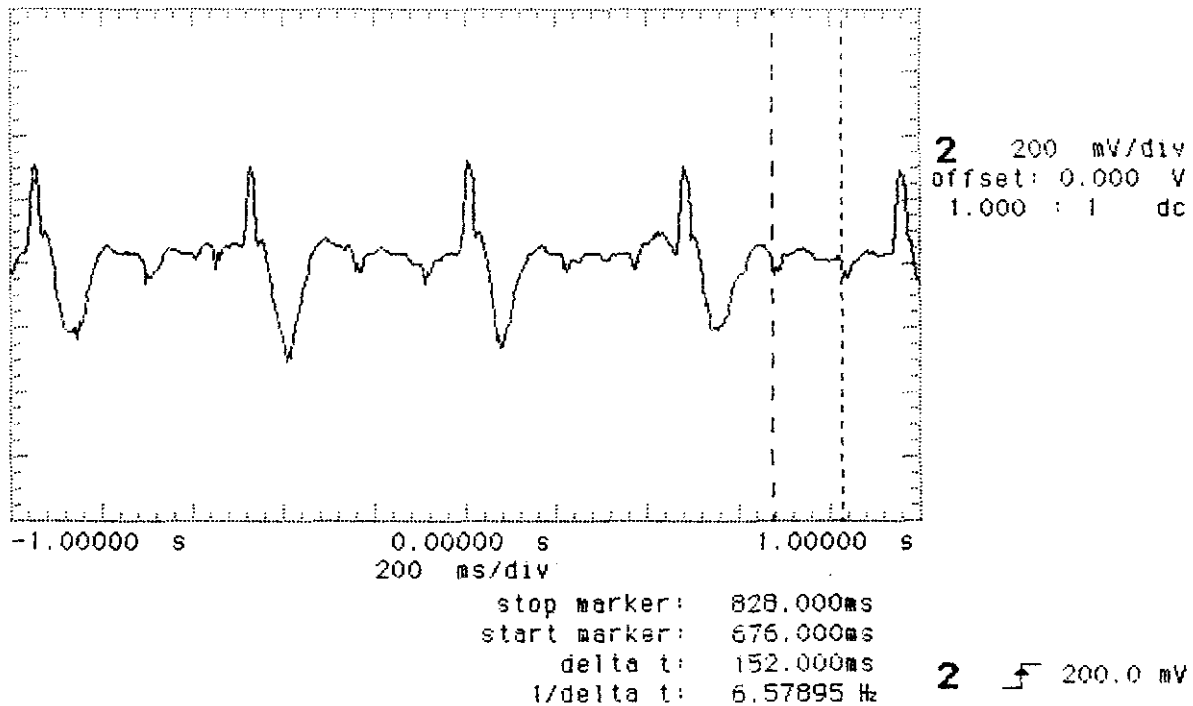


Fig. 11.- Corazón que presentaba un grado 1 de palpación. Presencia de bloqueo A-V completo con ritmo idioventricular. La frecuencia auricular se encuentra en 394 ppm, mientras los ventrículos se contraen a 127 ppm. (D II, base de tiempo 200 ms/div).

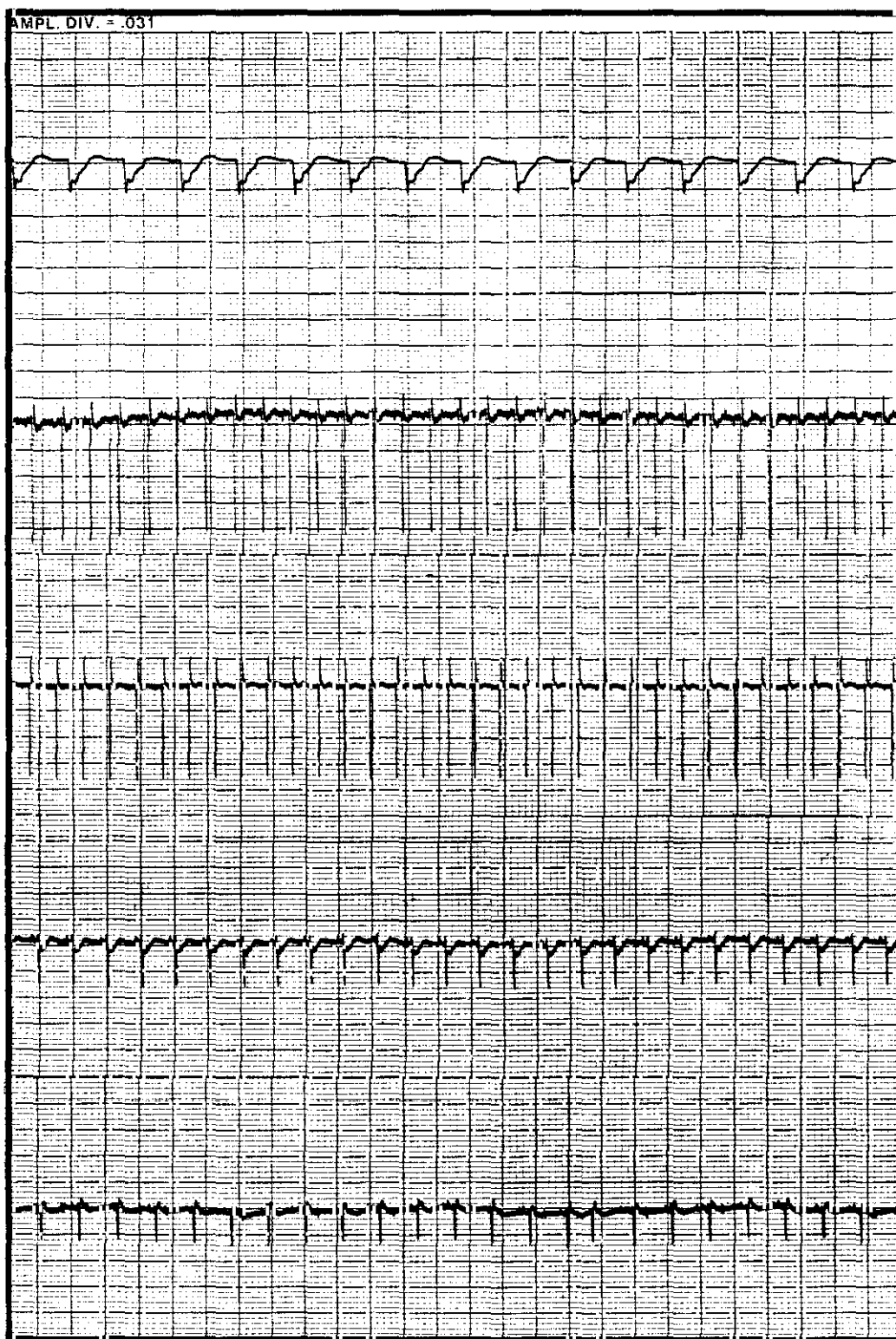


Fig 12.- Evolución de voltajes de complejos QRS. Los registros fueron efectuados en los días 0, 2, 4, 5 y 6 postrasplante. (D II, 25 mms).

hp stopped

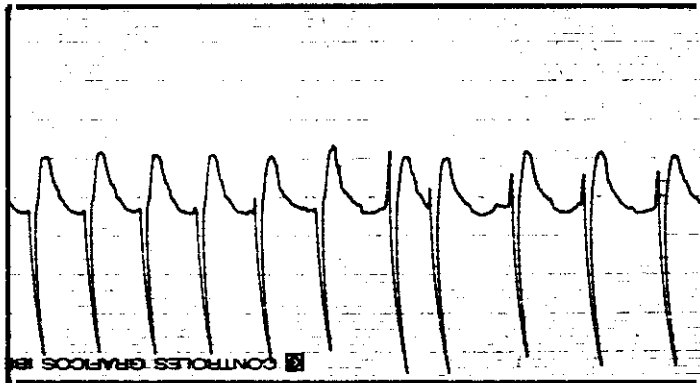
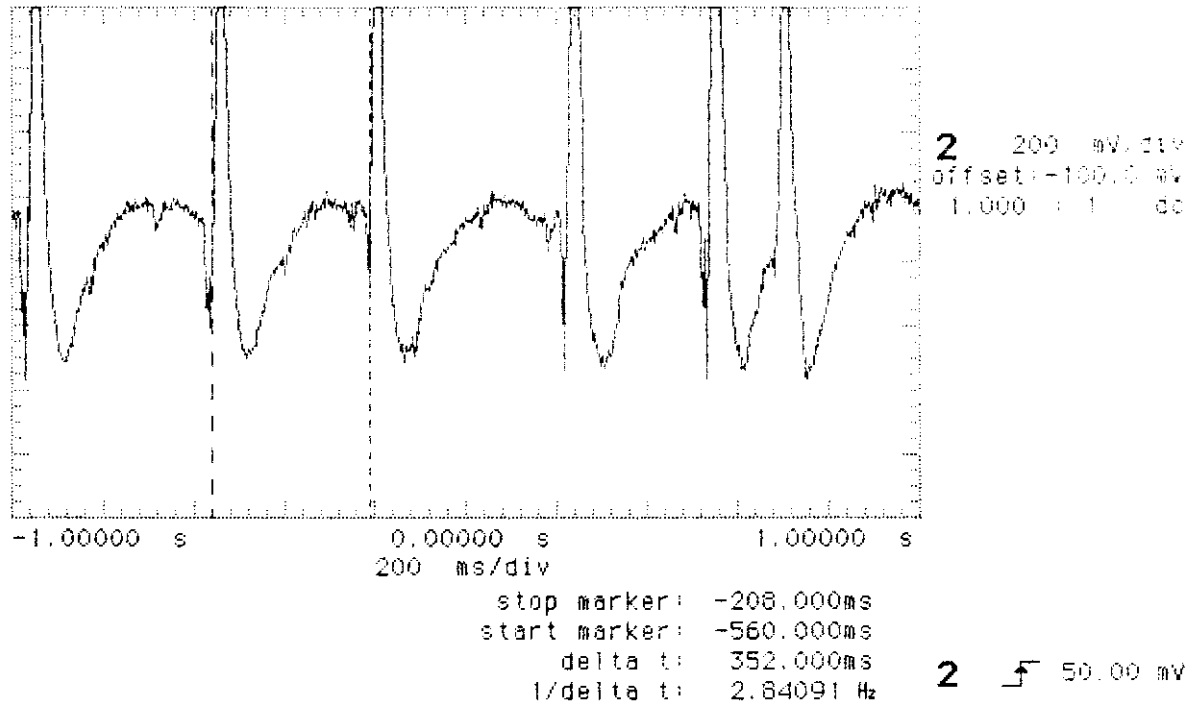


Fig 13.- Presencia de un complejo ventricular prematuro, en un bloqueo A-V completo con ritmo idioventricular. Corazón en grado 2 de palpación, con una frecuencia ventricular de 170 ppm. Desnivelación del segmento ST. (Sup. D II, base de tiempo 200 ms/div. Inf. (D II, 25 mms).

sp printing

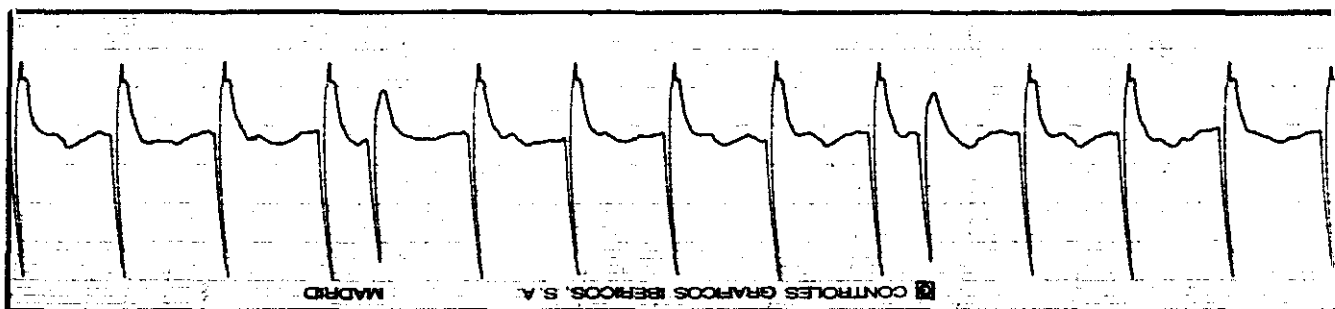
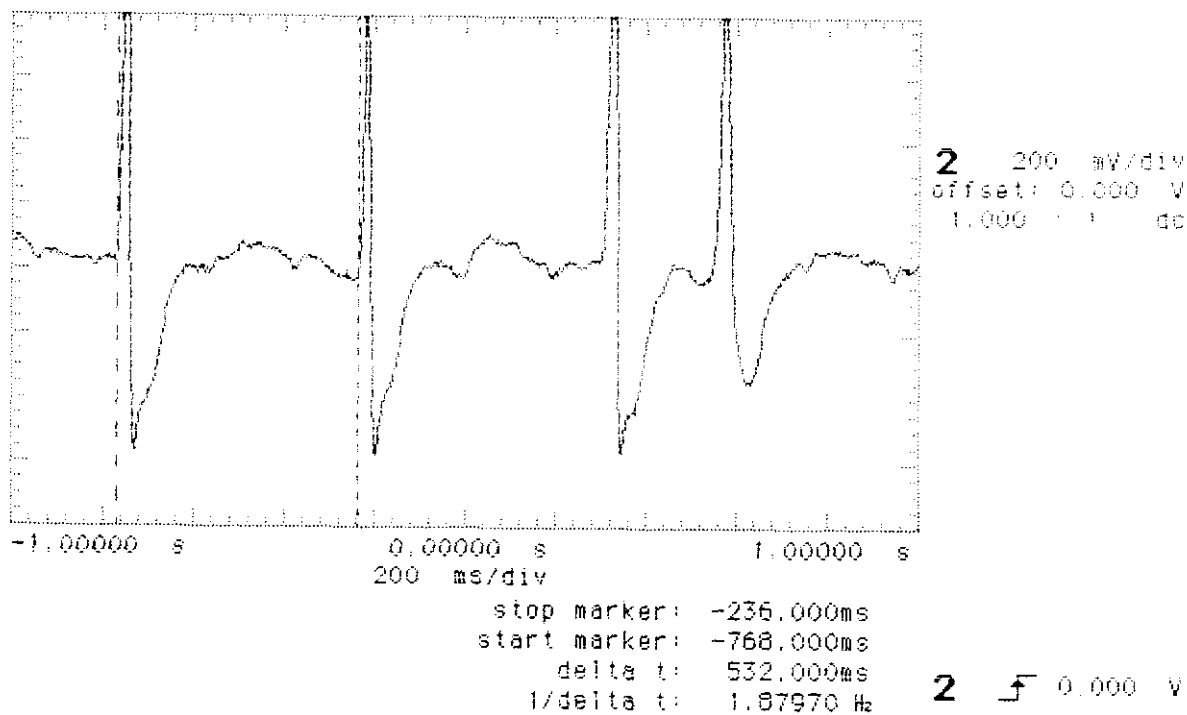


Fig. 14.- Complejo ventricular prematuro dentro de un ritmo idioventricular. Aparente ausencia de ondas P. Corazón en grado 1 de palpación con una frecuencia de 112 ppm. Desnivelación del segmento ST. (Sup. D II, base de tiempo 200 ms/div. Inf. D II 25 mms).

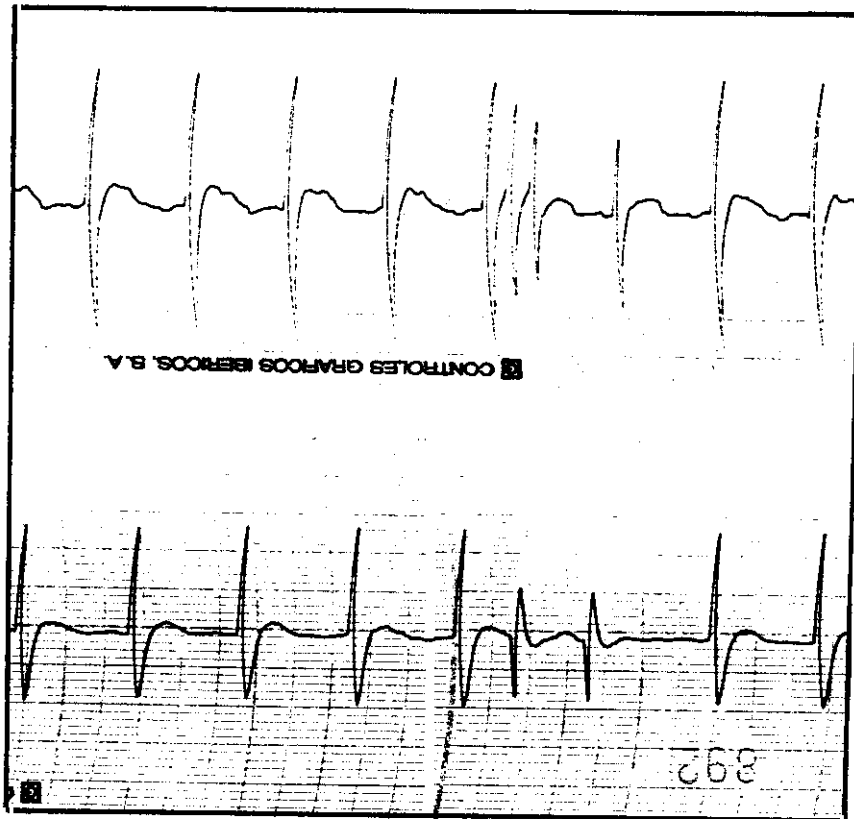


Fig. 15.-

**Superior.**- Ritmo idioventricular a frecuencia de 115 ppm, con presencia de dos complejos ventriculares prematuros asociados (diplete).

**Inferior.**- Inmediata disminución de la frecuencia ventricular (106 ppm) y aparición de 2 latidos de un 2° foco ventricular. (D II, 25 mms).

ectópicos multifocales (fig. 16). La aparición de ritmos idioventriculares multiformes coincide con últimas fases de grado 2 de palpación y con palpación grado 1 (figs. 16 y 17). En últimos estados, también se observó alternancia eléctrica.

La presencia de latidos ventriculares ectópicos en bigeminismo, no demasiado frecuente, aparece indistintamente en corazones en fase de rechazo (fig. 18) como en los que no presentan síntomas del mismo (fig. 19).

Cuando se verificó una palpación grado 0, el registro ofreció generalmente ausencia de actividad eléctrica, si bien en algunos casos apareció una actividad auricular (fig 20).

El grado de palpación se relacionó con la frecuencia cardíaca (fig. 21), agrupándose las diferentes frecuencias con su correspondiente grado de palpación en el momento del registro. La tabla 5, nos muestra la relación entre los grados de palpación y las características electrocardiográficas encontradas en los diferentes grados.

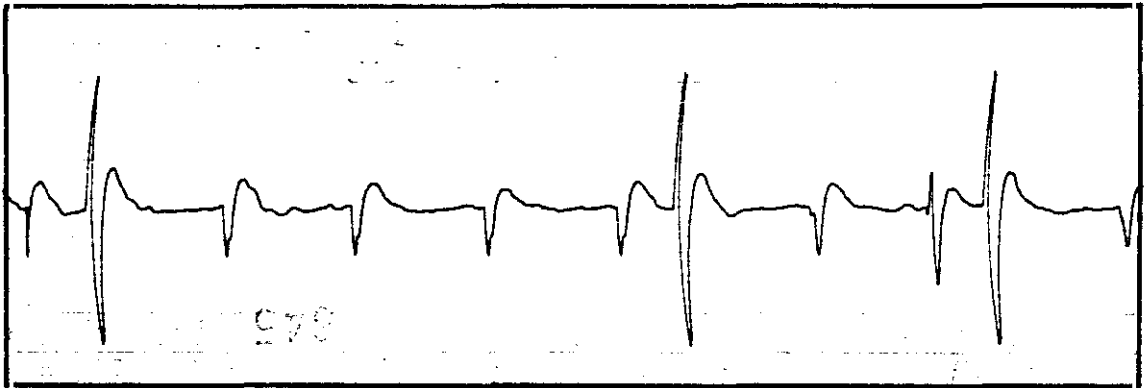


Fig. 16.- Corazón en grado 1 de palpación. Ritmo idioventricular a 88 ppm, con latidos ventriculares ectópicos multifocales. Desnivelación del segmento ST (D II, 25 mms).

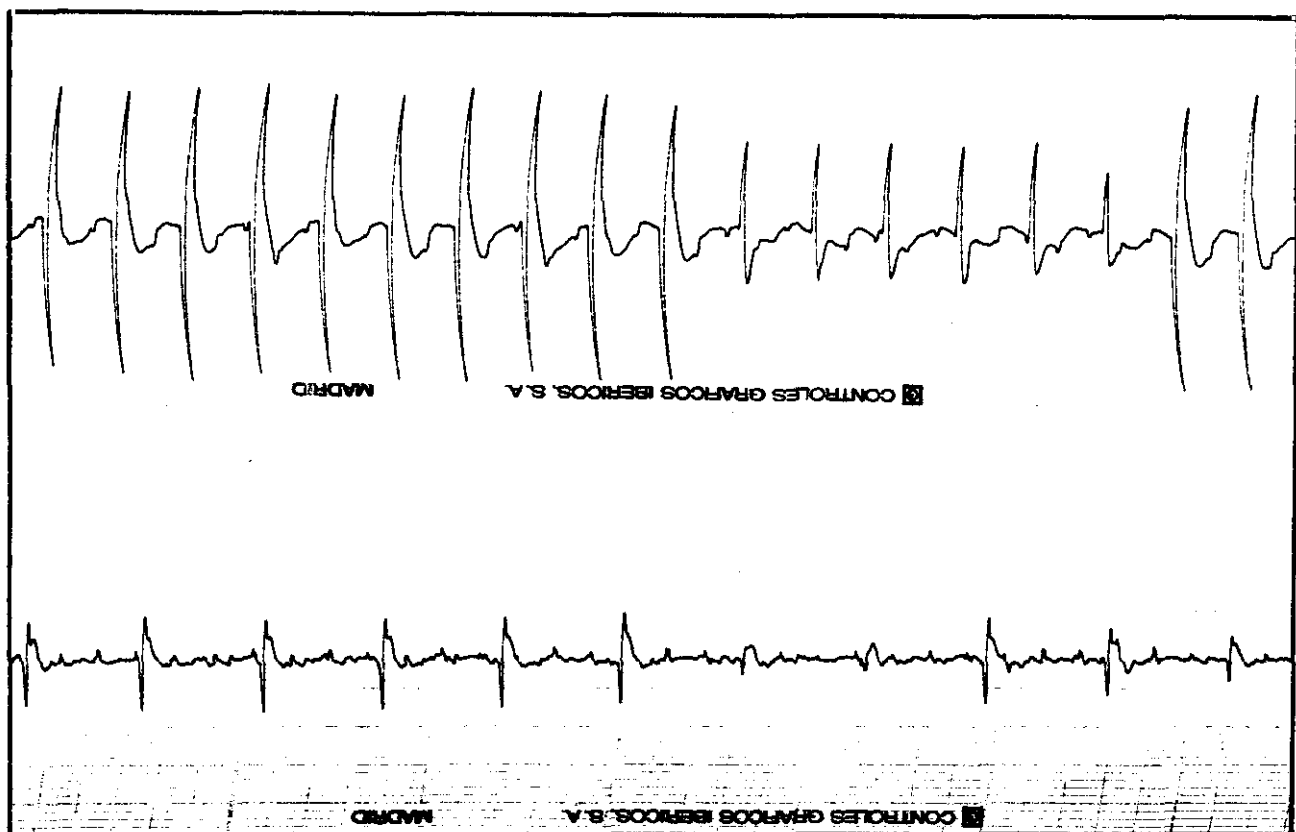


Fig. 17.- El registro superior, realizado al 6º día, presenta bloqueo A-V completo con ritmo de escape ventricular bifocal; existía un grado 2 de palpación con una frecuencia ventricular de 192 ppm. En el inferior, al 7º día, la palpación era grado 1, bloqueo A-V completo con frecuencia auricular de 300 ppm y ventricular de 96 y alternancia eléctrica.(DII, 25 mms).

