

Efecto del triflusal sobre la agregación y secreción de las plaquetas humanas: papel del óxido nítrico

Lourdes Sánchez de Miguel, Mercedes Montón, M.^a Mar Arriero, José Ignacio Guerra, Ana Jiménez, Fernando González-Fernández, Margarita García-Durán, Teresa Bellver, Luis Rico, José Romero, Juan Gómez, Antonio Núñez, Pedro Marcos, Rocío Ayala, Jerónimo Farré, Santos Casado y Antonio López-Farré

Laboratorio de Investigación Cardiovascular. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Introducción y objetivos. Recientes estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio demostraron que el triflusal reduce la agregación plaquetaria mediante la estimulación de la producción de óxido nítrico (NO) por los neutrófilos. El objetivo de este trabajo fue evaluar si el tratamiento *in vivo* con triflusal también aumenta la capacidad de los neutrófilos de generar NO analizando el papel del NO liberado por los neutrófilos sobre la agregación y secreción plaquetaria.

Métodos. El estudio se realizó en 12 voluntarios sanos de 32 ± 6 años a los que se administró triflusal (600 mg/día) durante 5 días, extrayéndoles plaquetas y neutrófilos antes y después del tratamiento y midiéndoles su capacidad de producir NO, el porcentaje de agregación de sus plaquetas frente a ADP y la capacidad de liberar factor transformante del crecimiento β (TGF- β).

Resultados. Tras el tratamiento con triflusal se obtuvieron los siguientes resultados: a) aumento de la producción de NO en los neutrófilos; b) potenciación de la inhibición de la agregación plaquetaria en presencia de neutrófilos, efecto que se revertía al incubar los neutrófilos con un antagonista de L-arginina, L-NAME, y c) la presencia de neutrófilos redujo la liberación del TGF- β por las plaquetas determinado como medida de secreción plaquetaria, por un mecanismo independiente del NO.

Conclusiones. Nuestro estudio demuestra que el tratamiento con triflusal (600 mg/día/5 días) estimula la producción de NO por los neutrófilos. Tras el tratamiento con triflusal los neutrófilos inhiben la agregación y la secreción de las plaquetas. El efecto antiagregante plaquetario demostrado por los neutrófilos fue dependiente del NO, pero no así la inhibición de la desgranulación plaquetaria.

Palabras clave: Óxido nítrico. Plaquetas. Leucocitos. Trombosis.

(*Rev Esp Cardiol* 2000; 53: 205-211)

Effect of Triflusal on Human Platelet Aggregation and Secretion: Role of Nitric Oxide

Introduction and aims. The thrombotic process is a multicellular phenomenon in which not only platelets are involved but also neutrophils are involved. Recent *in vitro* studies performed in our laboratory have demonstrated that triflusal reduced platelet aggregation by stimulating nitric oxide (NO) production by neutrophils. The aim of the present study was to evaluate whether the *in vivo* treatment with triflusal could also modify the ability of neutrophils to produce NO. Furthermore, the role of NO released by neutrophils on platelet aggregation and secretion was also tested.

Methods. The study was performed in 12 healthy volunteers of 32 ± 6 years of age. The volunteers were treated with triflusal (600 mg/day) for 5 days and platelets and neutrophils were isolated before and after treatment. The ability of neutrophils to produce NO and the capacity of inhibiting platelet aggregation and secretion of transforming growth factor- β (TGF- β) were assessed.

Results. After the treatment with triflusal we obtained the following results: a) an increase in NO production by neutrophils; b) potentiation of the inhibition of platelet aggregation by neutrophils, an effect that was reverted by incubating neutrophils with an L-arginine antagonist, L-NAME, and c) the presence of neutrophils reduced the release of TGF- β by platelets measured as index of platelet secretion by a NO-independent mechanism.

Conclusions. Triflusal (600 mg/day/5 days) stimulated NO production by neutrophils. After the treatment with triflusal, neutrophils inhibited both platelet aggregation and secretion. The antiaggregating effect of neutrophils was an NO-dependent mechanism while the inhibition of platelet secretion mediated by neutrophils after the treatment with triflusal was an NO-independent mechanism.

Key words: Nitric oxide. Platelets. Leukocytes. Thrombosis.

(*Rev Esp Cardiol* 2000; 53: 205-211)

Correspondencia: Dr. A. López-Farré.
Laboratorio de Investigación Cardiovascular. Fundación Jiménez Díaz.
Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid.
Correo electrónico: alopeza@fjd.es

Recibido el 3 de marzo de 1999.