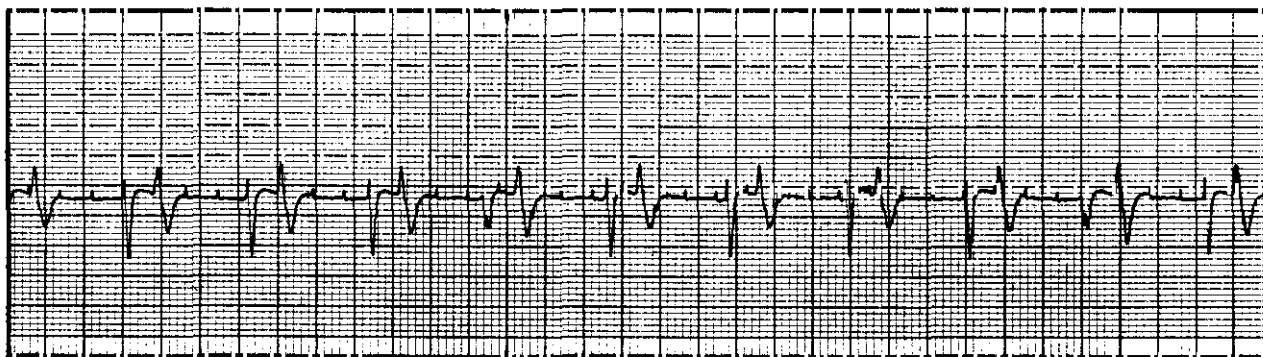


Fig. 18.- Bloqueo A-V completo con ritmo idioventricular asociado a latidos ventriculares ectópicos en bigeminismo. Grado 2 de palpación. (D II, 25 mms).

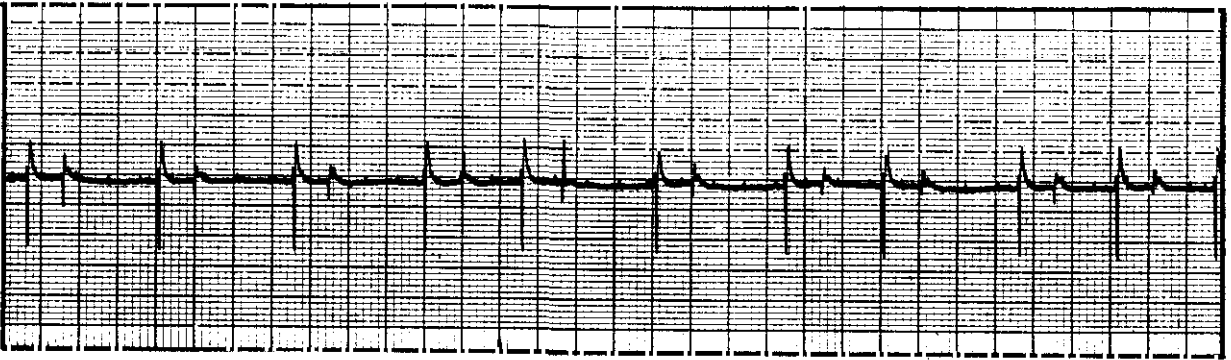


Fig. 19.- Trasplante singénico. Registro efectuado a los 50 días de la cirugía. Observamos un bigeminismo sobre un ritmo idioventricular. Grado 3 de palpación. (D II, 25 mms).

hp stopped

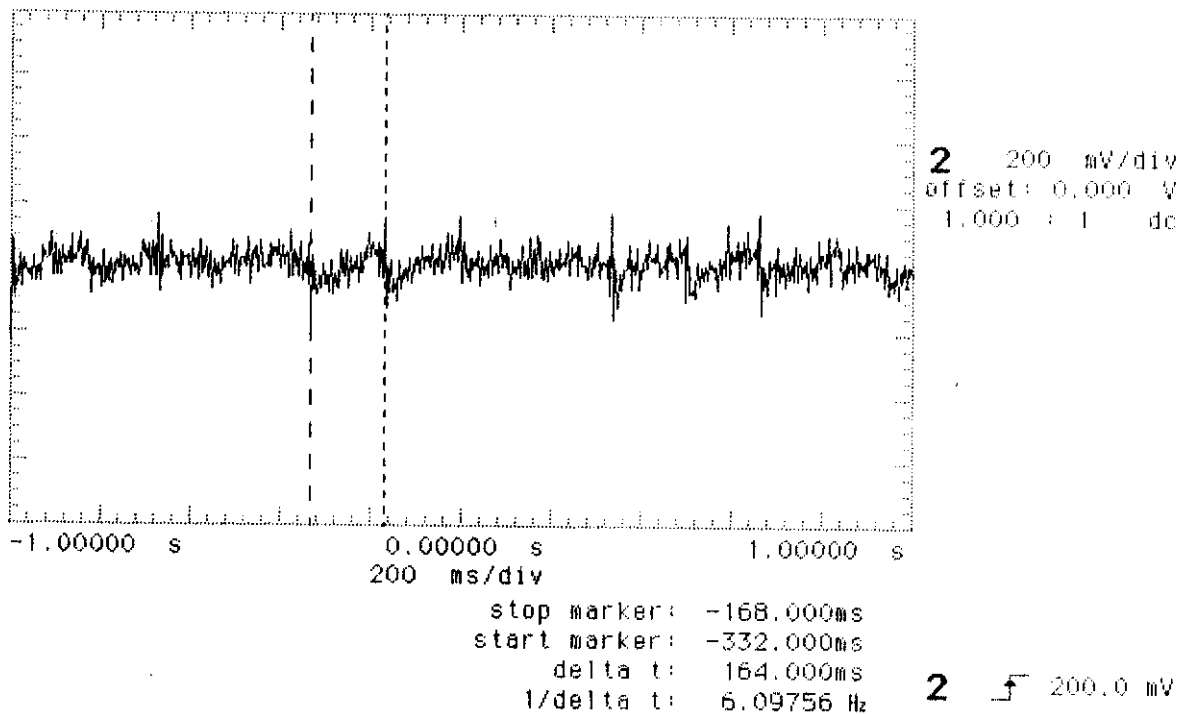


Fig. 20.- Registro en el momento de la extracción del corazón rechazado, la ausencia de ventriculograma se corresponde con la ausencia de palpación abdominal de latido cardíaco. Entre el ruido del registro, parece distinguirse una actividad auricular a 365 ppm. (DII, 25 mms).

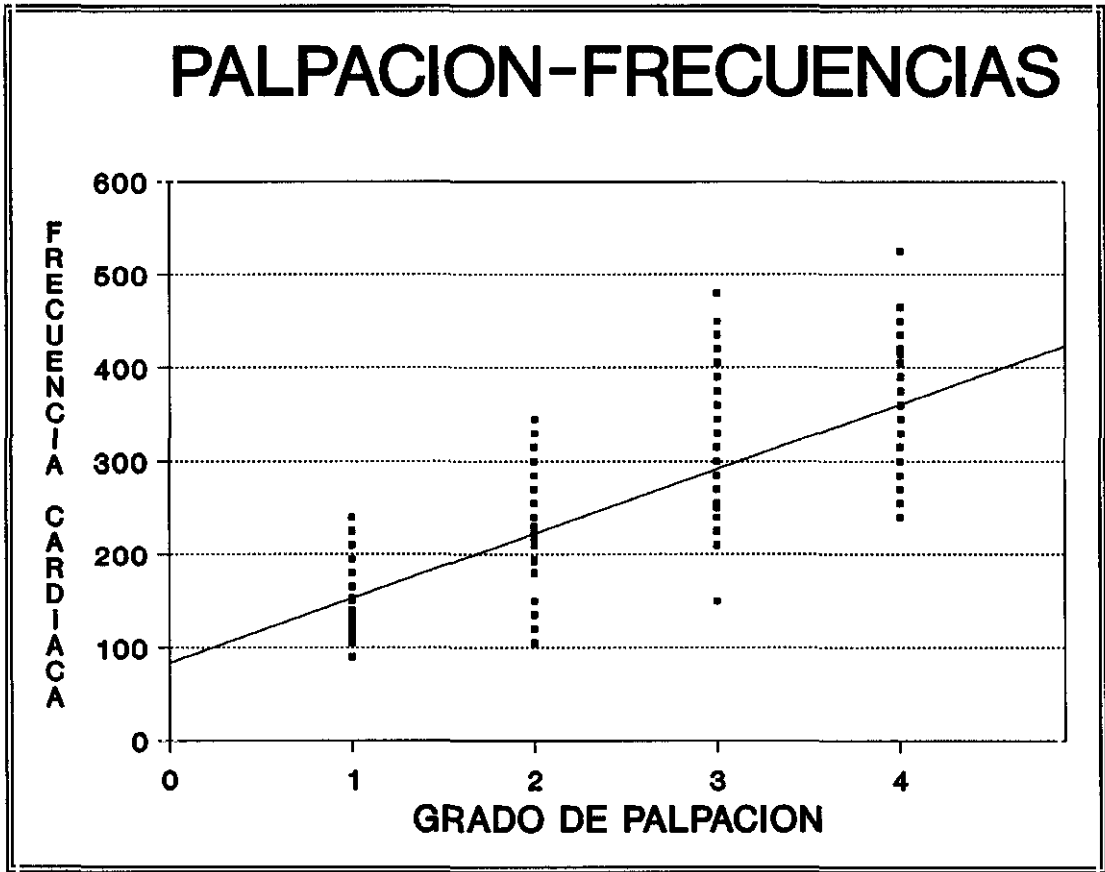


Fig. 21.- Relación entre las frecuencias cardíacas con sus correspondientes grados de palpación.

GRADO	FRECUENCIA MEDIA	CARACTERISTICAS ELECTROCARDIOGRAFICAS
4	349	Ausencia de alteraciones significativas en ECG una vez transcurridas las 48 horas posteriores a la cirugía
3	320	ECG normal, a veces bloqueo A-V completos con ritmos idioventriculares. Ocasionalmente latidos ventriculares ectópicos en bigeminismo
2	216	Bloqueos A-V completos con ritmos idioventriculares. Disminución voltajes de QRS. Bradicardia. CVP
1	147	Bloqueos A-V completos con ritmos idioventriculares, con frecuencia multiformes. Bradicardia muy marcada. Complejos ventriculares prematuros frecuentes. QRS de voltaje disminuido. Alternancia eléctrica.
0	-	Sin actividad eléctrica. A veces aparece fibrilación ventricular o actividad auricular.

Tabla 5.- Relación entre los diferentes grados de palpación y sus características electrocardiográficas

#### **4.- VALORACION DE GRUPOS DE CICLOSPORINA**

Se valoraron las dosis de ciclosporina con el fin de establecer dosis subterapéuticas límites para ver su comportamiento en la asociación con el PCA-4248, de los cuatro niveles de dosis probados, 0,25; 0,5; 2 y 10mg/kg (todos ellos considerados en la bibliografía como subterapéuticos), se obtuvieron unos resultados de supervivencia que aconsejaron utilizar la dosis inferior de 0,25 mg/kg, que presentaba un ligero efecto en el aumento de la supervivencia, siendo éste ya significativo, y la dosis de 2 mg/kg como dosis superior, que presentaba unos niveles de supervivencia más importantes, pero con gran variabilidad entre los diferentes casos.

#### **5.- SUPERVIVENCIA**

Los criterios de rechazo total, para la extracción del corazón trasplantado, se basaron en lo anteriormente expuesto, ausencia de latido y silencio electrocardiográfico. El grupo control tuvo una supervivencia media de 7,73 días, no existiendo diferencia con el grupo tratado exclusivamente con PCA-4248, pero sí con los restantes grupos (Tabla 6).

Tampoco existió diferencia entre los grupos tratados con ciclosporina sola y los correspondientes asociados a PCA-4248. Con la dosis de 0,25 mg/kg de ciclosporina la media con el grupo asociado al PCA-4248 es la misma, 12,40 días (Tabla 7).

Con la dosis de 2mg/kg de ciclosporina, la supervivencia

estuvo en 26,57, frente a los 37,06 de la misma dosis asociada al PCA-4248 (Tabla 8), donde se obtuvieron los máximos valores de supervivencia (Fig.22)

GRUPO	$\bar{X} \pm DT$	n	t	p	Sign
PCA-4248	8,33 ± 1,77	12	1,07	0,291	NS
CyA 0,25mg/kg	12,40 ± 4,03	10	4,28	0,000	S
CyA 0,5mg/kg	24,60 ± 10,45	5	6,50	0,000	S
CyA 2mg/kg	26,57 ± 14,86	14	4,89	0,000	S
CyA 10 mg/kg	31,25 ± 3,59	4	23,09	0,000	S
PCA+CyA 0,25mg/kg	12,40 ± 1,50	10	8,97	0,000	S
PCA+CyA 2mg/kg	37,06 ± 15,55	15	7,28	0,000	S

TABLA n° 6. Comparación del tiempo de supervivencia en días de los diferentes grupos, en relación al grupo control ( $\bar{X}=7,73$ ;  $DT\pm 1,09$ ;  $n=15$ )

Grupo	$\bar{X} \pm DT$	n	t	p	Sign
PCA+CyA 0,25mg/kg	12,40 ± 1,50	10	0	1	NS

TABLA n° 7. Comparación del tiempo de supervivencia en días de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 0,25 mg/kg, en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 0,25 mg/kg.  
( $\bar{X}=12,40$ ;  $DT\pm 4,03$ ;  $n=10$ )

Grupo	$\bar{X} \pm DT$	n	t	p	Sign
PCA+CyA 2mg/kg	37,06 ± 15,55	15	1,85	0,075	NS

TABLA n° 8. Comparación del tiempo de supervivencia en días de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 2 mg/kg, en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 2 mg/kg ( $\bar{X}=26,57$ ;  $DT\pm 14,86$ ;  $n=14$ )

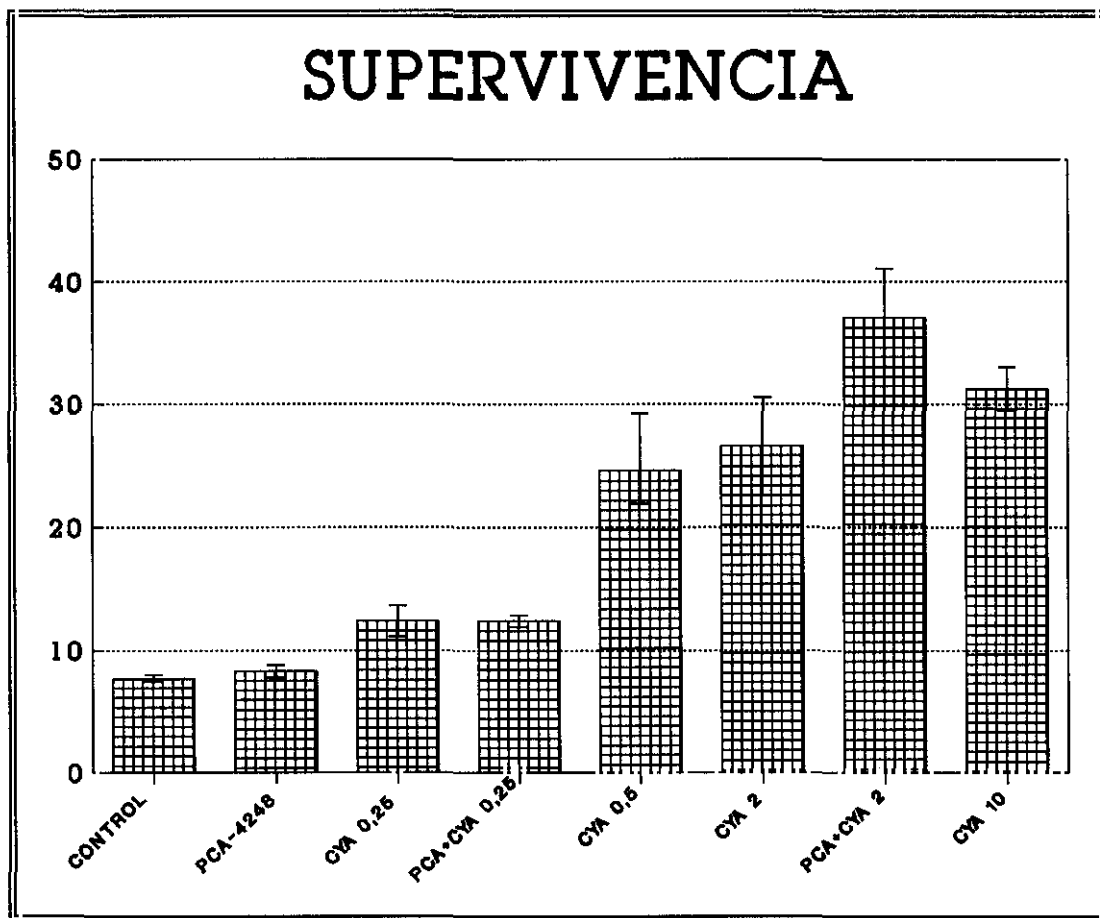


Fig 22.- Supervivencia en días de los diferentes grupos expresados como  $\bar{X} \pm ETM$ .

## 6.- HISTOLOGIA

Los corazones rechazados, se extrajeron cuando presentaban un cese total de latido cardíaco, por tanto la situación lesional fue en todos los casos muy avanzada.

Las lesiones encontradas se reflejan según los distintos grupos:

**Grupo singénico.**- Los corazones correspondientes a este grupo presentaban todos en el momento de su extracción a los 100 días, un latido grado 3, sin ningún signo de rechazo. En su examen histológico no se apreciaron lesiones, presentando un cuadro de normalidad (Fig. 23)

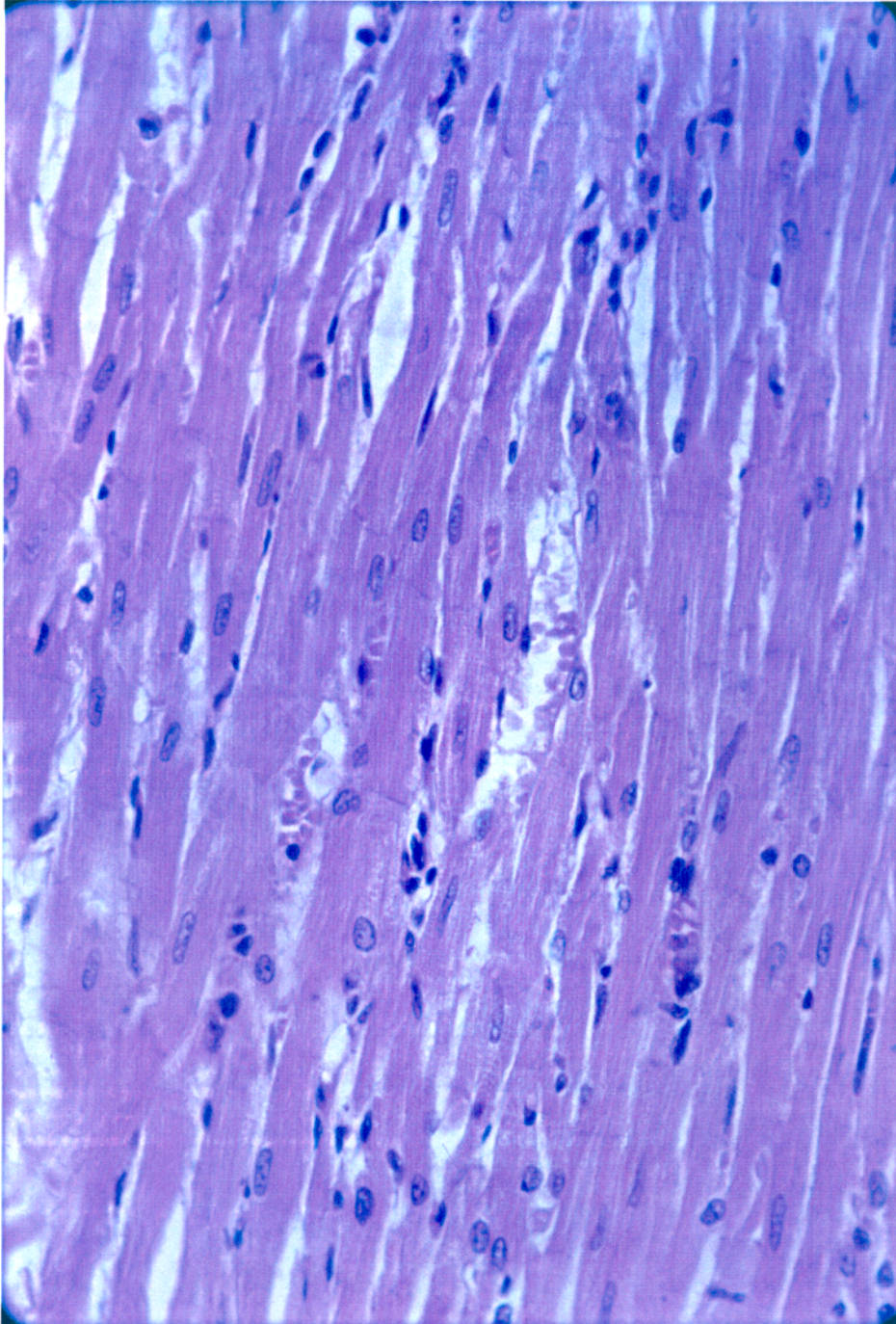


Fig. 23.- Trasplante singénico. No se aprecian lesiones histológicas. (H-E, 400x).

**Grupo de evolución.-** Ninguno de los casos estudiados en las primeras cuarenta y ocho horas, presentaron lesiones relacionadas con rechazo. Sí presentaron un intenso infiltrado inflamatorio pericárdico y subpericárdico, relacionado con el acto quirúrgico, el cual también estuvo presente en todos los casos de evolución posterior y en los diferentes grupos.

Al tercer día, de los dos casos remitidos, en uno de ellos aparece un infiltrado inflamatorio ligero (1) con un 20% de blastos, no existiendo edema ni necrosis miocelular. El otro caso no presentaba ninguna lesión.

Al cuarto día aparece un infiltrado inflamatorio moderado (2) con un 50% de blastos, sin presentar otro tipo de lesiones. Al quinto día persiste un cuadro similar al del día anterior respecto al infiltrado, pero uno de los casos presenta un edema moderado (2) perivascular e intersticial.

**Grupo ciclosporina 0,5 mg/kg.-** Los 5 casos de este grupo presentaron en general un grado entre ligero (1) y moderado de intensidad inflamatoria (2) con un porcentaje de blastos de un 38% de media, un edema ligero (1), escasa necrosis miocelular y dos casos de vasculitis endotelial, uno de ellos con lesión en pared.

**Grupo de ciclosporina 10 mg/kg.-** Los 4 casos de este grupo presentaron en general un grado intenso de infiltrado inflamatorio, escaso porcentaje de blastos (12,5%), edema moderado, ligera necrosis miocelular y ausencia de lesión vascular.

**Grupos de estudio en relación a las diferentes lesiones.**

### **6.1.- Intensidad inflamatoria (Figs. 24, 25 y 26)**

**Grupo control.-** De los 15 casos estudiados, 8 presentaron un intenso infiltrado inflamatorio (3), presentando los 7 restantes un grado moderado (2), ningún caso presentó ausencia o grado ligero de infiltrado.

**Grupo PCA-4248.-** De los 12 casos estudiados, 2 presentaron un grado intenso de infiltrado inflamatorio, 8 presentaron un grado moderado y 2 un grado ligero.

**Grupo ciclosporina 0,25 mg/kg.-** De los 10 casos estudiados, 1 presentó un infiltrado intenso, 6 moderado y 3 ligero.

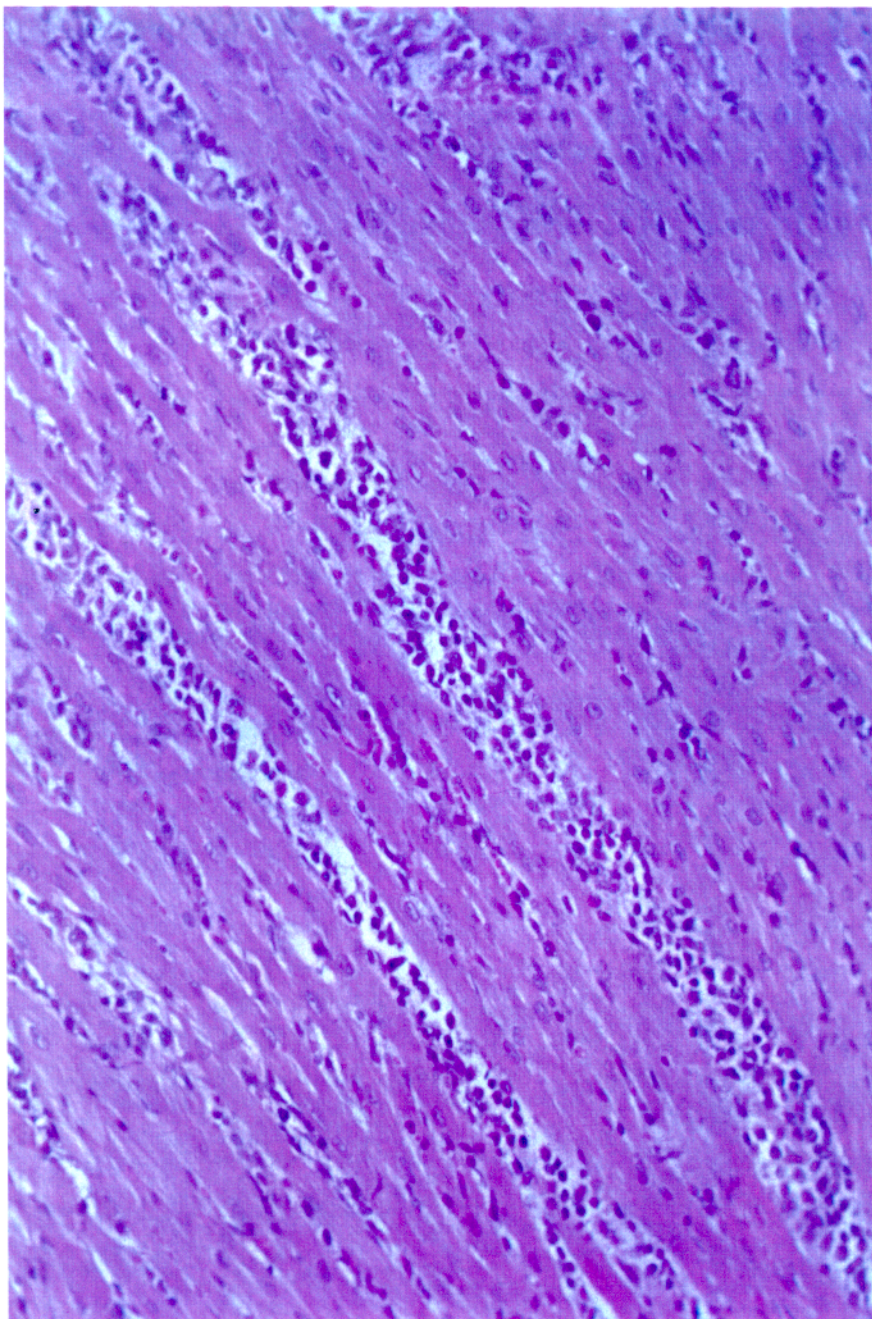
**Grupo de ciclosporina 0,25 mg/kg y PCA-4248.-** De los 10 casos estudiados 6 presentaron un grado moderado y cuatro un grado ligero, ninguno presentó ausencia ni infiltrados intensos.

**Grupo de ciclosporina 2 mg/kg.-** De los 14 casos estudiados 8 presentaron un infiltrado intenso, cuatro moderado y dos un infiltrado ligero.

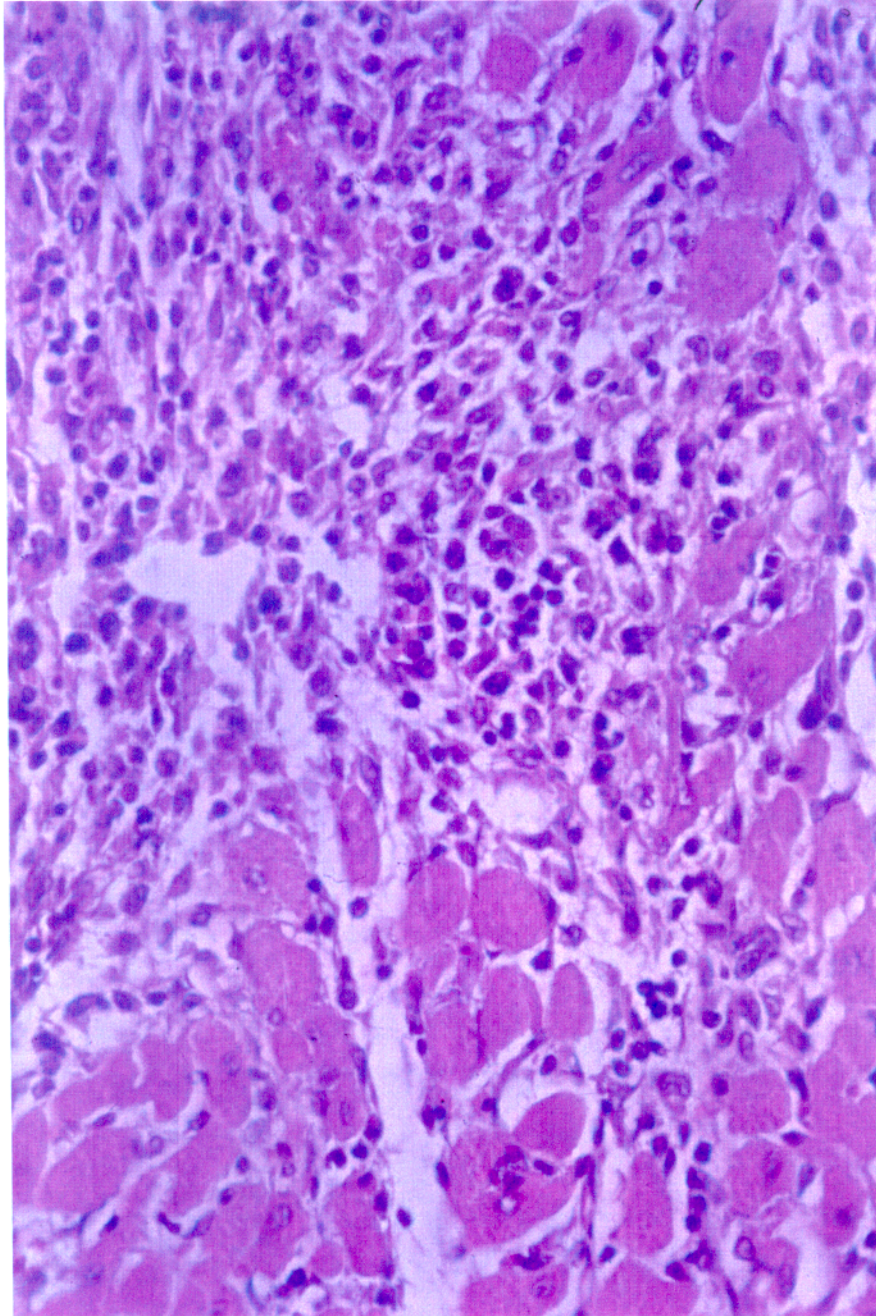
**Grupo de ciclosporina 2 mg/kg y PCA-4248.-** De los 15 casos estudiados 12 presentaron un infiltrado intenso, 2 un infiltrado moderado, no hubo ningún caso de infiltrado ligero.

En las tablas 9, 10 y 11 se comparan los infiltrados

inflamatorios de los diferentes grupos, dando su significación estadística.



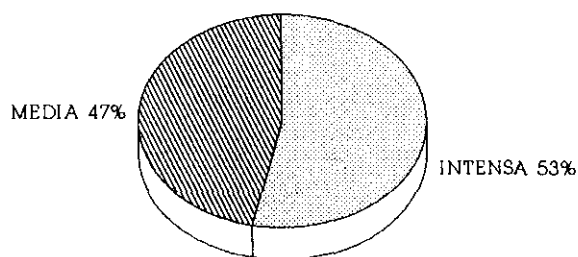
**Fig. 24.-** Infiltrado de mononucleantes intersticial y perivascular escasamente confluyente. El infiltrado es de linfocitos y escasos leucocitos polinucleares.  
(H-E, 200x)



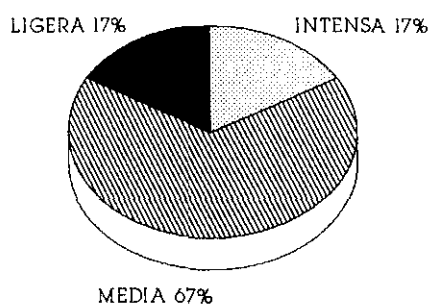
**Fig. 25.-** Infiltrado linfocítico y de blastos de situación perivascular con extensión al intersticio muscular.  
(H-E, 400x)

# INTENSIDAD INFLAMATORIA

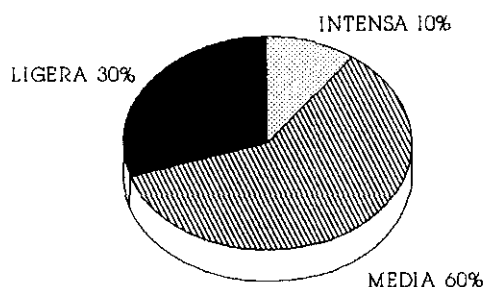
CONTROL



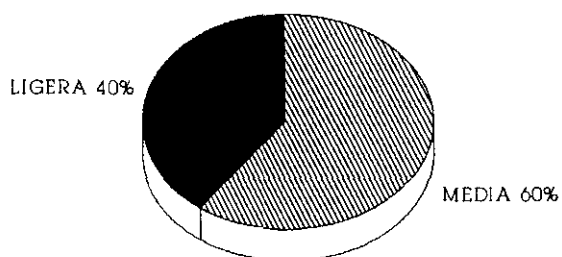
PCA-4248



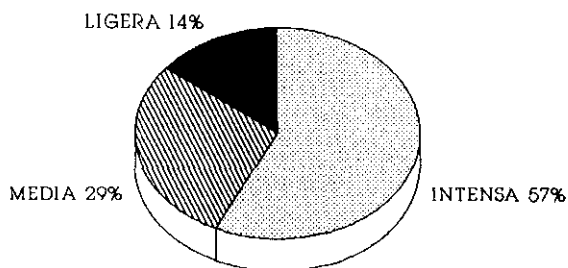
CICLOSPORINA 0,25 mg/kg



PCA+CyA 0,25 mg/kg



CICLOSPORINA 2 mg/kg



PCA+CyA 2 mg/kg

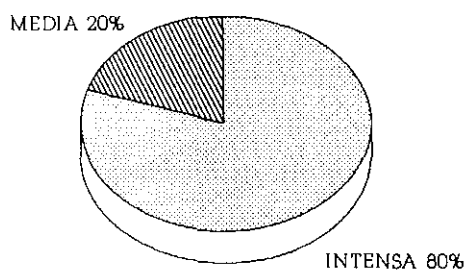


Fig. 26.- Comparación entre los distintos grupos de la intensidad del infiltrado inflamatorio.

GRUPO	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA-4248	12	5,40	0,067	NS
CyA 0,25mg/kg	10	7,38	0,019	S
PCA+CyA 0,25mg/kg	10	11,53	0,003	S
CyA 2mg/kg	14	2,78	0,248	NS
PCA+CyA 2mg/kg	15	2,40	0,121	NS

TABLA n° 9. Comparación de la intensidad del infiltrado inflamatorio de los diferentes grupos, en relación al grupo control.

Grupo	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA+CyA 0,25mg/kg	10	1,14	0,564	NS

TABLA n° 10. Comparación de la intensidad del infiltrado inflamatorio de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 0,25 mg/kg, en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 0,25 mg/kg.

Grupo	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA+CyA 2mg/kg	15	2,91	0,233	NS

TABLA n° 11. Comparación de la intensidad del infiltrado inflamatorio de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 2 mg/kg, en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 2 mg/kg.

## 6.2.- *Blastos* (Figs. 27 y 28)

**Grupo Control.-** La media en el porcentaje de blastos dentro del grupo control fue de 48,67%, presentándose en cuatro casos porcentajes del 60% del total del infiltrado inflamatorio, seis casos presentaron un 50%, cuatro un 40% y solamente uno presentó un 30%

**Grupo PCA-4248.-** La media en el porcentaje de blastos, se situó en un 25,83%, solamente 2 casos superaron el 30% de blastos sobre el infiltrado inflamatorio total (uno con un 40% y otro con un 60%), 5 casos presentaron un 30%, 1 un 20% y 4 un 10%

**Grupo de ciclosporina 0,25 mg/kg.-** El porcentaje medio en el infiltrado de blastos en este grupo es de un 54%, 4 casos presentaron porcentajes superiores al 50% (3 con un 60% y uno con un 70%) y solamente 1 caso estuvo por debajo (40%).

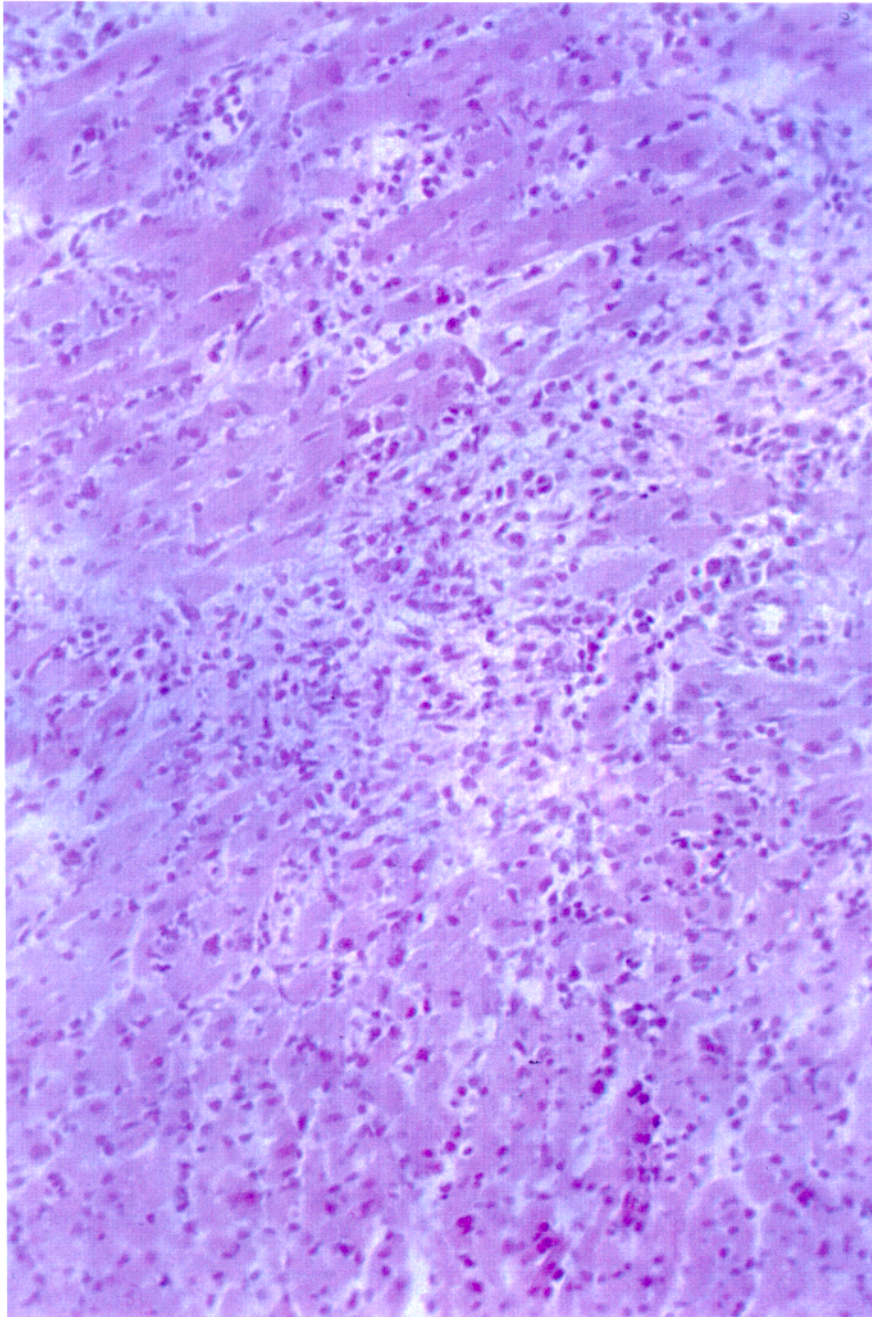
**Grupo de ciclosporina 0,25 mg/kg y PCA-4248.-** La media en el infiltrado de blastos fue del 48,50%, 2 casos estuvieron por encima del 50% (65 y 60%) y solamente dos por debajo (30%).

**Grupo de ciclosporina 2 mg/kg.-** Este grupo presentó una media de 22,86%, solamente en 2 casos el porcentaje de blastos estuvo en el 50%, 4 casos presentaron una intensidad entre el 25% y el 30%, siendo los restantes casos del 20%

o inferior.

**Grupo de ciclosporina 2 mg/kg y PCA-4248.-** La media del infiltrado de blastos respecto al infiltrado inflamatorio total en este grupo fue del 23%, solo un caso presentó un 60% y otro un 50%, 3 casos estuvieron entre el 30% y el 40%, siendo los restantes casos del 20% o inferior.

En las tablas 12, 13 y 14 se comparan las diferentes intensidades en el infiltrado de blastos entre los diferentes grupos de estudio, dando su significación estadística.



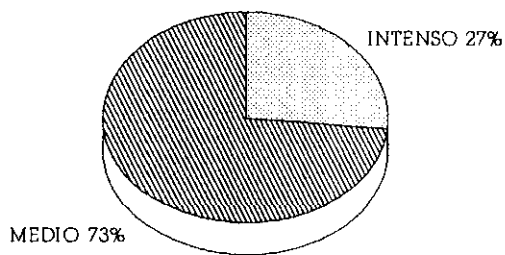
**Fig. 27.-** Infiltrado de mononucleares perivascular e intersticial. En el infiltrado toman parte linfocitos y elementos blásticos de mayor tamaño. (H-E, 200x)

Fig. 28.- Comparación del infiltrado de blastos entre los distintos grupos de estudio.

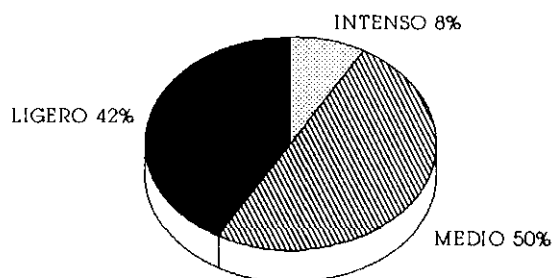
- Ligero.- Porcentaje de blastos superior al 50% del infiltrado inflamatorio total.
- Medio.- Porcentaje de blastos entre el 30% y el 50% del infiltrado inflamatorio total.
- Intenso.- Porcentaje de blastos inferior al 30% del infiltrado inflamatorio total.

# INFILTRADO DE BLASTOS

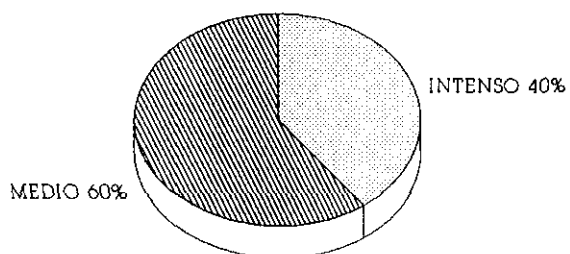
CONTROL



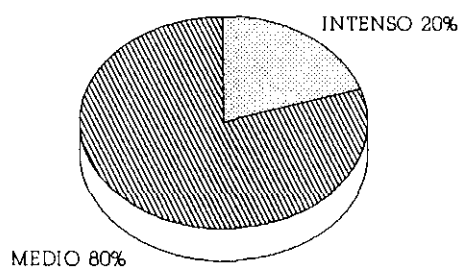
PCA-4248



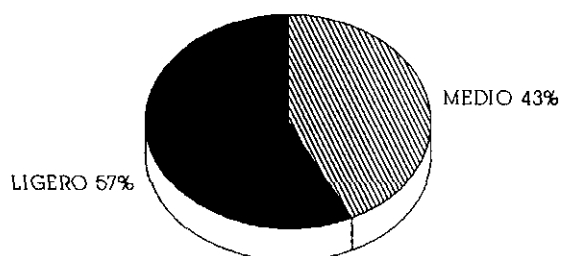
CICLOSPORINA 0,25 mg/kg



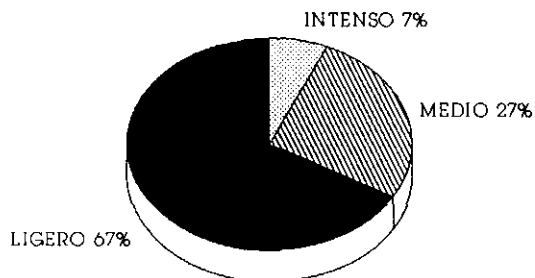
PCA+CyA 0,25 mg/kg



CICLOSPORINA 2 mg/kg



PCA+CyA 2 mg/kg



GRUPO	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA-4248	12	17,14	0,004	S
CyA 0,25 mg/kg	10	3,16	0,531	NS
PCA+CyA 0,25 mg/kg	10	6,38	0,171	NS
CyA 2mg/kg	14	20,32	0,004	S
PCA+CyA 2mg/kg	15	17,50	0,014	S

TABLA n° 12. Comparación del porcentaje de blastos en el infiltrado de los diferentes grupos, en relación al grupo control.