Aceptado para su publicación el 14 de junio de 1999.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

NO: óxido nítrico.

TGF- β : factor transformante del crecimiento- β .

L-NAME: Nw-Nitro-L-Arginine methyl ester.

C-PTIO: 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5

tetramethylimidazoline 1-oxyl 3-oxide.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, el proceso trombótico se ha considerado como un fenómeno multicelular en el que están implicadas no sólo las plaquetas sino también los neutrófilos, los eritrocitos y el endotelio vascular¹⁻⁴. Por lo tanto, el conocimiento sobre los mecanismos que regulan la agregación de las plaquetas, su desgranulación y adhesión al endotelio ha ido cambiando de forma progresiva. En este sentido, distintas evidencias han demostrado la implicación de dos mediadores con capacidad vasodilatadora que son generados por el endotelio y los neutrófilos, el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina, en la regulación de la activación de las plaquetas^{5,6}.

La liberación de los gránulos de las plaquetas es un aspecto de la activación plaquetaria que ocurre en respuesta a diferentes agonistas. El proceso de agregación y secreción plaquetaria se ha asumido que ocurre de forma simultánea. No obstante, estos dos procesos, aunque puedan producirse a la vez en el tiempo, son independientes entre sí. La estimulación de la secreción del contenido granular de las plaquetas, y particularmente de los gránulos- α , resulta en la liberación de factores de crecimiento, como el factor transformante del crecimiento- β (TGF- β)⁷.

La inhibición de la activación plaquetaria ha sido el foco de atención de muchos estudios farmacológicos encaminados a la prevención y tratamiento de los eventos trombóticos. El triflusal es un fármaco con actividad antiagregante plaquetaria^{8,9}. El mecanismo propuesto para la acción antiplaquetaria del triflusal ha sido su capacidad de inhibición de la actividad ciclooxigenasa en las plaquetas¹⁰. No obstante, la inhibición de la actividad ciclooxigenasa por el triflusal no puede explicar completamente el efecto antitrombótico de este fármaco. En este sentido, se ha demostrado que el triflusal tiene una mayor capacidad antiagregante plaquetaria en presencia de leucocitos¹¹. Además, nuestro laboratorio ha demostrado en estudios *in vitro* que los inhibidores de la ciclooxigenasa, incluido el triflusal, reducen la agregación plaquetaria mediante la estimulación de la producción de NO por los neutrófilos^{12,13}.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si el tratamiento *in vivo* con triflusal también aumenta la capaci-

dad de los neutrófilos de generar NO. Además, se analizó el papel del NO liberado por los neutrófilos sobre la agregación y secreción plaquetaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Protocolo experimental

El estudio se realizó en un grupo de 12 voluntarios sanos (32 ± 6 años), los cuales no tomaron ningún otro fármaco al menos 20 días antes de comenzar los experimentos. El estudio se llevó a cabo administrándoles triflusal (600 mg/día; una dosis oral por la mañana) durante 5 días. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron mediante extracción venosa antes de comenzar la administración de triflusal y una hora después de la última administración. Los resultados de los experimentos obtenidos antes del tratamiento con triflusal se compararon con los resultados de los mismos individuos después de dicho tratamiento. Todos los participantes en el protocolo dieron consentimiento escrito de su participación.

Aislamiento de los neutrófilos

Los neutrófilos humanos se aislaron de sangre periférica obtenida mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque, como describimos¹⁴. Los neutrófilos (95% pureza; 98% viabilidad por exclusión en trypan blue) se resuspendieron en medio Dulbecco que contenía (en mmol/l): 5,6 D-glucosa, 2,6 KCl, 137 NaCl, 2,6 H₂KPO₄, 8 NaH₂PO₄, pH 7,5.

Determinación del contenido en [³H]-L-citrulina

Como ya se describió en anteriores trabajos¹⁴, los neutrófilos aislados se contaron y se incubaron durante 45 min a 37 °C en medio Dulbecco que contenía 10⁻⁴ mol/l de L-arginina y 1 μ Ci/ml [³H]-L-arginina. La [³H]-L-arginina no incorporada se lavó dos veces con el mismo tampón. Los experimentos se realizaron utilizando 3×10^6 neutrófilos/muestra y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Después de la incubación, los neutrófilos se lisaron con etanol frío y los sobrenadantes se recogieron y se evaporaron hasta sequedad bajo una atmósfera de N₂. Como ya se ha descrito anteriormente, los extractos se resuspendieron en 20 mmol/l Hepes/KOH, pH 5,5 y se aplicaron en columnas de cromatografía Dowex AG50WX8 (forma Na⁺) que posteriormente se eluyeron con agua (fracción de L-citrulina) y 0,5 mol/l NaOH (fracción de L-arginina). La fracción de [³H]-L-citrulina se cuantificó mediante recuento con líquido de centelleo. Este método es capaz de separar L-arginina de L-citrulina en más de $92 \pm 3\%$.