Grupo	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA+CyA 0,25mg/kg	10	6,09	0,297	NS

TABLA n° 13. Comparación del porcentaje de blastos en el infiltrado de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 0,25 mg/kg en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 0,25 mg/kg.

Grupo	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA+CyA 2mg/kg	15	8,97	0,439	NS

TABLA n° 14. Comparación del porcentaje de blastos en el infiltrado de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 2 mg/kg en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 2 mg/kg.

### 6.3.- Edema (Figs. 29 y 30)

**Grupo control.**- Dentro de este grupo, 9 casos presentaron un grado de edema intenso, 5 moderado y solamente uno un grado ligero, ningún caso presentó ausencia de edema perivascular y/o intersticial.

**Grupo PCA-4248.**- La mayor parte de los casos presentó un edema moderado, excepto 2 casos que presentaron ausencia de edema.

**Grupo de ciclosporina 0,25 mg/kg.**- El edema moderado estuvo presente en 7 casos, 2 presentaron edema ligero y en un caso hubo ausencia total.

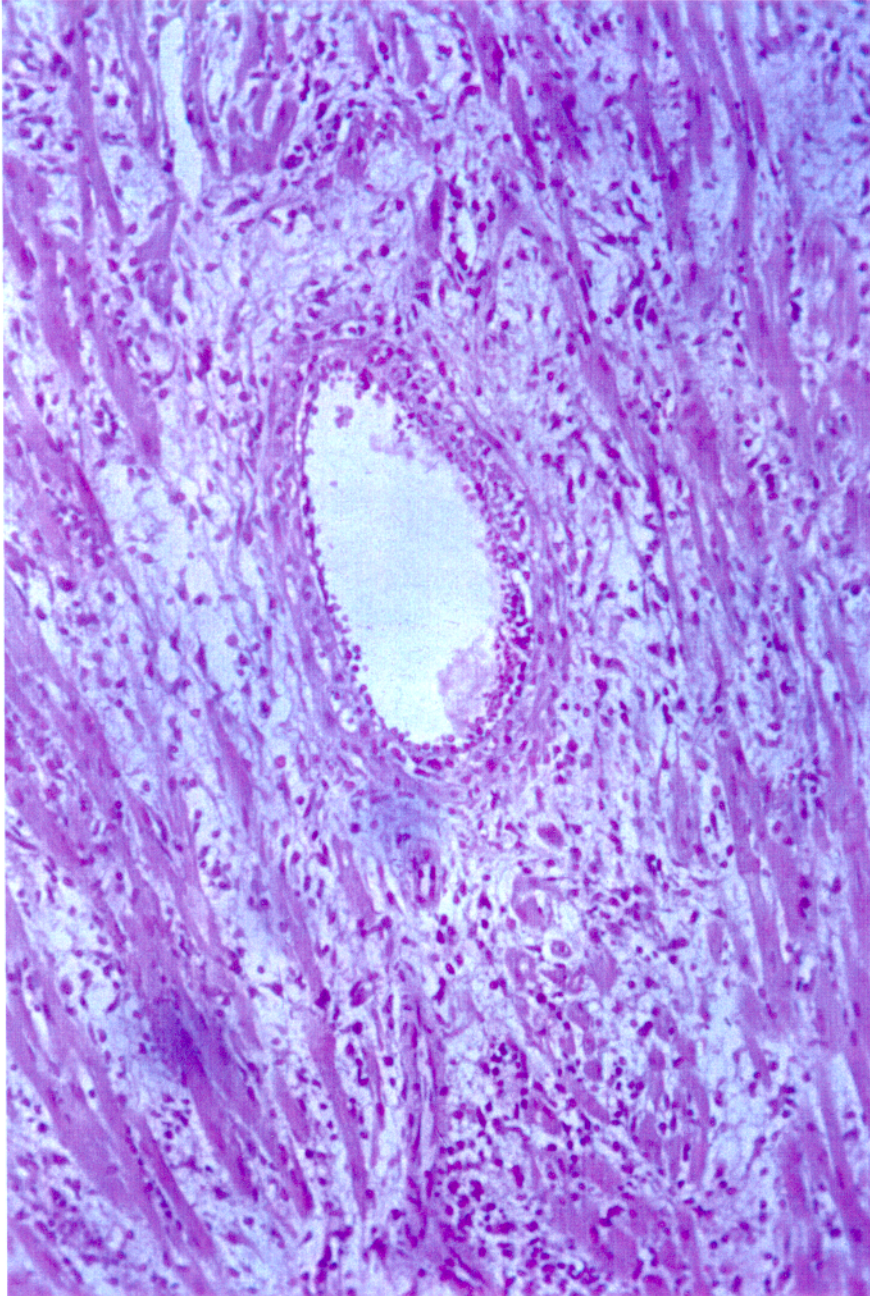
**Grupo de ciclosporina 0,25 mg/kg y PCA-4248.**- Solamente 2 casos presentaron edema moderado, 4 edema ligero y otros 4 ausencia total.

**Grupo de ciclosporina 2 mg/kg.**- El edema intenso apareció en 3 casos, 7 presentaron edema moderado, 2 ligero y en dos hubo ausencia total.

**Grupo de ciclosporina 2 mg/kg y PCA-4248.**- Se presentó edema intenso en 8 casos, moderado en 3 y ausencia total en 4 casos.

Las tablas 15, 16 y 17, muestran la comparación del grado de intensidad del edema entre los diferentes grupos

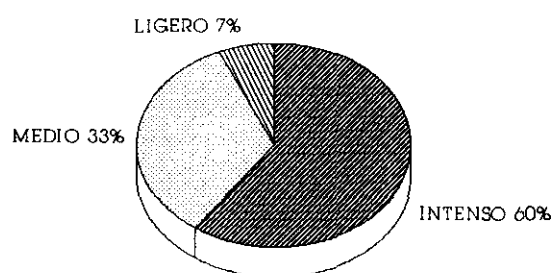
de estudio y su significación estadística.



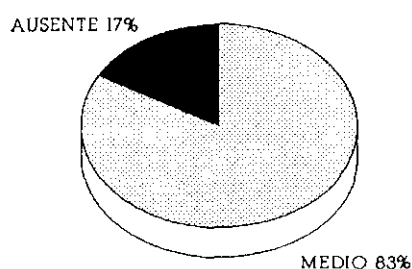
**Fig. 29.-** Foco inflamatorio perivascular en que predomina el edema. Las miocélulas están separadas y adelgazadas, y en el seno del área perivascular ensanchada por el líquido exudado, hay linfocitos y blastos.  
(H-E, 100x)

# INTENSIDAD DEL EDEMA

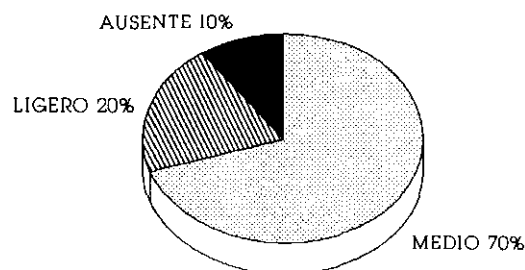
CONTROL



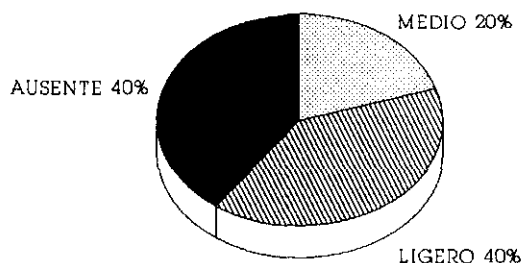
PCA-4248



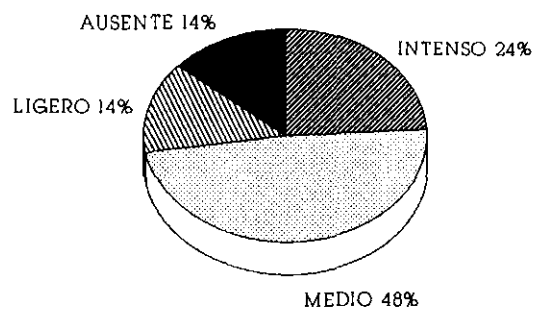
CICLOSPORINA 0,25 mg/kg



PCA+CyA 0,25mg/kg



CICLOSPORINA 2 mg/kg



PCA+CyA 2 mg/kg

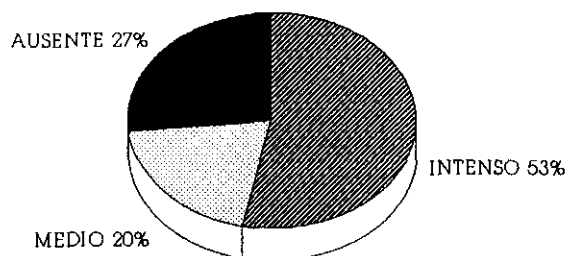


Fig. 30.- Comparación del grado de edema entre los diferentes grupos de estudio.

GRUPO	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA-4248	12	13,50	0,003	S
CyA 0,25mg/kg	10	10,06	0,018	S
PCA+CyA 0,25mg/kg	10	15,71	0,001	S
CyA 2mg/kg	14	5,63	0,134	NS
PCA+CyA 2mg/kg	15	5,55	0,135	NS

TABLA n° 15. Comparación de la intensidad del edema de los diferentes grupos, en relación al grupo control.

Grupo	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA+CyA 0,25mg/kg	10	5,24	0,072	NS

TABLA n° 16. Comparación de la intensidad del edema de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 0,25mg/kg en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 0,25 mg/kg.

Grupo	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA+CyA 2mg/kg	15	6,51	0,089	NS

TABLA n° 17. Comparación de la intensidad del edema de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 2 mg/kg en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 2 mg/kg.

#### **6.4.- Necrosis miocelular (Figs. 31 y 32)**

**Grupo control.-** Solamente un caso presentó una necrosis intensa, 10 presentaron un grado moderado y cuatro una necrosis ligera.

**Grupo PCA-4248.-** Solamente en 5 casos hubo necrosis miocelular, siendo ésta de grado moderado, estando ausente en los restantes casos.

**Grupo de ciclosporina 0,25 mg/kg.-** La necrosis intensa se presentó en 2 casos, moderada en solo 1 caso, ligera en 6 casos, estando ausente en otro caso.

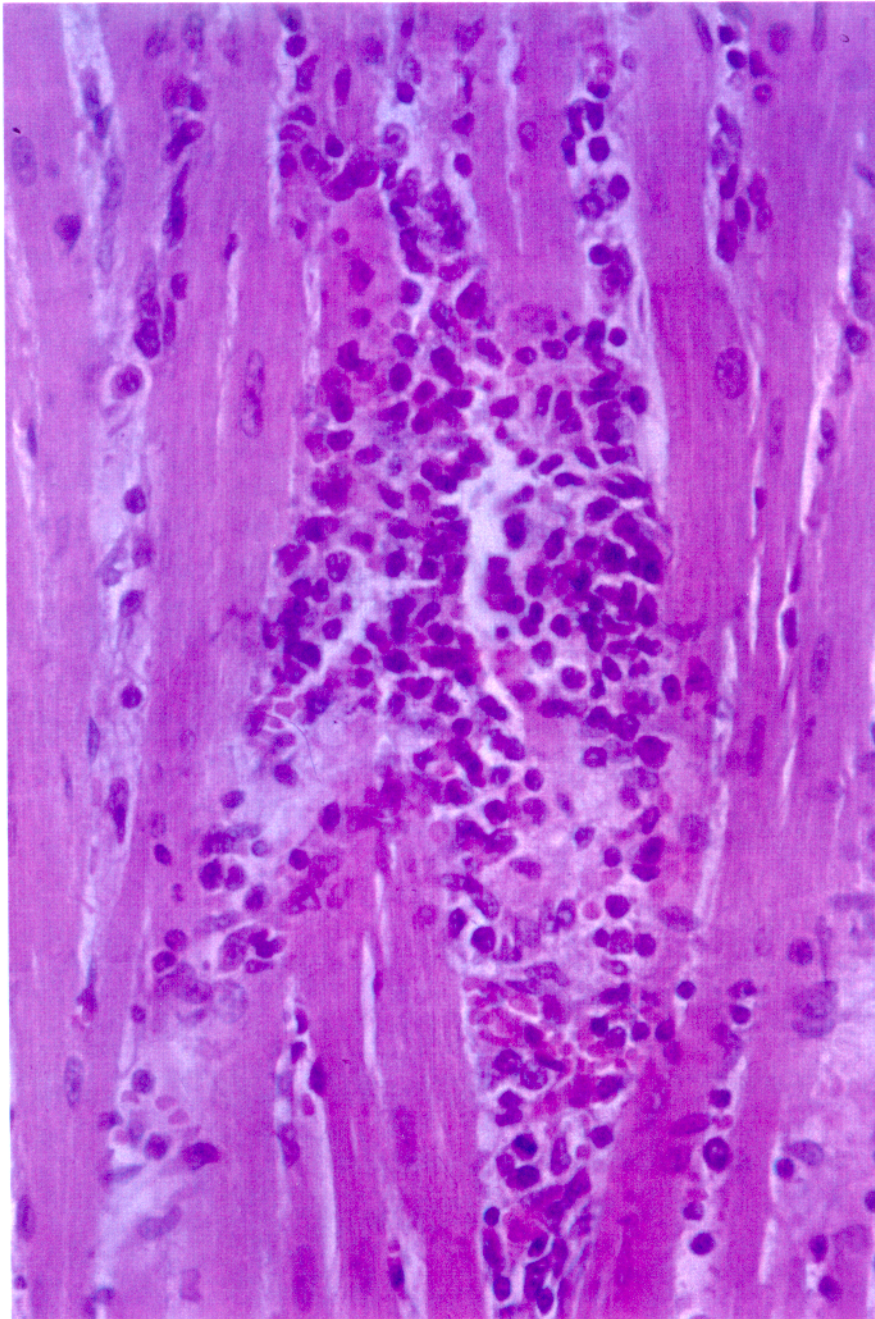
**Grupo de ciclosporina 0,25 mg/kg y PCA-4248.-** Solamente 1 caso presentó una necrosis moderada, en 3 ésta fue ligera, estando ausente en los restantes 6 casos.

**Grupo de ciclosporina 2 mg/kg.-** En 2 casos se presentó una necrosis intensa, en 8 fue moderada, en 2 ligera y en otros 2 estuvo ausente.

**Grupo de ciclosporina 2 mg/kg y PCA 4248.-** Solamente un caso presentó una necrosis intensa, la necrosis moderada estuvo presente en 8 casos, en uno fue ligera, estando ausente en 5 casos.

Las tablas 18, 19 y 20 muestran la comparación del grado de necrosis miocelular entre los distintos grupos y su grado

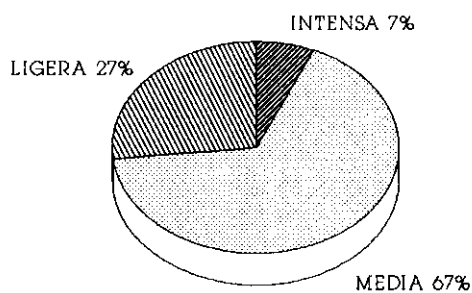
de significación estadística.



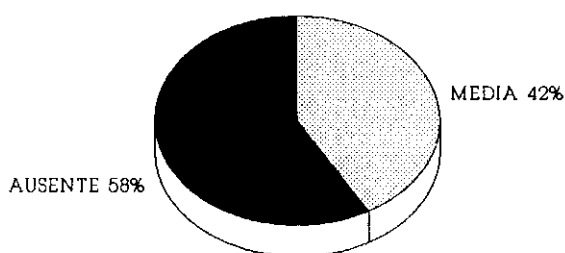
**Fig. 31.-** Foco de destrucción miocítica con infiltrado de elementos inflamatorios.  
(H-E, 400x)

# NECROSIS MIOCELULAR

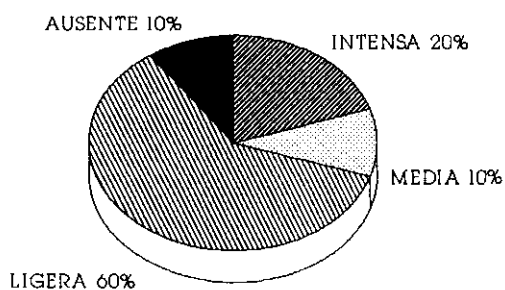
CONTROL



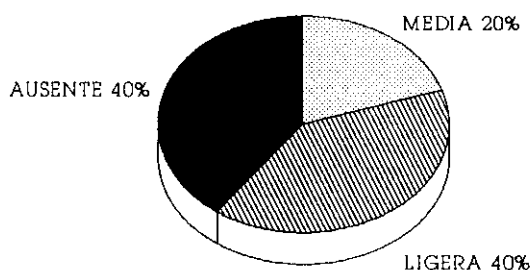
PCA-4248



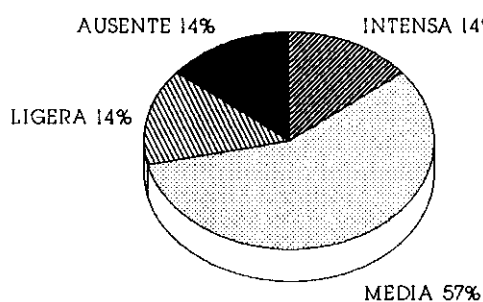
CICLOSPORINA 0,25 mg/kg



PCA+CyA 0,25 mg/kg



CICLOSPORINA 2 mg/kg



PCA+CyA 2 mg/kg

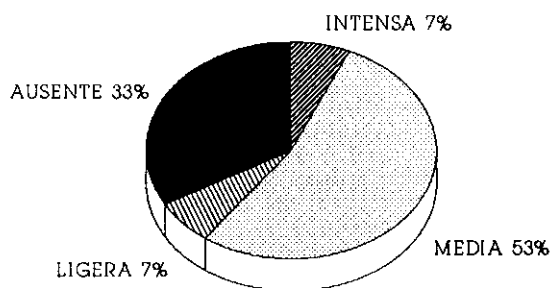


Fig. 32.- Comparación del grado de necrosis miocelular entre los diferentes grupos de estudio.

GRUPO	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA-4248	12	13,50	0,003	S
CyA 0,25mg/kg	10	8,43	0,037	S
PCA+CyA 0,25mg/kg	10	14,08	0,002	S
CyA 2mg/kg	14	3,19	0,363	NS
PCA+CyA 2mg/kg	15	7,02	0,071	NS

TABLA n° 18. Comparación de la intensidad en la necrosis miocelular de los diferentes grupos, en relación al grupo control.

Grupo	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA+CyA 0,25mg/kg	10	6,57	0,086	NS

TABLA n° 19. Comparación de la intensidad en la necrosis miocelular de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 0,25 mg/kg en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 0,25 mg/kg.

Grupo	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA+CyA 2mg/kg	15	1,92	0,589	NS

TABLA n° 20. Comparación de la intensidad en la necrosis miocelular de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 2 mg/kg en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 2 mg/kg.

### **6.5.- Vasculitis (Figs. 33, 34, 35, 36 y 37)**

**Grupo control.-** En este grupo solamente hubo ausencia total de vasculitis en 2 casos, 13 casos presentaron vasculitis con afectación endotelial, de los cuales 7 presentaron además afectación en pared.

**Grupo PCA-4248.-** La ausencia total de vasculitis ocurrió en 8 casos de este grupo, de los 4 casos que presentaron vasculitis con afectación endotelial, solamente 1 presentó afectación en pared.

**Grupo de ciclosporina 0,25 mg/kg.-** La vasculitis con lesión endotelial apareció en 6 casos, de los cuales 4 presentaron lesión en pared. La ausencia total de vasculitis ocurrió en 4 casos.

**Grupo de ciclosporina 0,25 mg/kg y PCA-4248.-** La ausencia total de vasculitis se presentó en 7 casos, en 3 casos la lesión fue endotelial, de los cuales en 2 se presentaron lesiones en pared.

**Grupo de ciclosporina 2 mg/kg.-** La vasculitis endotelial apareció en 8 casos, 5 de ellos presentaron además lesión en pared. La ausencia ocurrió en 6 casos.

**Grupo de ciclosporina 2 mg/kg y PCA-4248.-** La vasculitis endotelial apareció en 8 casos, presentándose lesión en pared en 5 de ellos. La ausencia total ocurrió en 7 casos.

Las tablas 21, 22 y 23, muestran la comparación en la lesión de vasculitis con afectación endotelial (moderada) entre los diferentes grupos y su grado de significación estadística.

Las tablas 24, 25 y 26, muestran la comparación en la lesión de vasculitis con afectación en pared (intensa) entre los diferentes grupos y su grado de significación estadística.

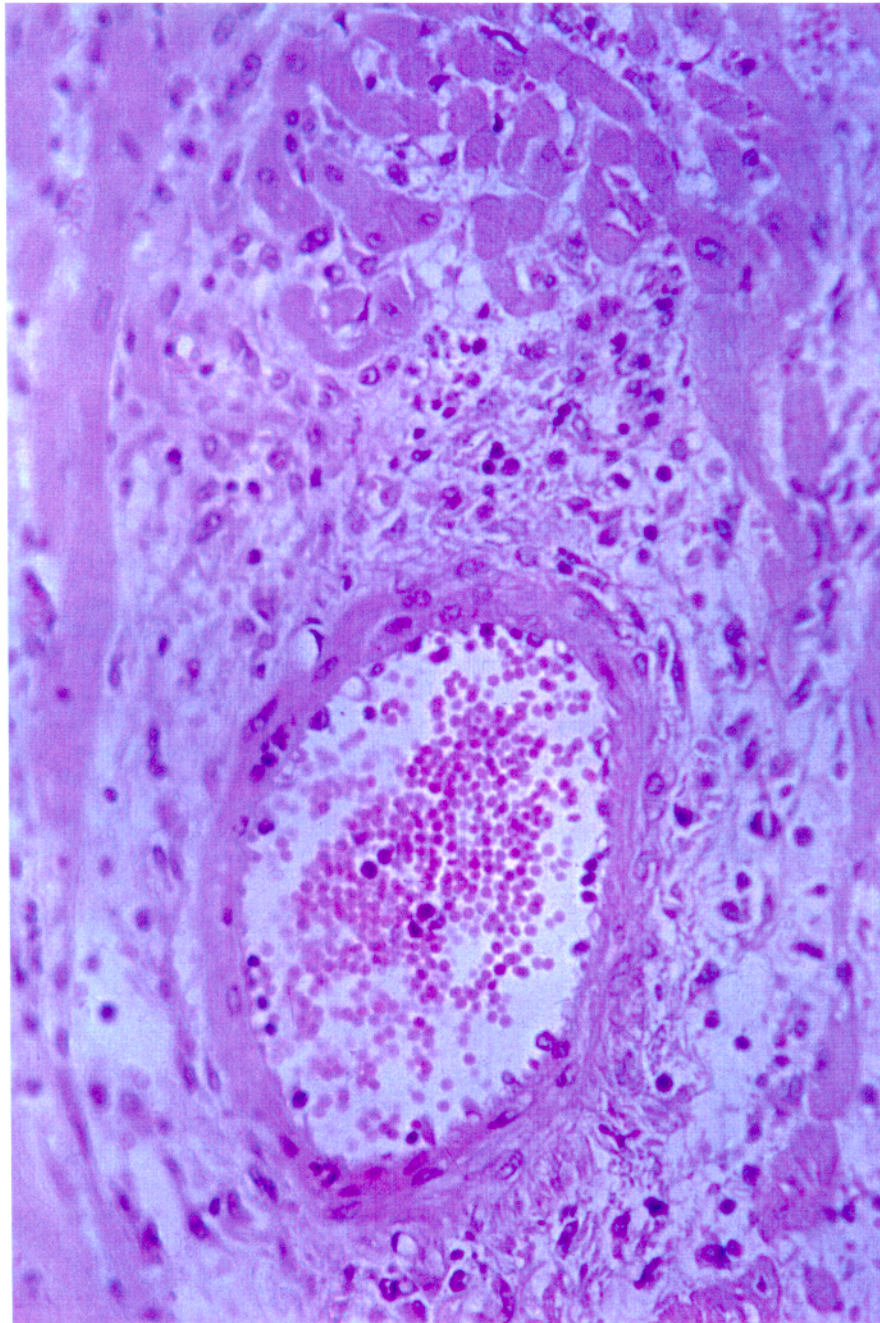
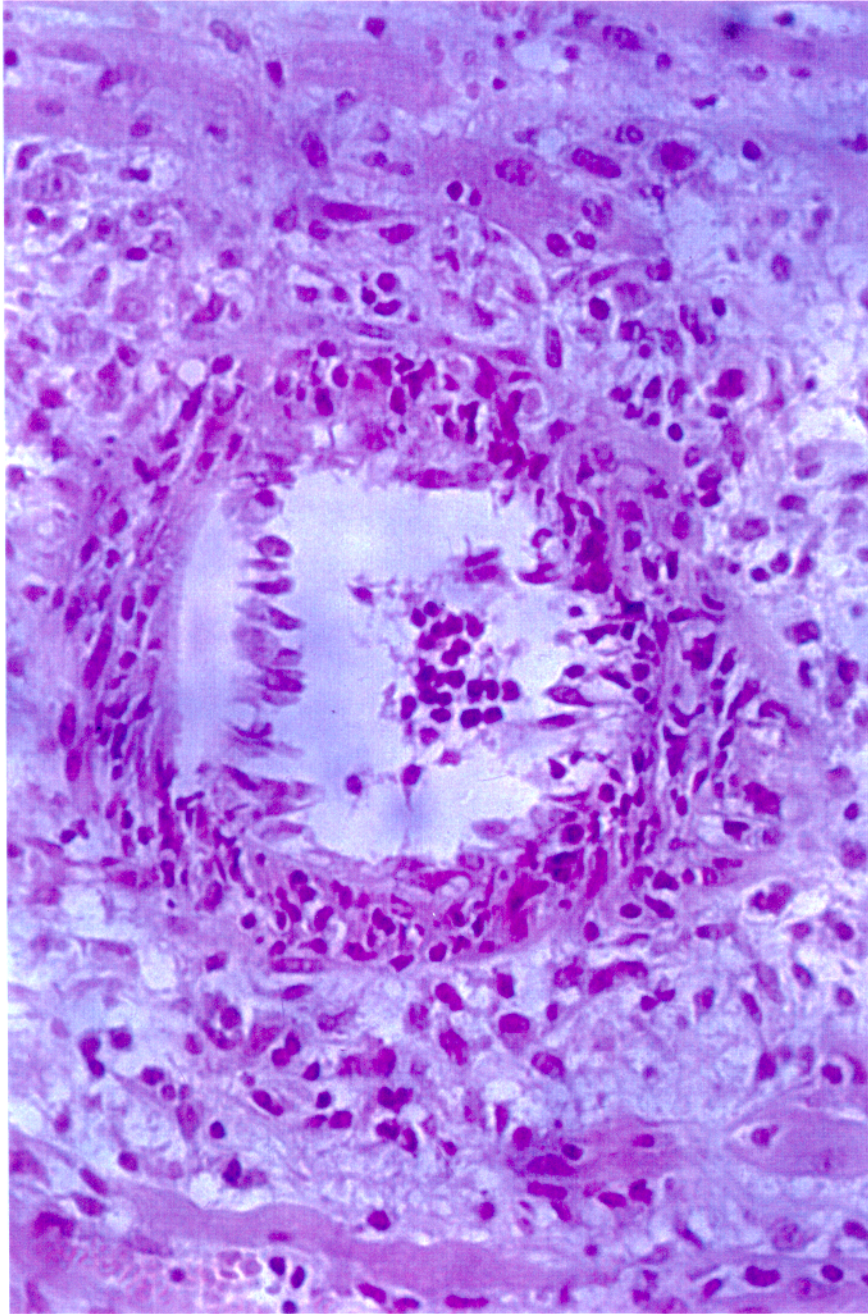
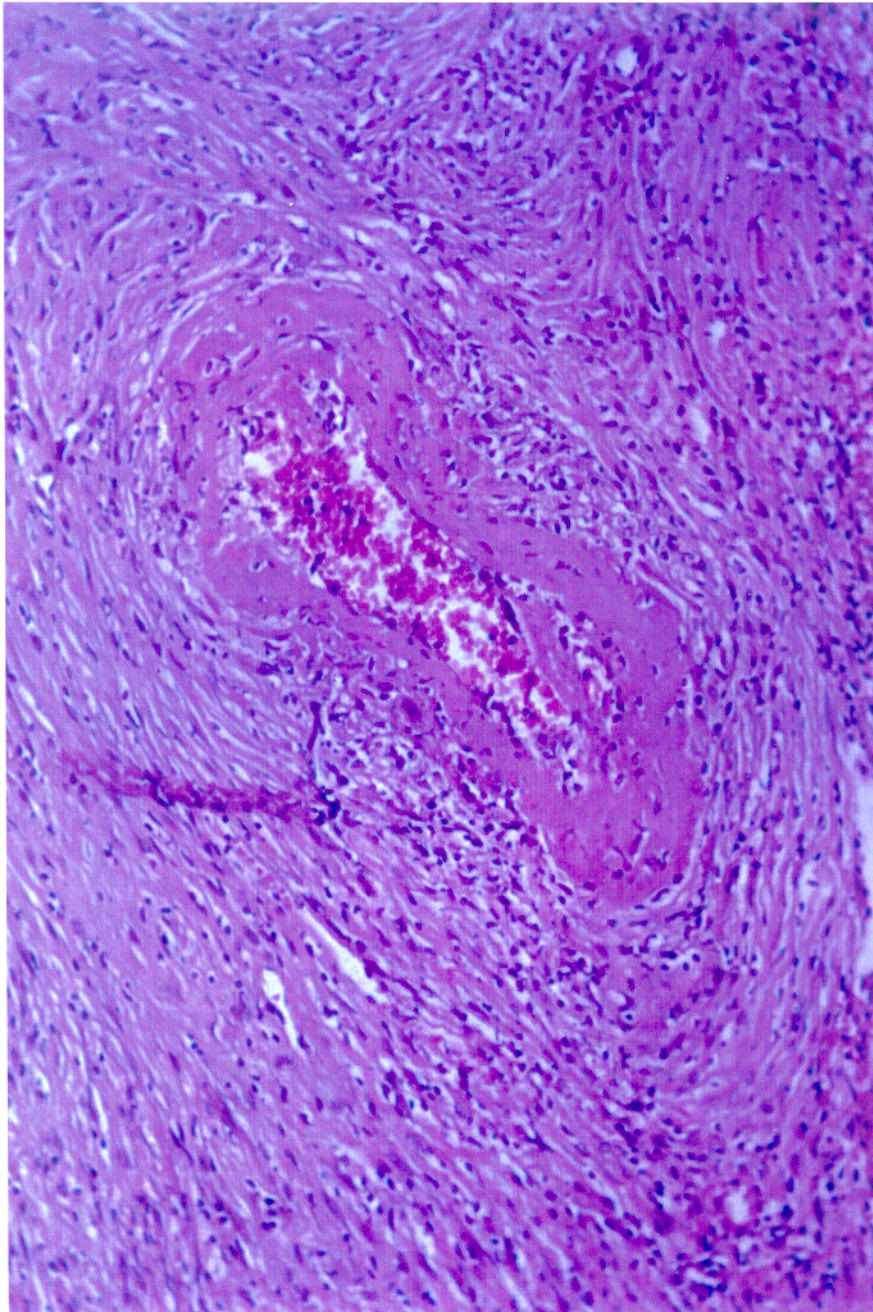


Fig. 33.- Lesión mínima vascular con desprendimiento y tumefacción citoplásmica del endotelio y edema de la subíntima. Alrededor del vaso afectado hay un fuerte edema e infiltración inflamatoria. (H-E, 400x).

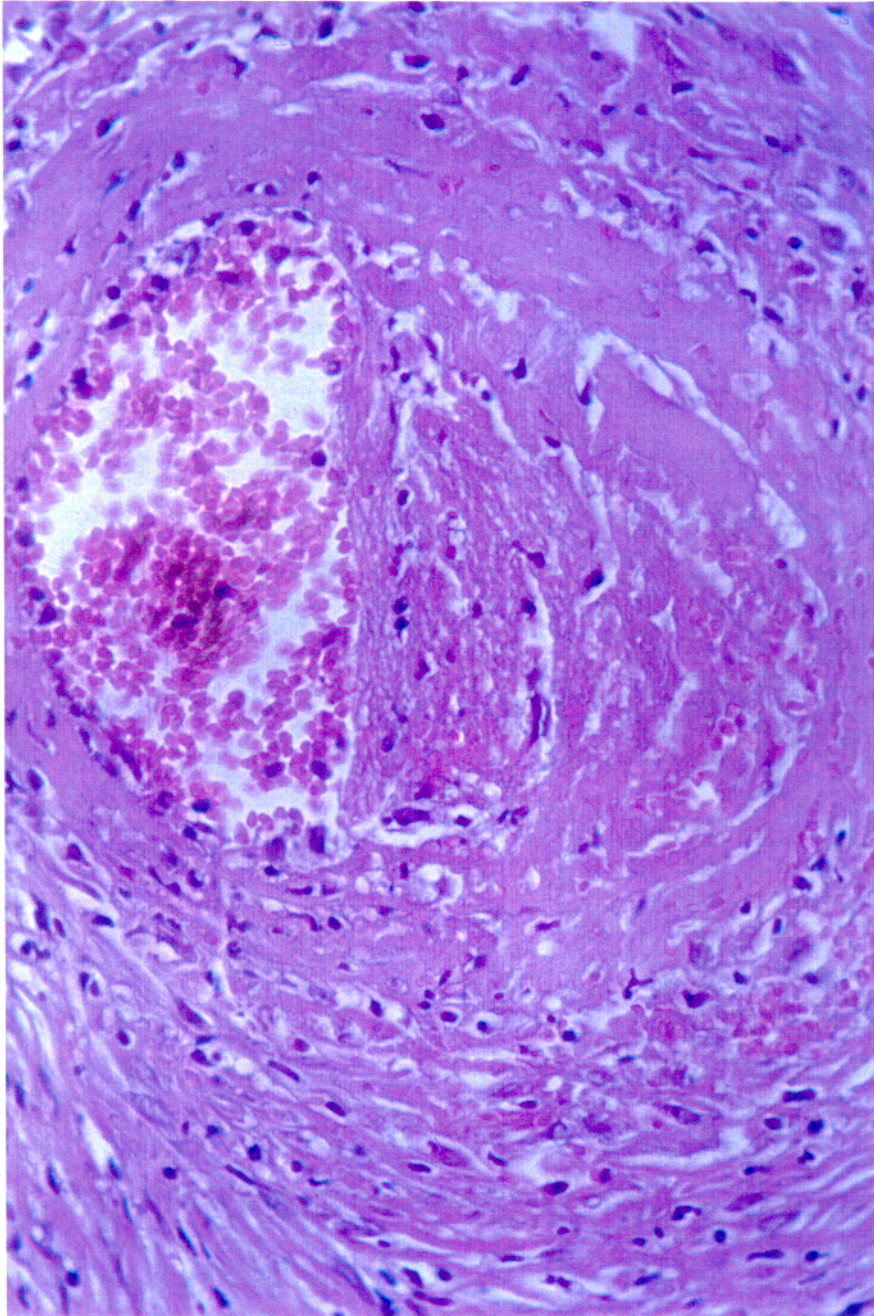


**Fig. 34.-** Vasculitis no necrotizante. El vaso del centro de la figura muestra un endotelio parcialmente perdido, en tanto que el que persiste muestra un citoplasma tumefacto. No hay trombosis pero la pared del vaso está infiltrada por linfocitos y leucocitos polinucleares.

(H-E, 400x)



**Fig. 35.-** Vasculitis necrotizante. El vaso muestra una necrosis fibrinoide de todo el espesor de la pared con persistencia en algunas zonas del endotelio. Infiltración linfocítica de la adventicia. No hay trombosis. (H-E, 200x).

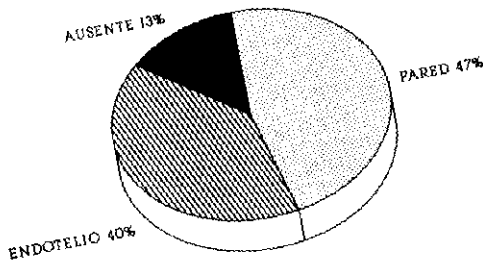


**Fig. 36.-** Vasculitis necrotizante. La pared del vaso muestra desaparición del endotelio, necrosis fibrinoide de todo su espesor y un trombo fibrinoso parietal reciente en la luz. (H-E, 200x).

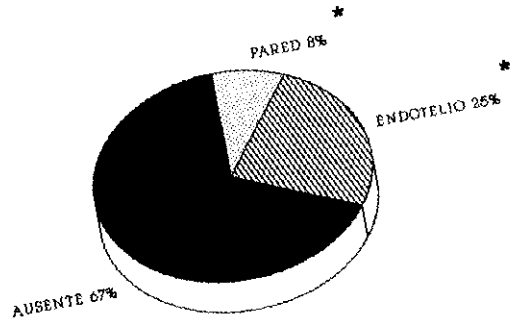
Fig. 37.- Comparación de la lesión de vasculitis endotelial y en pared entre los distintos grupos. El asterisco (\*) marca la significación estadística respecto al grupo control.

# VASCULITIS

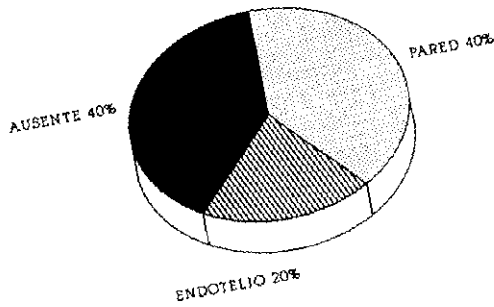
CONTROL



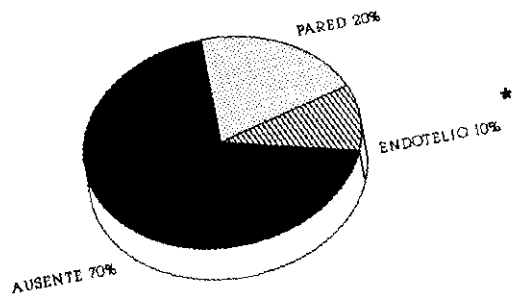
PCA-4248



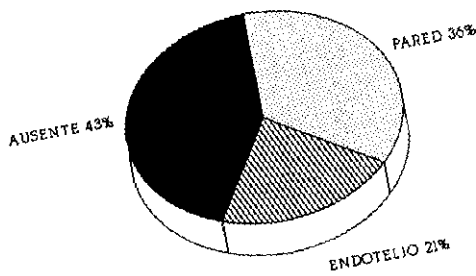
CICLOSPORINA 0,25 mg/kg



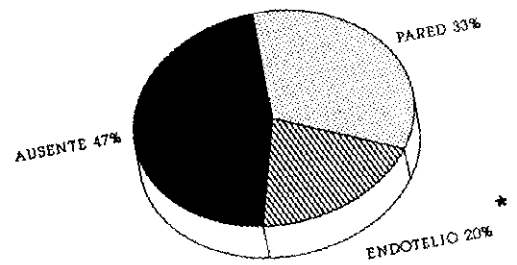
PCA+CyA 0,25 mg/kg



CICLOSPORINA 2 mg/kg



PCA+CyA 2 mg/kg



(\*)  $p < 0,05$

GRUPO	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA-4248	12	8,13	0,004	S
CyA 0,25mg/kg	10	2,33	0,126	NS
PCA+CyA 0,25mg/kg	10	8,36	0,003	S
CyA 2mg/kg	14	3,15	0,075	NS
PCA+CyA 2mg/kg	15	3,96	0,046	S

TABLA nº 22. Comparación en el grado de lesión de vasculitis moderada de los diferentes grupos, en relación al grupo control.

Grupo	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA+CyA 0,25mg/kg	10	1,81	0,177	NS

TABLA nº 23. Comparación en el grado de lesión de vasculitis moderada, de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 0,25 mg/kg, en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 0,25 mg/kg.

Grupo	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA+CyA 2mg/kg	15	0,04	0,836	NS

TABLA nº 24. Comparación en el grado de lesión de vasculitis moderada, de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 2 mg/kg, en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 2 mg/kg.

GRUPO	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA-4248	12	4,69	0,030	S
CyA 0,25mg/kg	10	0,10	0,742	NS
PCA+CyA 0,25mg/kg	10	1,85	0,173	NS
CyA 2mg/kg	14	0,35	0,549	NS
PCA+CyA 2mg/kg	15	0,55	0,456	NS

TABLA n° 25. Comparación en el grado lesión de vasculitis intensa de los diferentes grupos, en relación al grupo control.

Grupo	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA+CyA 0,25mg/kg	10	0,95	0,329	NS

TABLA n° 26. Comparación en el grado de lesión de vasculitis intensa, de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 0,25 mg/kg, en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 0,25 mg/kg.

Grupo	n	$\chi^2$	p	Sign
PCA+CyA 2mg/kg	15	0,01	0,892	NS

TABLA n° 27. Comparación en el grado de lesión de vasculitis intensa, de la asociación de PCA-4248 con ciclosporina a dosis de 2 mg/kg, en relación al grupo de ciclosporina a dosis de 2 mg/kg.

**6.6.- Infarto subendocárdico (fig. 38)**

Se trata de una lesión sobreañadida que no se ha valorado al no estar relacionada con el rechazo.

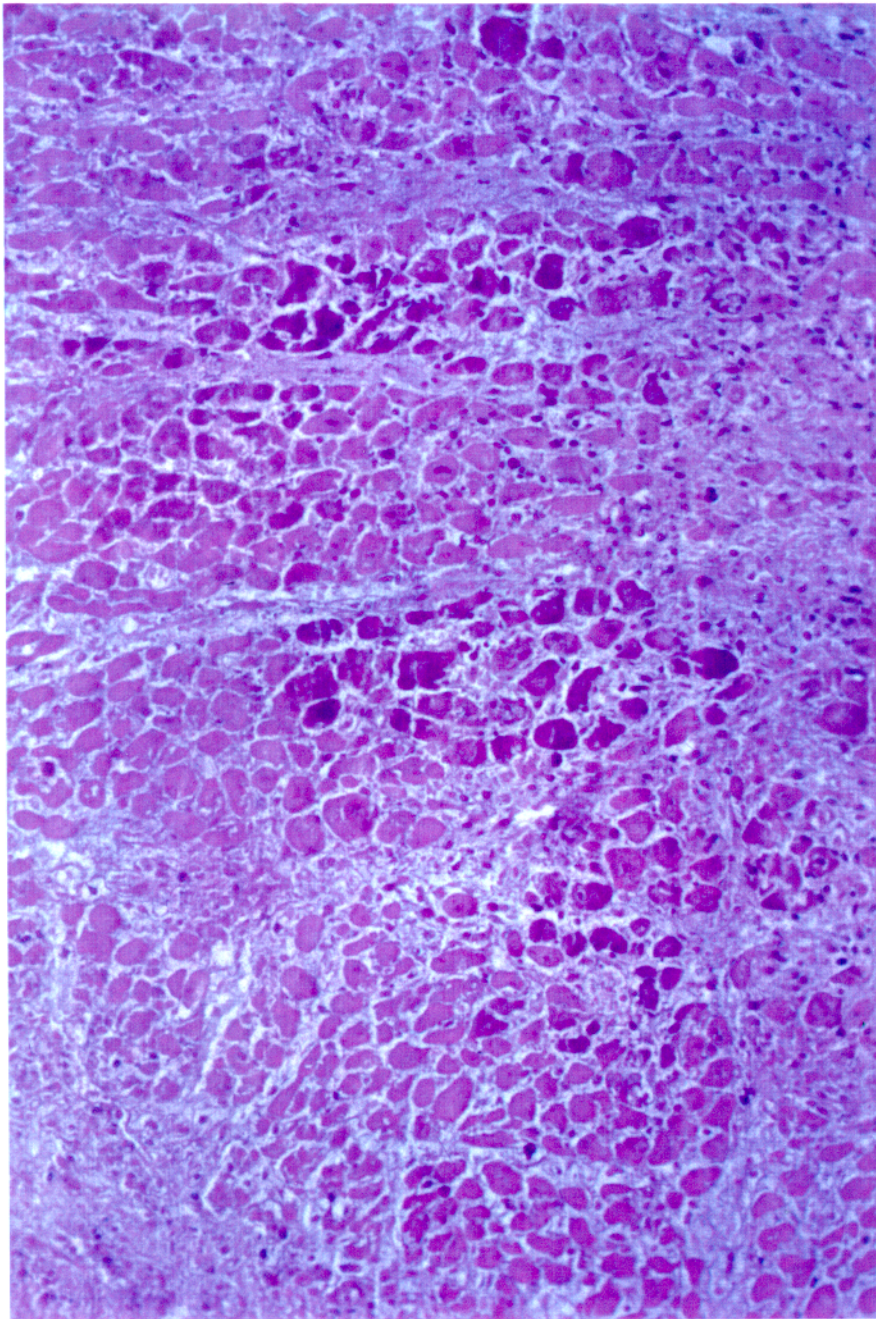


Fig. 38.- Infarto miocelular subendocárdico.  
(H-E, 100x)

## **DISCUSSION**

## 1. TECNICA QUIRURGICA

La elección del corazón como órgano a trasplantar, se fundamentó en la relativa facilidad para el seguimiento evolutivo diario, mediante el control del latido cardíaco y del registro electrocardiográfico, que además indicarían, con cierta exactitud, el momento del rechazo final. Se debe añadir que en la técnica quirúrgica, se manejan vasos con un calibre que no plantea excesivos problemas, lo que acorta el tiempo de isquemia caliente del órgano.

El modelo de trasplante cardíaco heterotópico, elegido para la realización de este estudio, está basado en la modificación que Ono y Lindsey (Ono y Lindsey, 1969) realizaron de la técnica desarrollada por Abbott (Abbott et al. 1964). Las únicas variaciones efectuadas en relación al modelo de Ono y Lindsey, se centran en la fase receptora del trasplante, aquí los vasos abdominales son disecados separadamente, colocando sobre la aorta un doble clamp aproximador de Acland, en lugar de dos clamps "bulldog", lo que nos permite una más firme sujeción del vaso, y al aproximar el doble clamp una mayor separación de las paredes

arteriales lo que facilita la anastomosis término-lateral y minimiza el riesgo de daño en la íntima arterial. La vena cava es asimismo ligada de forma totalmente independiente mediante una doble ligadura de lazo, situando primeramente la más caudal y posteriormente la proximal, lo que favorece la creación de un pequeño estancamiento sanguíneo entre las ligaduras, que facilita la venotomía sin lesionar las paredes vasculares; para realizar ésta se eligió el bisturí, en lugar de las tijeras microquirúrgicas por la limpieza del corte conseguido con la máxima conservación de la luz vascular.