Preparación del plasma rico en plaquetas y agregación plaquetaria

El plasma rico en plaquetas se obtuvo de los mismos voluntarios que los neutrófilos de cada experimento y se preparó como se describe¹⁴. Brevemente, la sangre total se recogió en 10% (v/v) ácido cítrico/citrato-dextrosa y se centrifugó a 1.000 rpm durante 20 min. Se recogió el plasma rico en plaquetas y se contaron las plaquetas en un contador Coulter. El número de plaquetas se ajustó con plasma pobre en plaquetas que se obtuvo del mismo donante ($1,2 \times 10^7$ células/ml plasma). La activación plaquetaria se midió en un agregómetro (Chrono-Log, dos canales) mediante cambios en la transmisión de luz. Se utilizó el plasma pobre en plaquetas como control del 100% de transmisión de luz. El plasma pobre en plaquetas contenía una cantidad de neutrófilos idéntica a la de la muestra para corregir la posible absorción de luz producida por la presencia de la suspensión de neutrófilos en el plasma.

Se preincubó el plasma rico en plaquetas (500 μ l) a 37 °C durante 10 min en el agregómetro con agitación continua (1.000 rpm). Se añadieron neutrófilos en una suspensión de 20 μ l que se incubaron durante 5 min a 37 °C. El número de neutrófilos que se añadió estaba ajustado a una relación de plaqueta:neutrófilo de (125:1) que es, aproximadamente, la relación que estas células tienen en la circulación sanguínea normal. La agregación de las plaquetas se estimuló con ADP (10^{-5} mol/l).

Para determinar la posible implicación del NO en los efectos que los neutrófilos tenían sobre las plaquetas, los neutrófilos se preincubaron con un antagonista de la generación de NO, Nw-Nitro-L-Arginine methyl ester (L-NAME, 10^{-4} mol/l) durante 30 min antes de realizar el experimento. Los neutrófilos incubados con L-NAME se lavaron antes de añadirse a las plaquetas, de tal forma que sólo los neutrófilos estuvieron en presencia de L-NAME. También se realizaron experimentos añadiendo directamente a la suspensión de neutrófilos y plaquetas un captador de NO, 2- (4-carboxyphenyl)-4,4,5,5 tetramethylimidazoline 1-oxyl 3-oxide (C-PTIO, 3×10^{-5} mol/l) y otros experimentos en los que se añadió un dador exógeno de NO, nitroprusiato sódico (10^{-4} mol/l) sobre las muestras de plasma rico en plaquetas para estudiar el efecto del NO.

Para estandarizar los resultados, sólo los valores de turbidimetría obtenidos a los 5 minutos se usaron para los cálculos. Este tiempo corresponde al valor máximo de la primera onda de agregación plaquetaria.

Medida de GMPc

Se midió el GMPc de los neutrófilos en las mismas condiciones que la agregación. De forma resumida, después de realizar los experimentos de agregación se recogieron las muestras a 4 °C y se centrifugaron para

separar las células del plasma a 2.500 rpm durante 15 min a 4 °C. Después, se aspiraron los sobrenadantes y las células que quedaban en el pellet se extrajeron con una mezcla de etanol y HCl 0,1 mol/l en una relación (49:1) (v/v) a 4 °C. Los extractos se evaporaron en un evaporador de vacío (Model VR-1/120/240, Heto Lab-Equipment A/S, Dinamarca). Las concentraciones de GMPc se midieron en muestras acetiladas utilizando un *kit* de radioinmunoensayo (Amersham, Buckinghamshire, UK) como ya se describió anteriormente¹⁵. La variabilidad intra e interensayo fue < 8,9 y < 16%, respectivamente.

Medida de factor transformante del crecimiento- β

El TGF- β liberado por las plaquetas se determinó en muestras de plasma rico en plaquetas obtenidas después de realizar los experimentos de agregación. Tras realizar los experimentos de agregación, las muestras se recogieron y se centrifugaron a 2.500 rpm durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes se guardaron a -80 °C hasta su medida.

Las concentraciones de TGF- β se midieron en estos sobrenadantes mediante un *kit* de enzoinmunoensayo (Promega, Madison, WI). Previamente, el TGF- β se transformó en su forma activa mediante acidificación. La variabilidad intra e interensayo del *kit* fue de 4,5% y 19,1%, respectivamente.