Este modelo tiene varias ventajas sobre otros trasplantes cardiacos heterotópicos, el modelo desarrollado por Abbott, al utilizar una anastomosis término-terminal produce una sección en la aorta abdominal, con interrupción del riego y problemas frecuentes de paraparesia y paraplejía. El modelo de Olausson (Olausson et al. 1984), que sitúa el trasplante en el cuello del receptor, con anastomosis a la arteria carótida común y vena yugular, mediante la técnica de no sutura de "Cuff" (manguitos vasculares), produce un menor tiempo quirúrgico, si bien el problema de trombosis se presenta con mayor frecuencia y la supervivencia tiende a ser, en igualdad de condiciones, menor. En esta situación el manejo individual para la palpación estaría dificultado, al igual que la colocación de los electrodos para el registro electrocardiográfico. La técnica que sitúa el corazón trasplantado en la rodilla del receptor mediante una anastomosis a los vasos femorales (Umeki et al. 1987), tiene como principal inconveniente la diferencia de tamaño entre los vasos receptores y los del donante, lo que obliga a

utilizar técnicas de anastomosis más complejas como la tecnica de "Sleeve" o "manga de camisa", para adecuar los calibres, lo que facilita indudablemente la aparición de trombosis. El corazón se sitúa en este caso en un lugar con un espacio no muy adecuado para el volumen cardíaco, que facilita la autolesión y dificulta el registro electrocardiográfico.

Como resultado de la técnica quirúrgica hubo 12 casos (11,22% del total) que no sobrevivieron a las primeras 24 horas posteriores al trasplante.

Entre las causas de fracaso, debemos citar:

- Incorrecta anastomosis vascular, con abundante sangrado y por tanto una deficiente perfusión del órgano trasplantado.

- Aumento del tiempo quirúrgico, por complicaciones propias de la intervención, que llevaron a la deficiencia o ausencia de latido final.

- Fallo en la recuperación postoperatoria, con muerte del receptor.

- Causas desconocidas.

La posible aparición de interacciones entre las drogas a emplear en este estudio con otro tipo de medicación, hizo que no se utilizara ningún tipo de tratamiento antimicrobiano, no obstante, no se produjeron problemas de tipo infeccioso en el postoperatorio.

## **2.- EVOLUCION DE PESOS**

Después de la cirugía se produjo en todos los casos

un descenso en el peso que osciló, en la primeras 24 horas, entre el 3% y el 8% y que estuvo directamente relacionado con el acto quirúrgico. Las pérdidas de calor y de agua durante la laparotomía, la mayor o menor lentitud en la recuperación anestésica, y sobre todo las pérdidas por hemorragias intraoperatorias, fueron las causas principales que influyeron en ese descenso.

Con mayor o menor lentitud, en todos los casos se fue produciendo una paulatina recuperación del peso inicial, siguiendo un ritmo de crecimiento una vez recuperado éste, acorde con las curvas de crecimiento de la cepa. Por lo que podemos pensar que las únicas causas con influencia en el tiempo de recuperación, son las propias de la cirugía, no existiendo ninguna relación entre el tratamiento y la ganancia de peso.

### **3.- CONTROL DE VIABILIDAD**

Los criterios de viabilidad habitualmente utilizados para la valoración del trasplante cardíaco heterotópico en la rata son, la palpación directa y el registro electrocardiográfico, siendo metodos simples y poco traumáticos.

La palpación directa tiene como principal inconveniente su subjetividad y el no poder ser documentada, y como ventaja la facilidad y rapidez de realización y una fiabilidad relativa si es efectuada siempre por la misma persona. Las escasas referencias comparativas entre la palpación y la electrocardiografía (Golitsin et al. 1984), para la valoración de este tipo de trasplante, nos llevó a relacionarlas.

Si excluimos las 48 primeras horas después de la finalización de la cirugía, donde si bien el grado de palpación es intenso, la actividad eléctrica se encuentra alterada como consecuencia de la isquemia y la manipulación quirúrgica; se obtiene en general una correspondencia entre los diferentes grados de palpación y los registros efectuados durante la presentación de dichos grados.

Los registros electrocardiográficos fueron realizados de forma tal que solo se obtuviera el registro del corazón trasplantado, para evitar interferencias con el del receptor y conseguir una mejor visualización de las arritmias durante la fase de rechazo.

No se debe descartar que algunas de las alteraciones electrocardiográficas obtenidas (sobre todo en lo que a frecuencia cardíaca se refiere) estén influenciadas por la anestesia a la que inevitablemente se tuvo que someter a los animales. El pentobarbital puede favorecer la aparición de complejos ventriculares prematuros y de ritmos bigéminos, pero la práctica ausencia de CVPs en los corazones que se hallaban en grado 3 de palpación y la persistencia de bigeminismo cuando aparecía, en los días posteriores, nos induce a pensar en una escasa incidencia de la anestesia a la hora de valorar el registro.

No se obtuvieron diferencias electrocardiográficas entre los diferentes grupos y las alteraciones que se produjeron estuvieron exclusivamente relacionadas con la evolución del trasplante (Abbott et al. 1965, Lee et al. 1982) y no con el tratamiento aplicado.

El enlentecimiento del ritmo fue la característica común

más sobresaliente indicativa de rechazo, a esto debemos sumar los defectos de conducción ventricular y los cambios en el voltaje de los complejos QRS.

Desnivelaciones en el segmento ST, también fueron frecuentes, aunque no constantes, en los corazones en fase final de grado 2, y en grado 1 de palpación, pudiendo ser un reflejo de isquemia miocárdica por inadecuada perfusión del órgano y considerado por tanto como un indicativo de rechazo.

#### **4.- VALORACION DE LA DOSIS DE CICLOSPORINA**

Se valoraron 4 niveles de dosis de ciclosporina, administrada por vía subcutánea durante 14 días, comenzando inmediatamente después del cierre de la laparotomía (Tchervenkov et al.1989). Esta pauta produce con dosis terapéuticas ( $\geq 15$  mg/kg) una aceptación permanente del trasplante en la rata, posiblemente relacionada con la presencia dentro del trasplante de linfocitos T supresores que actúan previniendo el rechazo despues de cesar el tratamiento con ciclosporina (Araujo et al. 1985).

Con la dosis de 0,5 mg/kg se obtuvo una supervivencia superior a la esperada, próxima a la dosis de 2 mg/kg y muy por encima de la de 0,25 mg/kg, la cual ya presentaba unos niveles de supervivencia significativos respecto del control, por lo que se eligió como dosis subterapéutica inferior, en lugar de la de 0,5 mg/kg.

La dosis de 2 mg/kg, una de las dosis subterapéuticas más utilizadas, se eligió como dosis subterapéutica superior;

ésta mostró también unos niveles medios de supervivencia algo mayores de lo esperado, no obstante los valores de esta dosis están en concordancia con los trabajos de Da Costa y Tyerman (Da Costa et al. 1990), que fijan el límite superior de dosis subterapéutica para la ciclosporina en 1,5 a 2 mg/kg durante 14 días, para evitar la deriva hacia una larga supervivencia.

## **5.- SUPERVIVENCIA**

Si bien algunos antagonistas de PAF se han mostrado efectivos en la prolongación por si solos, del tiempo de supervivencia de alotrasplantes renales (Freiche et al. 1990), no han manifestado un aumento en el tiempo de supervivencia de alotrasplantes cardíacos, salvo en los casos de rechazo hiperagudo por receptores sensibilizados (Makowka et al. 1990) y en xenotrasplante (O'Hair et al. 1992), donde sí se ha observado una supervivencia mayor, debiendo tener presente que los mecanismos en ello implicados están directamente relacionados con la presencia de anticuerpos-antidonante circulantes y estrechamente ligados con el endotelio capilar (Busch et al. 1975, Forbes et al. 1975); en estos dos modelos de rechazo el tiempo es medido en minutos.

El PCA-4248, no mostró variación en el tiempo de supervivencia en relación con el grupo control.

La demostración de un aumento considerable en la producción de PAF por el tejido renal en fase de rechazo (Mangino et al. 1991), el cual puede provenir de los

eicosanoides producidos igualmente en gran cantidad (Mangino et al. 1986), podría explicar el retraso en el tiempo de rechazo final, en los modelos renales. Aún no están comprobados aumentos similares en la producción de PAF en tejido cardíaco en fase de rechazo, y si bien es clara la producción por células inmunocompetentes activadas y por el endotelio vascular, la implicación de otros mecanismos, entre ellos la activación de numerosos mediadores inflamatorios, podría enmascarar la respuesta que sobre la supervivencia pudiese presentar el bloqueo del PAF.

En la asociación de antagonistas de PAF con ciclosporina, los trabajos con el BN 52021 (Foegh et al. 1986), muestran que el tiempo de supervivencia con la dosis de ciclosporina de 0,5 mg/kg aumentó de 10 a 14 días cuando se combinó con el antagonista.

Otro antagonista de PAF, el WEB 2170, no presentó ninguna modificación en el tiempo de supervivencia cuando se asoció con ciclosporina a dosis inferiores a 2 mg/kg, pero sí hubo un aumento significativo con esta dosis, pasando de 16 a 81 días de supervivencia media (Da Costa et al. 1990). En este trabajo se muestra un claro sinergismo entre una dosis subterapéutica mínima de ciclosporina con el antagonista del PAF, que por sí solo tampoco produce modificaciones en el tiempo de supervivencia medio en relación con el control

El PCA-4248 asociado a la dosis de 0,25 mg/kg de ciclosporina, no presentó ninguna variación en la supervivencia. Con la dosis de 2 mg/kg, se obtuvieron tiempos medios de supervivencia, que si bien no fueron estadísticamente significativos ( $p=0,07$ ), superaron en más de 10 días al

grupo tratado con ciclosporina sola a 2 mg/kg y en 6 días al de 10 mg/kg. Por lo tanto los resultados de supervivencia parecen estar en la línea de los otros antagonistas de PAF, por encima del BN 52021 y por debajo del WEB 2170; pero en nuestro caso sigue persistiendo una intensa variabilidad dentro del grupo.

Estos datos ponen de manifiesto que el bloqueo del PAF durante el rechazo del alotrasplante en la rata, por si solo no produce un aumento del tiempo de supervivencia, aumentándolo de forma variable cuando se asocia con dosis subterapéuticas de ciclosporina, estando en nuestro modelo estrechamente ligado a la manifestación inmunosupresora de la ciclosporina, desplazando la supervivencia a límites superiores únicamente en los casos donde la respuesta a la ciclosporina fue mayor; no bloqueando en ningún caso de forma definitiva el proceso de rechazo.

## **6.- HISTOPATOLOGIA**

Para la valoración histopatológica, se pensó en un principio utilizar la clasificación de Hannover (Kemnitz et al. 1987), basada a su vez en una modificación de la clasificación de Billingham (Billingham et al. 1982), pero había que tener en cuenta que al tratarse de rechazos en fase terminal y por tanto con lesiones histopatológicas avanzadas en todos los casos, la clasificación de Hannover nos daría siempre un grado intenso (A-4), no produciendo una idea clara de las posibles variaciones lesionales, por ello se decidió hacer una valoración por separado de las

más destacadas lesiones directamente implicadas en el rechazo.

No se encontraron referencias bibliográficas sobre estudios histopatológicos realizados sobre la actuación de antagonistas de PAF en el rechazo de alotrasplantes cardíacos.

#### **6.1.- Intensidad inflamatoria total.**

En todos los grupos se encontraron dos tipos de cambios histopatológicos que no estaban claramente relacionados con la reacción de rechazo. El primero de ellos influía directamente en la intensidad del infiltrado inflamatorio total; es el infiltrado que en unión con áreas de fibrosis, se encuentra de forma más intensa en la superficie subepicárdica, y que debe considerarse como una consecuencia del proceso quirúrgico (Cramer et al.1989). Por lo tanto fueron zonas a no valorar en la intensidad del infiltrado inflamatorio total y tampoco se tuvieron en cuenta en la valoración respecto del resto de las lesiones.

La relación del infiltrado inflamatorio total con el tratamiento con ciclosporina, no está claro, los trabajos de Cox, sobre el estudio de la infiltración linfocitaria en alotrasplantes cardíacos en rata tratadas con ciclosporina (Cox et al. 1984) demuestran que a la dosis de 15 mg/kg no se previene la infiltración del órgano por células mononucleares, si bien a partir del 5º día comenzó a disminuir respecto del grupo control.

Según los trabajos de Cramer y Mihatsch (Cramer et al. 1990) debemos tener en consideración, que la efectividad inmunosupresora de la ciclosporina -y presumiblemente de

otras drogas como el FK506 que actúan por una vía similar- no tiene relación estrecha con la intensidad del infiltrado inflamatorio.

Nuestros resultados han presentado una disminución en el infiltrado inflamatorio total en los dos grupos tratados con la dosis de ciclosporina de 0,25 mg/kg, pero con porcentajes importantes de intensidad media inflamatoria. En este caso el rechazo se produjo mientras el tratamiento con ciclosporina persistía.

No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con el PCA-4248, si bien hubo un menor porcentaje de infiltrado intenso en el grupo tratado con el antagonista de PAF, muy próximo a la significación estadística ( $p=0,06$ ).

Los dos grupos tratados con la dosis de ciclosporina de 2 mg/kg tuvieron los infiltrados más intensos; se debe hacer notar que en estos dos últimos grupos la ciclosporina se había suspendido el día 14, en tanto que el rechazo se produjo entre 12 y 23 días después, encontrando además los porcentajes de infiltrado más intenso en el grupo que presentó una mayor supervivencia.

El antagonismo del PAF no parece tener efecto destacado, o de existir ser muy ligero, sobre el infiltrado total de células inflamatorias y éste podría explicarse por una disminución de la adhesión leucocitaria al endotelio vascular, la cual está favorecida por la acción del PAF (Braquet et al. 1989c).

## 6.2.- Blastos.

La activación linfocitaria por antígenos, da lugar a modificaciones intracelulares y al desarrollo de un linfoblasto; con la activación aumenta la expresión de diversas moléculas de su membrana, lo que permite que se produzca una interacción más eficaz de las células activadas con otras células. El receptor de la interleucina-2, se expresa tras la activación, no debiendo olvidar la importancia de éste en la respuesta alogénica.

La disminución en el porcentaje de blastos, nos indica por tanto un menor número de células inmunológicamente activas y una mayor tolerancia al alotrasplante.

De los resultados se deduce en primer lugar que la dosis de ciclosporina a la que comienza a hacerse significativa la reducción en el número de blastos es de 2 mg/kg. Dosis a la cual ya se puede deducir que se produce un bloqueo, al menos parcial, a nivel de la IL-2 (Pereira et al. 1987).

El PCA-4248, produce un descenso en el porcentaje de células activadas, de un nivel algo inferior al de la ciclosporina a dosis de 2 mg/kg.

No está claro aún el porqué algunos antagonistas del PAF modulan la respuesta inmune pero sí se sabe que el PAF puede estar implicado en esta respuesta.

El PAF aumenta la proliferación de linfoblastos humanos estimulados por la interleucina 2 mientras que algunos antagonistas (CV-3988 y L-652731) la inhiben (Barret et al. 1986, Ward et al. 1987).

El PAF puede estimular la producción de otros mediadores

capaces de regular la función de los linfocitos como proteínas catiónicas, leucotrienos, prostaglandinas y neuropéptidos (Mencia-Huerta et al. 1989).

El antagonista del PAF RP 48740, modula la respuesta inmunológica a nivel de linfocitos, no sabiendo si su efecto es debido a una acción directa sobre el sistema inmunitario o a sus efectos sobre el PAF. (Freiche et al. 1990).

El PCA-4248 podría tener un efecto modulador sobre la respuesta inmunológica, produciendo una disminución del porcentaje de células inmunológicamente activas frente a aloantígenos, que en parte también podría estar influenciado por una cierta actividad anti-TNF del producto (Fernandez-Gallardo et al. 1990). Se ha demostrado que el TNF, induce la liberación de IL-1 por los macrófagos que produce la activación de células Th (T Helper) que sintetizan IL-2 y originan la proliferación de células T. La IL-2 a su vez estimula la síntesis de TNF (Imagawa et al. 1990).

La asociación del PCA-4248 con la dosis inferior de ciclosporina, hace que se produzca un bloqueo de este efecto de explicación desconocida, dado que se mantiene con la dosis superior, posiblemente debido a la actuación exclusiva de la ciclosporina.

### **6.3.- Edema.**

El PAF es un potente mediador de las reacciones inflamatorias y actúa intensamente sobre la permeabilidad vascular aumentándola a las macromoléculas del plasma, con exudación de plasma rico en proteínas (Braquet et al. 1989a).

Se ha demostrado que el PCA-4248 administrado a la dosis de 0,2 a 5 mg/kg inhibe la extravasación de plasma rico en proteínas producida por 1  $\mu$ g/kg IV de PAF. El PCA-4248 mejora significativamente la intensidad del edema producido durante el rechazo, tanto de forma aislada como asociado a la dosis baja de ciclosporina, en donde encontramos que el edema estuvo ausente o fue ligero en un 80% de los casos.

Con la ciclosporina a 2 mg/kg. se produce un aumento del edema que hace que tanto este grupo como el asociado al antagonista del PAF no mejoren respecto del control, pudiendo estar en ello implicado el efecto adverso de la ciclosporina sobre el endotelio y sobre la resistencia vascular (Kahan, 1989), aunque no existe evidencia de que dichos efectos se produzcan a dosis menores de 5 mg/kg (Chan et al. 1992).

#### **6.4.- Necrosis miocelular.**

Analizando los resultados obtenidos en la valoración de la necrosis miocárdica y del infiltrado inflamatorio total, observamos que están estrechamente relacionados, con la única diferencia de una disminución, aquí ya significativa, en el grupo tratado con el antagonista del PAF.

La disminución del número de blastos, que se produce con el PCA-4248, implicaría un menor número de células T citotóxicas, implicadas directamente en la destrucción del trasplante.

Dentro del infiltrado inflamatorio total tenemos un porcentaje de neutrófilos y monocitos, que aparecen con mayor

intensidad en las últimas fases del rechazo, y que están directamente implicados en la producción de radicales libres.

El PAF a bajas concentraciones induce la producción de radicales libres de polimorfonucleares activados (Vercellotti et al. 1988). Los radicales libres están intensamente relacionados con el daño celular y la necrosis de los miocitos (Fraser et al. 1988, Wilson et al. 1991).

Por tanto el bloqueo del PAF, por el PCA-4248, puede influir de una forma indirecta (menor número de células T citotóxicas y menor producción de radicales libres) sobre la lesión miocelular.

#### **6.5.- Vasculitis.**

La lesión de vasculitis es la más claramente influenciada por el PAF.

La producción de PAF por células endoteliales ocurre bajo el estímulo de varios agonistas, incluyendo trombina, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, proteasas, interleucina 1 (IL-1) y TNF (Braquet et al. 1989c); sustancias todas ellas que ya hemos visto participan en la cascada de eventos que intervienen en el rechazo de órganos.

El daño en la célula endotelial, aparece como una característica temprana en los rechazos agudos (Imagawa et al. 1990), ocasionando como lesión inicial la formación de vesículas, con un posterior acúmulo de plaquetas sobre la superficie dañada y un posterior infiltrado de leucocitos (Braquet et al. 1989c).

Debemos tener en cuenta que si bien las plaquetas de

la rata están desprovistas de receptores de PAF (Sánchez-Crespo et al. 1982) y no pueden por tanto ser activadas por PAF, el daño endotelial producido por éste, si favorece intensamente la agregación plaquetaria.

Como vemos la adhesión de leucocitos al endotelio alogénico está también favorecida por la acción del PAF, siendo este un paso esencial para la migración de linfocitos desde la sangre hacia el órgano trasplantado, etapa fundamental en el proceso de rechazo.

En los resultados presentados el antagonismo del PAF por el PCA-4248 mejora la lesión vascular de forma significativa, tanto si evaluamos la lesión que afecta exclusivamente al endotelio como la más intensa en la que ya se encuentra afectación en pared además de la lesión endotelial.

La asociación con ambas dosis de ciclosporina, también mejora la vasculitis moderada respecto del control, no así en la lesión más grave, donde no se aprecian cambios significativos respecto del control.

#### **6.6.- Infarto.**

El infarto de extensión fundamentalmente subendocárdica, es la segunda lesión no relacionada directamente con el rechazo del alotrasplante, debiendo considerarla por tanto como una lesión sobreañadida, consecuencia directa de las cifras tensionales bajas que se producen como consecuencia en la caída de la perfusión del órgano en las últimas horas antes de la extracción.

Esta lesión fue muy variable dentro de un mismo grupo,

y dependió del tiempo transcurrido desde el inicio del grado 1 de palpación hasta la extracción del corazón.

## **7.- EVALUACION CONJUNTA**

Los numerosos factores involucrados en el rechazo de un trasplante, hacen del mismo un proceso especialmente complejo, en el que es difícil evaluar la utilidad de las diversas terapéuticas, si no es a través exclusivamente de su prolongación del tiempo de rechazo, pero sobre ello pesa la aparición de efectos secundarios indeseables (directamente atribuidos a la medicación o consecuencia de vías de rechazo no bloqueadas) que van a producir en un tiempo más o menos largo el deterioro del órgano trasplantado.

La valoración conjunta de estos resultados, pone de manifiesto que el bloqueo del PAF por el PCA-4248, en un alotrasplante cardíaco heterotópico en rata, produce una mejoría significativa en el cuadro histopatológico final, salvo en la intensidad inflamatoria total, pero con una gran variabilidad dentro del grupo en todas las lesiones, excepción hecha de la vasculitis, donde de los 12 casos estudiados, solamente uno presentó lesión vascular intensa, esto tiene como hemos visto importantes repercusiones sobre el resto de las lesiones, si bien no es capaz de modificar el proceso de rechazo final, no produciendo modificación en el tiempo de supervivencia respecto del grupo control.

Efectivamente el tiempo de supervivencia queda inalterado a pesar de la disminución en el número de blastos que habla de una cierta capacidad inmuno-supresora, alejada no obstante

de la producida por la dosis de ciclosporina de 10 mg/kg, aún considerada como subterapéutica, en la que el porcentaje de blastos no sobrepasa el 13% .

Ambas dosis de ciclosporina han presentado como característica común una extrema variabilidad en la respuesta, tanto en la supervivencia como en el cuadro lesional final, lo que era de esperar al tratarse de dosis subterapéuticas (Imagawa et al. 1991).

La asociación del PCA-4248 con la ciclosporina tampoco tiene ningún efecto definitivo final, ni en supervivencia ni sobre el cuadro histopatológico. En relación a la supervivencia, con la dosis de 2 mg/kg, sí podría valorarse un ligero aumento en la aparición del rechazo final.

En este grupo podemos destacar una característica, mientras que en todos los grupos el comienzo del rechazo valorado por palpación y electrocardiografía se produce por término medio entre los 5 y 8 días, salvo para el grupo de ciclosporina a dosis de 10 mg/kg que se produce a los 24 días, para la asociación de ciclosporina a 2 mg/kg con el antagonista del PAF, este comienzo de rechazo aparece a los 21 días, por lo tanto este grupo permanece estable, sin signos de rechazo, por término medio, 14 días más que el grupo tratado solo con ciclosporina. En la mayor estabilidad vascular y por tanto en un mejor aporte sanguíneo, asociado al efecto inmunosupresor de la ciclosporina, podría estar el origen del retraso en la aparición de los signos de rechazo. Cuando se retira la ciclosporina y se deja exclusivamente el antagonista del PAF, los signos de rechazo aparecen a los 6 días.