Métodos estadísticos

Los resultados se expresaron como media $\pm$ EEM. Para determinar la significación estadística de nuestros resultados, se utilizó el análisis de variancia (ANOVA) con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples o el test de la t de Student apareado o no apareado. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Producción de NO por los neutrófilos: efecto sobre la agregación de las plaquetas

Se determinó la capacidad de generar NO por los neutrófilos mediante la acumulación de [3 H]-L-citrulina en los neutrófilos marcados con [3 H]-L-arginina. Tras el tratamiento con triflusal, la generación de [3 H]-L-citrulina por los neutrófilos aumentó de forma significativa (fig. 1). La producción de [3 H]-L-citrulina por los neutrófilos fue inhibida con el antagonista de la L-arginina, L-NAME (10^{-4} mol/l) un $87 \pm 8\%$ antes y después del tratamiento con triflusal.

Como se observa en la figura 2, el ADP (10^{-5} mol/l) estimula de forma significativa la agregación de las plaquetas (porcentaje de transmisión de luz: 65 ± 3).

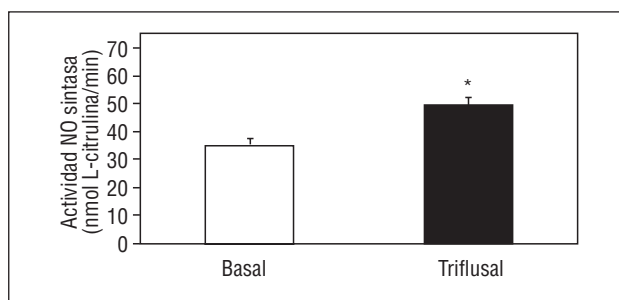


Fig. 1. Gráfico en la que se observa la síntesis de óxido nítrico medida como formación de [^3H]-L-citrulina a partir de [^3H]-L-arginina como se describe en la sección «Material y métodos». Los neutrófilos se extrajeron antes (basal) y después del tratamiento con triflusal (triflusal) durante cinco días (600 mg/día). Los resultados se presentan como media $\pm$ EEM. * $p < 0,05$ con respecto a los neutrófilos obtenidos antes del tratamiento con triflusal.

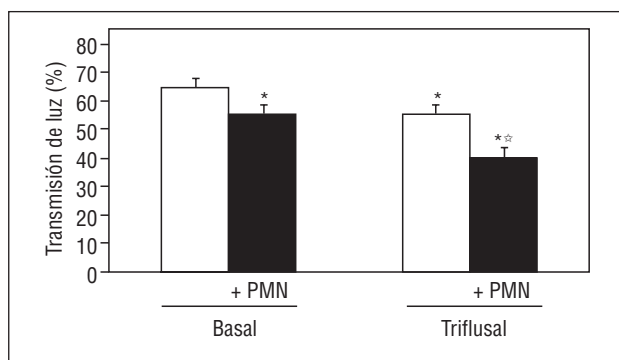


Fig. 2. Gráfico en el que se observa el efecto del triflusal sobre la activación plaquetaria inducida por ADP (10^{-5} mol/l) en presencia o ausencia de neutrófilos (PMN). La activación plaquetaria se muestra como porcentaje de transmisión de luz 5 min después de la adición de ADP. Los resultados se expresan como media $\pm$ EEM. * $p < 0,05$ con respecto al porcentaje transmisión de luz en ausencia de triflusal; ☆ $p < 0,05$ con respecto a la transmisión de luz respecto a su correspondiente basal.

Antes de la administración de triflusal, los neutrófilos ejercieron un pequeño efecto inhibitorio sobre la agregación inducida por ADP (fig. 2). Después de 5 días de tratamiento con triflusal se observó inhibición de la agregación de las plaquetas (fig 2). Este efecto fue significativamente potenciado por la presencia de neutrófilos (fig 2).

Los neutrófilos incubados con L-NAME (10^{-4} mol/l) no demostraron capacidad de inhibir la agregación de las plaquetas ni antes ni después del tratamiento con triflusal (porcentaje de transmisión de luz en presencia de neutrófilos incubados con L-NAME: – triflusal: 64 ± 3 , + triflusal: 63 ± 3 ; $p = \text{NS}$). Resultados similares se obtuvieron en presencia del captador de NO, C-PTIO (datos no expuestos).

Por otro lado, un dador exógeno de NO, el nitroprusiato sódico (10^{-4} mol/l), inhibió de forma significativa la agregación de las plaquetas en respuesta en ADP (fig. 3).