Por lo demás no existen diferencias significativas entre los grupos tratados con ciclosporina sola y los asociados al antagonista del PAF, persistiendo la variabilidad propia de una actuación subterapéutica, y en todo caso puede aparecer un peor cuadro lesional final, que pudiera estar asociado más a una evolución dentro del tiempo del trasplante, que a una interacción de la ciclosporina con el antagonista del PAF.

La utilización del antagonista de PAF, PCA-4248 en la prevención del rechazo agudo de un alotrasplante cardíaco no muestra ventajas, dado que los cambios apreciables en la lesión histopatológica final no fueron de suficiente magnitud como para modificar la supervivencia, quedando pendientes estudios sobre la actuación en la lesión vascular en modelos específicos de vasculitis.

El desarrollo de una patología vascular dentro del corazón trasplantado, en pacientes que han recibido un alotrasplante cardíaco y que sobreviven a los primeros años del postoperatorio, es la más frecuente (una incidencia del 40% a los 2 años) e importante complicación observada. De confirmarse la actividad del PCA-4248 sobre la lesión vascular, quedaría pendiente de estudio la actuación de este compuesto dentro de un régimen terapéutico inmunosupresor normal, en la prevención del desarrollo de lesiones vasculares.

Como se puede comprobar, el proceso de rechazo de un trasplante alogénico, genera una importante "cascada" de acontecimientos, en la que participan numerosos tipos de células blancas, plaquetas, anticuerpos y complemento, y

gran cantidad de mediadores inflamatorios.

Este complejo proceso, es un producto lógico, ya que citando al Dr. Häyry (Häyry, 1984), "No se puede concebir que la naturaleza dejase un fenómeno como es un rechazo alogénico - un probable guardián de la integridad individual y posible *primus motor* en la generación de las especies- dependiendo solo de una vía efectora".

## **CONCLUSIONES**

- 1ª.- Existe una correlación directa entre el grado de palpación y los registros electrocardiográficos obtenidos.
- 2ª.- El grupo de animales tratados con el PCA-4248 presenta una reducción significativa en el infiltrado de blastos en relación con el grupo control.
- 3ª.- El grupo de animales tratados con el PCA-4248 presenta una disminución en la intensidad del edema y la necrosis miocelular en relación con el grupo control.
- 4ª.- No existen diferencias significativas entre los grupos tratados con ciclosporina a las dos dosis de estudio y los tratados con las asociaciones de estas dosis con el PCA-4248.
- 5ª.- Todos los grupos tratados con el PCA-4248, solo o asociado con ciclosporina presentaron niveles de vasculitis significativamente menores que el resto de los grupos en relación con el grupo control.

6ª.- No existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la supervivencia del trasplante entre el grupo control y el tratado con el PCA-4248.

7ª.- Todos los animales tratados con ciclosporina sola o asociada al PCA-4248, mostraron un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la supervivencia del trasplante en relación con el grupo control.

## **RESUMEN**

## **RESUMEN**

Se han estudiado los efectos producidos en el rechazo de un alotrasplante cardíaco en rata Lewis por un nuevo antagonista del factor de activación plaquetaria, el PCA-4248, solo o en asociación con dosis subterapéuticas de ciclosporina.

La viabilidad del trasplante se valoró mediante palpación y registros electrocardiográficos, que presentaron una relación directa.

Los resultados obtenidos mostraron una mejoría del cuadro histopatológico final en los animales tratados con el PCA-4248, pero que no fue suficiente como para presentar efectos sobre la supervivencia del trasplante.

No se encontraron diferencias entre los grupos tratados con ciclosporina y la asociación de ésta con el PCA-4248.

## **SUMMARY**

The effects caused in the cardiac allograft rejection were studied on a Lewis strain rat by a new antagonist of platelet-activating factor, PCA-4248, alone or in association with a subtherapeutical dosis of cyclosporine.

The availability of trasplant was valorated by electrocardiographical registration and palpations, which present a direct relation.

The results showed an improvement in the final histopathological chart in the treated animals with PCA-4248, but being insufficient to present the effects on the allograft survival.

We have not found any differences between the groups treated with cyclosporine and these associated with PCA-4248.

## **9.- BIBLIOGRAFIA**

Abbott C.P., Lindsey E.S., Creech O. & DeWitt C.W.: A technique for heart transplantation in the rat. Arch. Surg. 89:645-652 (1964).

Abbott C.P., DeWitt C.W. & Creech O.: The transplanted rat heart: Histologic and electrocardiographic changes. Transplantation 3:432 (1965).

Aggarwal B.B. Tumor necrosis factors, TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$ : their structure and pleiotropic biological effects. Drugs Future 12: 891-898. (1987).

Araujo J.L., Kupiec-Weglinski J.W., Araneda D., Towpik E. Heidecke C.D., Williams J.M. & Tilney N.L.: Phenotype, activation status, and suppressor activity of host lymphocytes during acute rejection and after cyclosporine-induced unresponsiveness of rat cardiac allografts. Transplantation 40:278-284 (1985).

Armitage J.M., Kormos R.L., Griffith B.P., Hardesty R.L., Fricker F.J., Stuart R.S., Marrone G.C., Todo S., Fung J. & Starlz T.E.: A clinical trial of FK-506 as primary and rescue immunosuppression in cardiac transplantation. Transplant proc. 23:1149-1152 (1991).

Bach J-F. & Chatenoud L.: Immunologic monitoring of Orthoclone OKT3-treated patients: the problem of antimonoclonal immune response. Transplant Proc 19 (suppl 1):17-20 (1987).

Baranes J., Hellegouarch A., Le Hegarat M., Viossat I., Auget M., Chabrier P.E., Closter F. & Braquet P.: The effects of PAF-acether on the cardiovascular system and their inhibition by a new highly specific PAF-acether receptor antagonist BN 52021. Pharmacol. Res. Commun. 18:717 (1986).

Barner R., Hadvary P., Burri K., Hirth G. Cassal J.M. & Muller K.: Eur. Patent 147768, 12.18.84. (1984).

Barret M.L., Lewis G.P., Ward S. Westwick J.: Platelet-activating factor modulates interleukin-2 induced proliferation of human T-lymphoblasts. Br. J. Pharmacol. 89:505P. (1986)

Beasley R.C., Roche W., Roberts J.A. & Holgate S.T. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. Am. Rev. Respir. Dis. (1989)-IN PRESS

Benveniste J., Henson P.M. & Cochrane C.G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of Ige., basophils and a platelet-activating factor. J. Exp. Med. 136: 1356-1377 (1972).

Benveniste J., Tencé M., Varenne P., Bidault J., Bouillet C. & Polonsky J. Sceances Acad. Sci. Series D. 289:1037 (1979).

Bertault-Peres P., Bonfils C., Fabre G., Just S., Cano J.P. & Maurel P.: Metabolism of cyclosporine A. II. Implication of the macrolide antibiotic inducible cytochrome P-450 3c from rabbit liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 15:391-398 (1987).

Billingham M.E.: Diagnosis of cardiac rejection by endomyocardial biopsy. *J. Heart Transplant.* 1:25-30 (1982).

Blank M.L., Cress E.A., Lee T.C., Malone B., Surles J.R., Piantadosi C., Hajou J. & Snyder F. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 38:3 (1982).

Bonavida B., Mencia-Huerta J.M. & Braquet P. Effect of platelet-activating factor (PAF) on monocyte activation and production of tumour necrosis factor (TNF). *J. Allergy Appl. Immunol.* 88:157-160 (1989).

Borel J.F., Feurer C., Gubler H.V. & Stahelin H.: Biologic effect of cyclosporin A: a new anti-lymphocytic agent. *Agents Action* 6:468 (1976).

Bourgain R.H., Maes L. Braquet P., Andries R., Touqui L. & Braquet M.: The effect of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAF-acether) on the arterial wall. *Prostaglandins* 30:185-197 (1985).

Braquet P., Spinnewyn B., Braquet M., Bourgain R.H., Taylor J.E., Etienne A. & Drieu K.: BN 52021 and related compounds: a new series of highly specific PAF-acether receptor antagonist isolated from Ginkgo biloba. *Blood Vessel* 16:559 (1985a).

Braquet P., Etienne A., Touvay C., Bourgain R.H., Lefort J. & Vargaftig B.B.: Involvement of platelet activating factor in respiratory anaphylaxis, demonstrated by PAF-acether inhibitor BN 52021. *Lancet* I:1501 (1985b).

Braquet P., Touqui L., Shen T.S. & Vargaftig B.B. Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacol. Rev.* 39:97-145 (1987a).

Braquet P. & Rola-Pleszczynski M.: Platelet-Activating factor and cellular immune responses. *Immunol. Today* 8:345-352 (1987b).

Braquet P., Paubert-Braquet M., Bourgain R.H., Bussolino F. & Hosford D. PAF/cytokine auto-generated feedback networks in microvascular immune injury: consequences in shock, ischemia and graft rejection. *J. Lipid Mediat.* 1:75-112 (1989a).

Braquet P., Paubert-Braquet M., Koltai M., Bourgain R., Bussolino F. & Hosford D. Is there a case for PAF antagonists in the treatment of ischemic states? *Trends Pharmacol. Sci.* 10:23-30 (1989b).

Braquet P., Bourgain R. & Mencia-Huerta J.M.: Effect of platelet-activating factor on platelets and vascular endothelium. *Seminars thromb. hem.* 15:184-196 (1989c).

Braquet P., Laurent J.P., Rolland A., Martin C. Pommier J. et al.: From ginkgolides to N-substituted piperidino-thienodiazepines, a new series of highly potent dual antagonists. In Samuelson B. et al. (Eds) *Advances in prostaglandin, thromboxane and leukotriene research.* 21:929-937. Raven Press. New York (1990).

Bunjes D., Hardt C., Rollinghoff M. & Wagner H.: Cyclosporin-A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and interleukin 2. *Eur. J. Immunol.* 11:657 (1981).

Burrows L., Haimov M. & Alderdort L.: The platelet in the obliterative vascular rejection phenomenon. *Transplant. Proc.* 5:157 (1973).

Busch G.J., Martins A.C.P., Hollenberg N.K., Wilson R.E. & Colman R.W.: A primate model of hiperacute renal allograft rejection. *Am. J. Pathol.* 79:31 (1975).

Bussolino F., Breviario F., Tetta C., Aglietta M. et al. Interleukin 1 stimulates platelet-activating factor production in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 77:2027-2033 (1986).

Bussolino F., Camussi G., Aglietta M., Braquet P., Bosia A., Pescarmona G., Sanavio F., d'Urso N. & Marchisio P.C. Human endothelial cells are a target for platelet-activating factor. *J. Immunol.* 139:2439-2446 (1987).

Calne R.Y. & White D.J.G.: Cyclosporin A: a powerful immunosuppressant in dogs with renal allografts. *IRCS J. Med. Sci.* 5:595 (1977).

Calne R.Y., Rolles K. & White D.J.G.: Cyclosporin A initially as the sole immunosuppressant in 32 kidneys, 2 pancreases and 2 livers. *Lancet* 2:1033 (1979).

Camussi G., Pawlowski I., Bussolino F., Caldwell P., Brentjens J. & Dejana E. Release of platelet-activating factor in rabbits with antibody mediated injury of the lung. The role of polymorphonuclear neutrophils and pulmonary endothelial cells. *J. Immunol.* 131:1802-1807 (1983a).

Camussi G., Aglietta M., Malavasi F., Tetta C., Piacibello F., Sanavio F. & Bussolino F. The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture. *J. Immunol.* 131:2397-2403 (1983b).

Camussi G., Bussolino F., Salvidio G. & Baglioni C. Tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor. *J.*

Exp. Med. 166:1390-1404 (1987a).

Camussi G., Nielson N., Tetta C., Saunders R.N. & Milgrom F.: Release of platelet-activating factor from rabbit heart perfused in vitro by sera with transplantation alloantibodies. Transplantation 44:113 (1987b).

Camussi G., Tetta C., Bussolino F. & Baglioni C. Tumor necrosis factor stimulates human neutrophils to release leukotriene B<sub>4</sub> and platelet-activating factor: induction of phospholipase A<sub>2</sub> and acetyl-CoA: 1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine O<sub>2</sub>-acetyltransferase. Eur. J. Biochem. 182:661-666 (1989).

Cantrel D.A. & Smith K.A. Transient expression of interleukin 2 receptors: consequences for T cell growth. J. Exp. Med. 158:1895-1911 (1983).

Casals-Stenzel J.: Effects of WEB 2086, a novel antagonist of platelet activating factor in active and passive anaphylaxis. Immunopharmacology 3:7-24 (1987a).

Casals-Stenzel J.: Protective effect of WEB 2086, a novel antagonist of platelet-activating factor in endotoxin shock. Eur. J. Pharmacol. 135:117-122 (1987).

Chan B.B.K., Kern J.A., Flanagan T.L., Kron I.L. & Tribble C.G.: Effects of in vivo cyclosporine administration on endothelium-dependent responses in isolated vascular rings. Circulation (Suppl.II) 86:II295-II299 (1992).

Chan G.L.C., Erdmann G.R., Gruber S.A., Stok P., Chen S., Ascher N.L. & Canafax D.M.: Pharmacokinetics of 6-Thiouric acid and 6-mercaptopurine in renal allograft recipients after oral administration of azathioprine. Eur. J. Clin. Pharmacol. 36:265-271 (1989).

Chan G.L.C., Gruber S.A., Skjei K.L. & Canafax D.M.: Principles of immunosuppression. Crit. Care Clin. 6:841-892 (1990).

Charpentier B., Hiesse C., Ferran C., Lantz O., Fries D., Bach J.F. & Chatenoud L.: Syndrome clinique aigu lié à l'administration d'OKT<sub>3</sub>: Prévention par une injection unique d'un anticorps monoclonal anti-TNF humain. Presse Méd. 20:2009-2011 (1991).

Chilton F.H., O'Flaherty J.T., Walsh C.E., Thomas M.J. Wykle R.L., deChatelet L.R. & Waite M.L. Platelet activating factor: stimulation of the lipoxigenase pathway in polymorphonuclear leukocytes by 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine. J. Biol. Chem. 257:5402-5407 (1982).

Chilton F.H., Ellis J.M., Olson S.C. & Wykle R.L.: 1-O-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. A common source of platelet-activating factor and arachidonate in human polymorphonuclear leukocytes. J. Biol. Chem. 259:12014-12019

(1984).

Coffman T.M., Carr D.R., Yarger W.E. & Klotman P.E.: Evidence that renal prostaglandin and thromboxane production is stimulated in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 43:282-285 (1987).

Constanzo-Nordin M.R., Grusk B.B., Silver M.A., Sobotka P.A., Winters G.L., O'Connell J.B., Pifarré R. & Robinson J.A.: Reversal of recalcitrant cardiac allograft rejection with methotrexate. *Circulation* 78 (Suppl 3):III47-III57 (1988).

Cox C.P. & Wood K.L.: Selective antagonism of platelet-activating factor (PAF)-induced aggregation and secretion in washed rabbit platelets by CV-3988, L-652731, triazolam and alprazolam. *Thromb. Res.* 47:249-257 (1987).

Cramer D.V., Chapman F.A., Wu G-D., Harnaha J.B., Qian S. & Makowka L.: Cardiac transplantation in the rat. *Transplantation* 50:554-558 (1990).

Da Costa M., Metcalfe S. & Calne R.Y.: Prolongation of rat heart allograft survival using low-dose Cyclosporine and PAF antagonist WEB 2170. *Transplant. Proc.* 22:1945-1946 (1990).

Davis M.M. & Bjorkman P.M.: T-Cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334:395-402 (1988).

Demikhov V.P.: The technique of experimental transplantation of the lung. *Byull. Eksp. Biol. Med.* 10 (1950).

Demopoulos C.A., Pinckard R.N. & Hanahan D.J.: Platelet-activating factor: evidence for 1-O-Alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J. Biol. Chem.* 254:9355-9358 (1979).

Dinareello C.A. & Mier J.W.: Lymphokines. *N. Engl. J. Med.* 317:940-945 (1987).

Doebber T.W., Wu M.S., Robbins J.C., Choy B.M. Chang M.N. & Shen T.Y.: Platelet activating factor (PAF) involvement in endotoxin-induced hypotension in rats. Studies with PAF-receptor antagonist kadsurenone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127:799-808 (1985).

Elliot Sigal C., Valone F.H., Holtzman M. & Goetzl E.J.: Preferential human eosinophil chemotactic activity of the platelet-activating factor (PAF) 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (AGEPC). *J. Clin. Immunol.* 7:179-184 (1987).

Emmel E.A., Verweij C.L., Durand D.B., Higgins K.M., Lacy E. & Crabtree G.R.: Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation.

Science 246:1617-1620 (1989).

Esplugues J.V. & White B.J.: Mechanisms contributing to gastric motility changes induced by PAF-acether and endotoxin in rats. *Am. J. Physiol.* 256:G275-G282 (1989).

Felix S.B., Steger A., Baumann G., Busch R., Ochsenfeld G. et al.: Platelet-activating factor induced coronary constriction in the isolated perfused guinea-pig heart and antagonistic effects of the PAF antagonist WEB 2086. *J. Lipid Med.* 2:9-20 (1990).

Fernández-Gallardo S., Ortega M.P., Priego J.G., Fau de Casa-Juana M., Sunkel C. & Sánchez-Crespo M.: Pharmacological actions of PCA-4248, a new platelet-activating factor receptor antagonist: In vivo studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255:34-39 (1990).

Foegh M.L., Khirabadi B.S., Rowles J.R., Braquet P. & Ramwell P.W.: *Transplantation* 42:86-88 (1986).

Foegh M.L., Winchester J.R. & Zmudka M.: Urine i-TXB<sub>2</sub> in renal allograft rejection. *Lancet* 2:431-433 1981.

Foegh M.L., Khirabadi B.S. & Ramwell P.W.: Prolongation of rat cardiac allograft survival by Ca<sup>++</sup> blockers. *Transplantation* 40:211-212 (1985).

Forbes R.D.C., Kuramochi T., Guttmann R.D., Klassen J. & Knaack J.: A controlled sequential morphologic study of hyperacute cardiac allograft rejection in the rat. *Lab. Invest* 33:280 (1975).

Fraser C.D., Chacko V.P., Jacobus W.E.: Metabolic changes preceding functional and morphological indices of rejection and heterotopic cardiac allografts. *Transplantation* 46:346 (1988).

Freiche J.C.A., Sedivy P. & Touraine J.L.: Immunomodulation by platelet-activating factor (PAF) antagonist RP 48740 in rats. In 4 th. FELASA Symposium. Lyon (Juin, 1990).

Freiche J.C.A., Lang J., Sedivy P. & Touraine J.L.: Prolonged survival of renal transplants in nonimmunized and hyperimmunized rats receiving a platelet-activating factor antagonist. *Transplantation* 50:8-13 (1990).

Ginsberg D.J.: Cyclosporine: A double-edged sword. *J. Lab. Clin. Med.* 118:5-6 (1991).

Golitsin A., Cienfuegos J.A., Pinedo J.I., López R. Sanz F., Ortiz Berrocal & Castillo-Olivares J.L.: Trasplante cardíaco heterotópico en rata. Consideraciones técnicas y criterios de viabilidad. *Cirugía Española.* 38:688-693 (1984).

Goldberg H.J., Wong P.Y., Cole E.H., Levy G.A. & Skorecki K.L.: Dissociation between the immunosuppressive activity

of cyclosporine derivatives and their effects on intracellular calcium signaling in mesangial cells. *Transplantation* 47:731-733 (1989).

Granelli-Piperno A., Andrus L. & Steinman R.M.: Lymphokine and non-lymphokine mRNA levels in stimulated human cells. *J. Exp. Med.* 163:922 (1986).

Guthrie C.C.: *Blood Vessel Surgery and its Application*. London, Edward Arnold & Co., (1912).

Hakala T.R., Starzl T.E., Rosenthal J.T., Shaw B. & Iwatsuri S.: Cadaver renal transplantation with cyclosporin A and steroids. *Transplant. Proc.* 15:465 (1983).

Halloran P.F., Wadgymar A. & Autenried P.: The regulation of expression of major histocompatibility complex products. *Transplantation* 41:413-420 (1986).

Häyry P. Anamnestic responses in mixed lymphocyte culture-induced cytotoxicity (MLC-CML) reaction. *Immunogenetics* 3:417 (1976).

Häyry P., von Willebrand E., Soots A.: In situ effector mechanisms in rat kidney allograft rejection: III. Kinetics of the inflammatory response and generation of donor-directed killer cells. *Scand. J. Immunol.* 10:95 (1979).

Häyry P.: Intragraft events in allograft destruction. *Transplantation* 38:1-6 (1984).

Hellewell P.G. & Williams T.J.: Antagonism of PAF-induced oedema formation in rabbit skin: a comparison of different antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 97:171-180 (1989).

Henriques M.G., Weg V.B., Martins M.A., Silva P.M., Fernandes P.D. et al.: Differential inhibition by two tetrazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* 99:164-168 (1990).

Hiesse C., Lantz O., Kriaa F., Noury J., Fries D., Charpentier B. & Bazin H.: Traitement par l'anticorps monoclonal anti-récepteur de l'interleukine 2 Lo-Tact-1 en transplantation rénale. *Press Méd.* 20:2036-2038 (1991).

Hofmann B., Meisgeier U., Ostermann G., Klöcking H.P., Hoffmann A. et al.: Effect of BN 52021 on PAF-induced release of tissue-type plasminogen activator. In Braquet P. (Ed.) *Ginkgolides chemistry, biology, pharmacology and clinical perspectives*. Vol. 2 pp.291-303 JR Prous. Barcelona. (1990).

Hosford D., Mencia-Huerta J.M. & Braquet P.: The role of Platelet-activating factor and structurally related alkyl phospholipids in immune and cytotoxic processes. In: S. Nigam & T.F. Slater (Eds.), *Eicosanoids, Lipid peroxidation and cancer*. Springer Verlag, Heidelberg, pp. 54-65 (1988).

Hosford D. & Braquet P.: Antagonist of platelet-activating factor: Chemistry, pharmacology and clinical applications. Prog. Med. Chem. 22:325-380 (1990).

Humbria A.: Inflamación, inmunidad y radicales libres. Abstract Simposium internacional Impacto de los radicales libres en biomedicina y salud. Madrid, 1990.

Hwang S.B., Lam M.H., Biftu T., Beattie T.R. & Shen T.Y.: Trans-2,5-Bis-(3,4,5-trimethoxyphenyl) tetrahydrofura. An orally active specific and competitive receptor antagonist of platelet activating factor. J. Biol. Chem. 260:15639-15645 (1985).

Imagawa D.K., Millis J.M., Olthoff K.M. Seu P., Dempsey R.A., Hart J., Terasaki P.I., Wasef E. M. & Busuttil R.W.: The role of tumor necrosis factor in allograft rejection II. Transplantation 50:189-193 (1990).

Ito S., Camussi G., Tetta C., Milgrom F. & Andres G.: Hyperacute renal allograft rejection in the rabbit: The role of platelet-activating factor and of cationic proteins derived from polymorphonuclear leukocytes and from platelets. Lab. Invest. 51:148 (1984).

Jenkins M.K., Schwartz R.H., Pardoll D.M.: Effects of cyclosporine A on T cell development and clonal deletion, Science 241:1655-1658 (1988). Kahan B.D.: Cyclosporine. N. Engl. J. Med. 321:1725-1738 (1989).

Kahan B.D.: Cyclosporine. N. Engl. J. Med. 321:1725-1738 (1989).

Kahan B.D., Ried M. & Newberger J.: Pharmacokinetics of cyclosporine in human renal transplantation. Transplant Proc. 15:446-453 (1983).

Katz S.M., Liebert M., Gill III J., Kunz H.W., Cramer D.V. & Guttman R.D.: The relative roles of MHC and non-MHC genes in heart and skin allograft survival. Transplantation 36:96-101 (1983).

Kauffman H.M., Adams M.B., Hebert L.A. & Walczak P.M.: Platelet inhibitors in human renal homotransplantation: randomized comparison of aspirin versus dipyridamole. Transplant. Proc. 12:311 (1980).

Keith C.L., Murphy R.C., Andres J.L., Lynch J. & Henson P.M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 121:815 (1984).

Kemnitz J., Cohnert T., Schäfers H-J et al.: A classification of cardiac allograft rejection. A modification of the classification by Billingham. Am. J. Surg. Pathol. 11:503-515 (1987).

Keown P.A.: Clinical application of therapeutic drug monitoring: Optimizing cyclosporine therapy. Transplant.

Proc. 20:382-389 (1988).

Khirabadi B.S., Foegh M.L., Goldstein H.A. & Ramwell P.W.: The effect of prednisolone, thromboxane, and platelet-activating factor receptor antagonists on lymphocyte and platelet migration in experimental cardiac transplantation. *Transplantation* 43:626-630 (1987).

Khirabadi B.S., Foegh M.L. & Ramwell P.W.: Urine immunoreactive thromboxane B<sub>2</sub> in rat cardiac allograft rejection. *Transplantation* 39:6-8 (1985).

Kirkpatrick C.H. & Rowlands D.T.: Transplantation immunology. *J. Am. Med. Ass.* 268:2952-2958 (1992).

Koltai M., Tosaki A., Guillon J.M., Hosford D. & Braquet P.: PAF-antagonist as potential therapeutic agents in cardiac anaphylaxis and myocardial ischemia. *Card. Drug Rev.* 7:177-198 (1989).

Koltai M., Hosford D., Guinot P., Esanu A. & Braquet P. Platelet-activating factor (PAF): A review of its effects, antagonists and possible future clinical implications (I). *Drugs* 42(I):9-29 (1991).

Kostakis A.J., White D.J.G. & Calne R.Y.: Prolongation of rat heart allograft survival by cyclosporin A. *IRCS J. Med. Sci.* 5:280 (1977).

Kostakis A.J., Karayannocos P.E., Pattakos S., Nakopoulou L., Karatzas G. & Kouletianos E.: Prolongation of cardiac and renal allograft survival by pentoxifylline in rats. *IRCS Med. Science* 10:77 (1982).

Krensky A.L., Weiss A., Crabtree G., Davis M.M. & Parham P.: T-Lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* 322:510-517 (1990).

Kriett J.M. & Kaye M.P.: The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Eighth official report-1991. *J. Heart Lung Transplant* 10:491-498 (1991).

Lagente V., Desquand S., Randon J., Lefort J. & Vargaftig B.B.: Interference of PAF-acether antagonist with the effects of PAF itself and of anaphylactic shock in vitro and in vivo guinea-pig bronchopulmonary preparations. *Prostaglandins* 30:703 (1985).

Lamas S., Olivera A., Lopez-Novoa J.M., Lopez-Farre A. & Hernando L.: Effect of BN 52021 on cyclosporine-induced glomerular function impairment. In Braquet P. (Ed.) *Ginkgolides: chemistry, biology, pharmacology and clinical perspectives*. Vol. 2:547-559, JR Prous. Barcelona (1990).

Larsson E.: Cyclosporin A and dexamethasone suppress T cell responses by selectively acting as distinct sites of the triggering process. *J. Immunol.* 124:2828 (1982).

Lee S., Macedo A.R., Curtis G.P., Lee D. & Orloff M.: A simplified model for heterotopic rat heart transplantation. *Transplantation* 33:438-442.(1982).

Lefer A.M.: Platelet-activating factor (PAF) and its role in cardiac injury. *Progress in Clinical and Biological Research* 301:53-60 (1989).

Leung K.H. & Mihich E.: Prostaglandin modulation of development of cell-mediated immunity in culture. *Nature* 288:597 (1980).

Levin B., Bohannon L., Warvariv V., Bry W. & Collins G.: Total Lymphoid irradiation (TLI) in the cyclosporine era-use of TLI in resistant cardiac allograft rejection. *Transplant Proc.* 21:1793-1795 (1989).

López-Boado M.A., Pi F., Ramos E., Martrat A. et al.: Efecto beneficioso de la superóxido-dismutasa en la prevención de la lesión de reperfusión en el trasplante de pancreas. Abstract Simposium internacional Impacto de los radicales libres en biomedicina y salud. Madrid, 1990.

Maestre C., Zarco P., Gomez-Guerrero C., Gonzales E., Herrero-Beaumont G. et al.: Cooperation between tumor necrosis factor (TNF) and platelet activating factor (PAF) in the inflammatory response. *J. Lip. Med.* 2:S151-S159 (1990).

Makowka L., Chapman F.A., Cramer D.V., Qian S., Sun H. & Starzl T.E.: Platelet-activating factor and hyperacute rejection. *Transplantation* 50:359-365 (1990).

Mangino M.J., Anderson C.B., DeSchryver K., Tyler J.D., Sicard G.A. & Turk J.: Eicosanoid synthesis associated with renal allograft rejection in dogs. *Trans. Proc.* 18:63-70 (1986).

Mangino M.J., Anderson C.B., DeSchryver K. & Turk J. Arachidonate lipoxygenase products and renal allograft rejection in dogs. *Transplantation* 44:805-808 (1987).

Mangino M.J., Anderson C.B., Murphy M.K. & Turk J.: Renal allograft platelet activating factor synthesis during acute cellular rejection. *J. Lipid Med.* 4:69-82 (1991).

Mann F.C., Priestly J.T., Markiwitz J. & Yater W.: Transplantation of the intact mammalian heart. *Arch. Surg.* 26:219 (1933).

Mann J.: Graft vascular disease in heart transplant patients. *Br. Heart J.* 68:253-254 (1992).

McColl S.H., Krump E., McDonald P.P., Braquet M., Naccache P.H., Poubelle P.E., Braquet P. & Borgeat P.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances the synthesis of leukotriene B<sub>4</sub> by human neutrophils in response to PAF-

acether. J. Lipid Med. 2:119-128 (1990).

McGiffin D.C., Kirklin J.K. & Naftel D.C.: Acute renal failure after heart transplantation and cyclosporine therapy. J. Heart Transplant 4:396-399 (1985).

McGoon M.D. & Frantz R.B.: Techniques of immunosuppression after cardiac transplantation. Mayo Clin. Proc. 67:586-595.

Mencia-Huerta J.M., Hosford D. & Braquet P.: Acute and long-term pulmonary effects of platelet-activating factor. Clin. Exp. Allergy 19:1-18 (1989a).

Mencia-Huerta J.M., Pignol B., Paubert-Braquet M. & Braquet P.: The role of platelet-activating factor (PAF) in immune and cytotoxic processes. Second Vienna Shock Forum pp. 441-446 (1989b).

Morgan B.J., Lyson T., Scherrer U. & Victor R.G.: Cyclosporine causes sympathetically mediated elevations in arterial pressure in rats. Hypertension 18:458-466 (1991).

Morgan D.A., Ruscetti F.W. & Gallo R.C. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. Science 193:1007-1008 (1976).

Morris P.J.: Cyclosporin A. Transplantation 32:349 (1981).

Morris R.E., Hoyt E.G., Murphy M.P. & Shorthouse R.: Immunopharmacology of FK-506. Transplant Proc. 21:1042-1044 (1989).

Mourad G., Halimi J.M., Ribstein J., Mimran A. & Mion C.: Réversibilité fonctionnelle de la néphrotoxicité chronique de la ciclosporine chez le transplanté rénal. Presse Méd. 20:2028-2029 (1991).

Mueller H.W., O'Flaherty J.T. & Wykle R.L.: J. Biol. Chem. 259:14554 (1984).

Murray B.M., Paller M.S., Ferris T.F.: Effect of ciclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. Kidney Int. 28:764-767 (1985).

Myers B.D., Ross J., Newton L., Luetscher J. & Perlroth M.: Cyclosporine-associated chronic nephropathy. N. Engl. J. Med. 311:699-705 (1984).

Najarian J.S., Ferguson R.M., Sutherland D.E.R., Rynasiewicz J.J. & Simmons R.L.: A prospective trial of the efficacy of cyclosporine in renal transplantation at the University of Minnesota. Transplant. Proc. 15:438 (1983).

Nemlander A., Saksela E. & Häyry P. Are "natural killer" cells involved in allograft rejection?. Eur. J. Immunol. 13:348 (1983).

Nishizuka Y.: Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233:305-312 (1986).

Nonomura A., Kono N., Yoshida K., Nakanuma Y. & Ohtag G.: Histological changes of bile duct in experimental graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers, II. Electron microscopic observations. *Liver* 8:32-41 (1988).

Nordstoga K. & Aasen A.O. Hepatic changes in late canine endotoxin shock. A light and electron microscopic investigation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 87A:335-346 (1979).

O'Connell J.B., Bourge R.B., Constanzo-Nordin M<sup>a</sup> R. et al. Cardiac Transplantation: Recipient selection, donor procurement, and medical follow-up. *Circulation*. 86:1061-1079 (1992).

Oda M., Satouchi K., Yasunage K. & Saito J.: Molecular species of platelet-activating factor generated by human neutrophils challenged with ionophore A23187. *J. Immunol* 135:1090-1093 (1985).

O'Flaherty J.T., Salzer W.L., Cousart S. et al.: *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 39:291 (1983).

O'Hair D.P., Roza A.M., Pieper G.M., Komorowski R., Moore G., mcManus R.P. & Adams M.B.: Platelet activating factor antagonist RP-59227 reduces vascular injury in discordant cardiac xenograft rejection. *Transplant. Proc.* 24:702-703 (1992).

Okamoto M., Yoshida K., Nishikawa M., Ando T. Iwami M., Kohsaka M. & Aoki H.: FR-900452, a specific antagonist of platelet activating factor (PAF) produced by streptomyces phaeofaciens. 1. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *The Journal of Antibiotics* 1:141-147 (1986a).

Okamoto M., Yoshida K., Uchida I., Nishikawa M., Kohsaka M. & Aoki H.: Studies of platelet activating factor (PAF) antagonist from microbial products. I. Bisdethiobis(methylthio) gliotoxin and its derivatives. *Chem. Pharm: Bull.* 34:340-344. (1986b).

Okamoto M., Yoshida K., Uchida I., Nishikawa M., Kohsaka M. & Aoki H.: Studies of platelet activating factor (PAF) antagonist from microbial products. II. Pharmacological studies of FR-49175 in animal models. *Chem. Pharm. Bull.* 34:345-348. (1986c).

Olausson M., Mjörnstedt L., Lindholm L. & Brynner H. Non-suture organ grafting to the neck vessels in rats. *Acta Chir. Scand.* 150:463-467 (1984).

Olsen S.L., O'Connell J.B., Bristow M.R. & Renlund D.G.: Methotrexate as an adjunct in the treatment of persistent mild cardiac allograft rejection. *Transplantation* 50:773-775

(1990).

Ono K. & Lindsey E.: Improved technique of heart transplantation in rats. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 57:225-229 (1969).

Ortega M.P., García M.C., Gijón M.A., Fau de Casa-Juana M., Priego J.G., Sanchez-Crespo M. & Sunkel C.: 1,4-Dihydropyridines, a new class of platelet-activating factor receptor antagonists: In vitro pharmacologic studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255:28-33 (1990).

Parthenais E., Soots A. & Häyry P. Sensitivity of rat heart endothelial and myocardial cells to alloimmune lymphocytes and to alloantibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cell Immunol.* 48:375 (1979).

Pavao dos Santos O.F., Boim M.A., Bregman R., Draibe S.A., Barros E.J.G., Pirotzky E., Schor N. & Braquet P.: Effect of platelet-activating factor antagonist on cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 47:592-595 (1989).

Penn I.: Cancers following cyclosporine therapy. *Transplantation* 43:32-35 (1987).

Pereira G.M.B., Kroczyk R.A., Lesko L.J. & Shevach E.M.: Mechanism of action of cyclosporin A (Csa) in vivo. *Fed. Proc.* 46(3):757 (1987).

Piper P.J. & Stewart A.G. Coronary vasoconstriction in the rat isolated perfused hearts induced by platelet-activating factor is mediated by leukotriene C<sub>4</sub>. *Br. J. Pharmacol.* 88:595-605 (1986).

Pirotzky E. & Braquet P. PAF-acether and kidney pathology. In: P. Braquet, H. Mangold & B.B. Vargaftig (Eds.), *Biologically active Lipids. Progress in Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 22. Karger, Basel, pp. 168-180 (1988).

Porter K.A. Rejection in treated renal allografts. *J. Clin. Pathol.* 20:518 (1967).

Ramesha C.S., Pickett W.C.: Species-specific variations in the molecular heterogeneity of the platelet activating factor. *J. Immunol.* 138:1559-1563 (1987).

Rao V.K. & Lisitza M.: Accessory heart transplantation to groin in the rat. A new model for retransplantation experiments. *Transplantation* 40:567-569 (1985).

Renlund D.G., O'Connell J.B., Gilbert E.M., Watson F.S. & Bristow M.R.: Feasibility of discontinuation of corticosteroid maintenance therapy in heart transplantation. *J. Heart. Transplant* 6:71-78 (1987).

Robinson M.A., Kindt T.J.: Major histocompatibility complex antigens and genes. In: Paul W.E., ed. *Fundamental immunology*. 2nd ed. New York: Raven Press, 489-539 (1989).

Rola-Pleszczynski M.: Priming of human monocytes with PAF augments their production of tumor necrosis factor in response to interleukin 1. *J. Lipid Mediat.* 2:77-82 (1990).

Sakurai Y., Kagawa K., Kato Y., Otani H. & Nonoyama A.: Effect of combined administration of low dose cyclosporine A with a thromboxane synthetase inhibitor on acute cardiac allograft rejection. *Transplant. Proc.* 22:1686-1688 (1990).

Salem P., Denizot Y., Pitton C., Dulioust A., Bossant M.J., Benveniste J. & Thomas Y.: Presence of paf-acether in human thymus. *Febs Let.* 257:49-51 (1989).

Sánchez Crespo M., Fernandez-Gallardo S., Nieto M.L., Baranes J. & Braquet P.: Inhibition of the vascular actions of IgG aggregates by BN 52021, a highly specific antagonist of PAF-acether. *Immunopharmacology* 10:69-75 (1985).

Sánchez Crespo M. & Fernández Gallardo S. Pharmacological modulation of PAF: A therapeutic approach to endotoxin shock. *J. Lipid Med.* 4:127-144 (1991).

Satouchi K., Pinckard R.N. & Hanahan D.J. *Arch. Biochem. Biophys.* 211:683 (1981).

Sayegh S.F., Creech O., Harding J.H.: Transplantation of the homologous heart. *Surg. Forum* 8:317-319 (1957).

Schaer G.L., Hursey T.L., McAlister K., Campbell D., Manabat N. et al.: Platelet activating factor is an important mediator of myocardial reperfusion injury. *Abstract American College of Cardiology* 17:228A (1991).

Sedivy P., Caillard C.G., Floch A., Folliard F., Mondot S., Robaut C. & Terlain B.: 48740 RP: a specific PAF-acether antagonist. *Prostaglandins* 30:688 (1985).

Setchel K.D.R., Lawson A.M., Mitchel F.L., Adlercreutz H., Kirk D.N. & Axelson M.: Lignans in man and animal species. *Nature* 287:740-742 (1980).

Shaw J.F.: Prolongation of rat cardiac allograft survival by treatment with prostacyclin or aspirin during acute rejection. *Transplantation* 35:526-529 (1983).

Shaw J.O., Pinckard R.N., Ferringni K.S., McManus L.M., Hanahan D.J. Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine (platelet activating factor). *J. Immunol.* 127:1250-1255 (1981).

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.: Characterization of a platelet-activating factor receptor antagonist isolated from haifenteng (*Piper futokadsura*): specific inhibition of in vitro and in vivo platelet-activating factor-induced effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:672-676 (1985).

Sinitsyn H.: Transplantation as a New Method in Experimental Biology and Medicine, Moscow. (1948). Photostats of dispatch N° 763 for Army Medical Library, Washington, DC.

Snyder F.: Biochemistry of platelet activating factor: a unique class of biologically active phospholipids. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 190:125-135 (1989).

Soper W.D., Pollak R., Manaligod J.R., Hau T., Mozes M.F. & Jonasson O.: Use of anticoagulation in cadaver renal transplants. J. Surg. Res. 32:370-373 (1982).

Starlz T.E., Abu-Elmagd K., Fung J.J., Todo S., Tzakis A.G., McCauley J. & Demetris A.J.: Expérience clinique du FK 506. Press Méd. 20:1967-1973 (1991).

Strom T.B., Tilney N.L., Paradysz J.M., Bancewicz J., Carpenter C.B. Cellular components of allografts rejection: identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. J. Immunol. 118:2020 (1977).

Sunkel C.E., Fau de Casa-Juana M., Cillero F.J., Priego J.G. & Ortega M.P.: Synthesis, platelet aggregation inhibitory activity, and in vivo antithrombotic activity of new 1,4-dihydropyridines. J. Med. Chem. 31:1886-1890 (1988).

Tchervenkov J.I., Epstein M.D., Alexander J.W. Schroeder T.J.: The effect of donor-specific blood transfusion, cyclosporine, and dietary prostaglandin precursors on rat cardiac allograft survival. Transplantation 47:177-181 (1989).

Tencé M., Coeffier E., Heymans F., Polonsky J., Godfroid J.J., Benveniste J.: Structural analogs of platelet activating factor (PAF acether). Biochimie 63:723-727 (1981).

Terashita Z., Tsushima S., Yoshioka Y., Nomura H., Inada Y. & Nishikawa K.: CV 3988 - a specific antagonist of platelet activating factor (PAF). Life Sci. 32(17):1975-1972 (1983).

Terashita Z., Imura Y., Nishikawa K. & Sumida S.: Is platelet activating factor (PAF) a mediator of endotoxin shock. Eur. J. Pharmacol. 109:257-261 (1985).

Tolins J.P., Vercellotti G.M., Wilkowske M., Jacob H.S. & Raij L.: Role of platelet-activating factor in endotoxemic acute renal failure in the male rat. J. Lab. Clin. Med. 113:316-324 (1989).

Tomita F.: Heart transplantation in the rat. Sapporo Med. J. 30:165 (1966).

Tood P.A. & Brogden R.N.: Muromonab CD3: a review of its pharmacology and therapeutic potential. Drugs 37:871-899 (1989).

Tosaki A., Koltai M., Braquet P. & Szekeres L.: Possible

involvement of platelet activating factor in anaphylaxis of passively sensitized, isolated guinea-pig hearts. *Card. Res.* 23:715-722 (1989).

Trasplante de órganos y tejidos en España (1987). Ministerio de Sanidad y Consumo. Informes de evaluación tecnológica sanitaria 3. 1989.

Ukena D., Krogel C., Dent G., Yukawa T., Sybrecht G. et al.: PAF-receptors on eosinophils: identification with a novel ligand. (<sup>3</sup>H)WEB 2086. *Bioch. Pharm.* 38:1702-1705 (1989).

Umeki Y., Weinrib H.P., MacLeod C.A., Economou S.G. & Gebel H.M.: New method for cardiac transplantation. *Microsurgery* 8:122-127 (1987).

Uretsky B.F., Murali S., Reddy P.S., et al.: Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisone. *Circulation* 76:827-834 (1987).

Valone F.H.: Inhibition of platelet-activating factor binding to human platelets by calcium channel blockers. *Thromb. Res.* 45:427-435 (1987).

Valone F.H. & Epsein L.B. Biphasic platelet-activating factor synthesis by human monocytes stimulated with IL-1- $\beta$ , tumor necrosis factor, or IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 140:3945-3950 (1988).

Vercellotti G.M., Yin H.Q., Gustafson K.S., Nelson P.O. & Jacob H.S.: Platelet activating factor primes neutrophil responses to agonists: role in promoting neutrophil-mediated endothelial damage. *Blood* 71:1100-1107 (1988).

Viossat I, Chapelat M., Chabrier P.E. & Braquet P.: Effects of platelet activating factor (PAF) and its receptor antagonist BN 52021 on isolated perfused guinea-pig heart. *Prost. Leu. Ess. Fatty Acids* 38:189-194 (1989).

von Willebrand E., Parthenais E. & Häyry P. Expression of the major AgB histocompatibility complex antigens on different structural components of rat kidney and heart. *Cell Immunol.* 52:313 (1980).

Ward S.G., Lewis G.P., Westwick J.: A role of platelet-activating factor (PAF) in human T lymphocyte proliferation. In: Paubert-Braquet M., Braquet P., Demling R., Fletcher R. Foegh M. (eds) *Lipid Mediators in the Immunology of Shock*. Nato ASI Series, Plenum Press New York. 483-493 (1987).

Wardlaw A.J. & Kay A.B.: PAF-acether is a potent chemotactic factor for human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77:236-242 (1986).

Wedner H.J. & Parker C.W.: Lymphocyte activation. *Prog. Allergy* 20:195 (1976).

Weidle P.J. & Vlasses P.H.: Systemic hypertension associated with cyclosporine: A review. *Drug Intell. Clin. Pharm.* 22:443-450 (1988).

Weiss A. & Imboden J.B. Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. *Adv. Immunol.* 41:1-38 (1987).

Wenger R.M.: Cyclosporine: conformation and analogues as tools for studying its mechanism of action. *Transplant Proc.* 20 Suppl. 2:313-318 (1988).

Whatley R.E., Fennel D.F., Kurrus J.A., Zimmerman G.A., McIntyre T.M. et al.: Synthesis of platelet-activating factor by endothelial cells: the role of G proteins. *J. Biol. Chem.* 265:15550-15559 (1990).

Wilson G.J., Mickle D.A., Dasmahapatra H., Martell M., Mehra A. & Tsao P.: Oxygen free radical-mediated lipid peroxidation injury in acute cardiac allograft rejection. *Transplantation* 54:175-178 (1991).

Winslow C.M., Vallespir S.R., Frisch G.E., D'Aries F.J., DeLillo A.K., Houlian W.J., Parrino V., Schmitt G & Saunders R.N.: A novel platelet activating factor receptor antagonist. *Prostaglandins* 30(4):697 (1985).

Woodley S.L., Renlund D.G., O'Connell J.B. & Bristow M.R.: Immunosuppression following cardiac transplantation. *Cardiol. Clin.* 8:83-96 (1990).

Yasaka T., Boxer L.A. & Baehner R.L. Monocyte aggregation and superoxide anion release in response to formyl-methionyl-leucocyl-phenylalaline (FMLP) and platelet-activating factor (PAF). *J. Immunol.* 128:1939-1944 (1982).