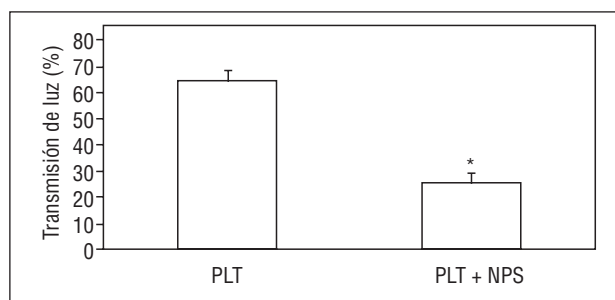


Fig. 3. Gráfico en el que se observa el efecto del nitroprusiato sódico (10^{-4} mol/l) sobre la activación plaquetaria inducida por ADP (10^{-5} mol/l). La activación plaquetaria se presenta como porcentaje de transmisión de luz 5 min después de la adición de ADP. Los resultados se presentan como media $\pm$ EEM de 6 diferentes experimentos. * $p < 0,05$ con respecto al porcentaje de transmisión de la luz en plasma rico en plaquetas en ausencia de nitroprusiato sódico.

Se determinó el contenido de GMPc de las plaquetas activadas con ADP (tabla 1). En ausencia de neutrófilos, el valor basal de GMPc en las plaquetas fue de $7,7 \pm 0,5$ pmol. El tratamiento con triflusal incrementó el contenido de GMPc siendo este incremento mayor en presencia de neutrófilos (porcentaje de incremento en el contenido de GMPc, después del tratamiento con triflusal: plaquetas: 20 ± 1 , plaquetas + neutrófilos: 40 ± 3 ; $p < 0,05$). El aumento en el contenido de GMPc se revirtió por completo (tabla 1) incubando los neutrófilos con L-NAME (10^{-4} mol/l) o en presencia del captador de NO, C-PTIO (3×10^{-5} mol/l).

Liberación de TGF- β en plasma rico en plaquetas

Los resultados obtenidos demostraron que antes del tratamiento con triflusal no había diferencias significativas en el TGF- β liberado por las plaquetas en presencia o ausencia de neutrófilos. La administración de triflusal durante cinco días no modificó la capacidad de las plaquetas de liberar TGF- β en respuesta al ADP (fig. 4). Sin embargo, tras el tratamiento con triflusal la presencia de neutrófilos redujo de forma significativa la liberación de TGF- β (fig. 4). Para analizar si el NO desempeñaba algún papel en el efecto de los neutrófilos sobre la liberación de TGF- β , los neutrófilos se incubaron con L-NAME (10^{-4} mol/l). El L-NAME no modificó la inhibición de los neutrófilos sobre la liberación de TGF- β por las plaquetas tras el tratamiento con triflusal (liberación de TGF- β en presencia de neutrófilos incubados con L-NAME: antes de tomar triflusal: 402 ± 23 ng/ml, después del tratamiento con triflusal: 342 ± 17 ng/ml; $p = \text{NS}$).

Finalmente, para comprobar el papel del óxido nítrico en el efecto de los neutrófilos sobre la secreción plaquetaria tras el tratamiento con triflusal se realizan experimentos adicionales con el dador de NO, nitroprusiato sódico (10^{-4} mol/l). Como se expone en la figura 5, la liberación de TGF- β por las plaquetas acti-

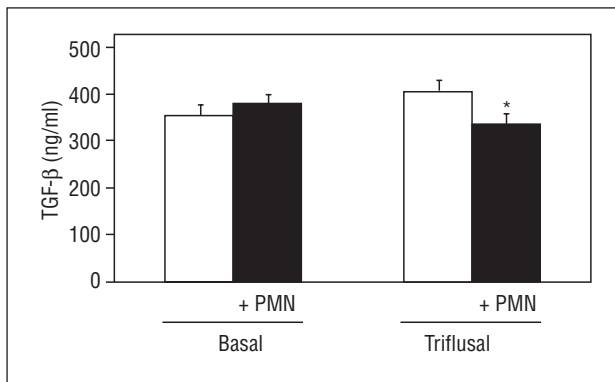


Fig. 4. Gráfico en el que se aprecian los valores de factor transformante de crecimiento- β (TGF- β) por plaquetas activadas con ADP en presencia o ausencia de neutrófilos (PMN). Los resultados se presentan como media $\pm$ EEM. * $p < 0,05$ con respecto a los valores de TGF- β obtenidos con plaquetas activadas antes del tratamiento con triflusal.

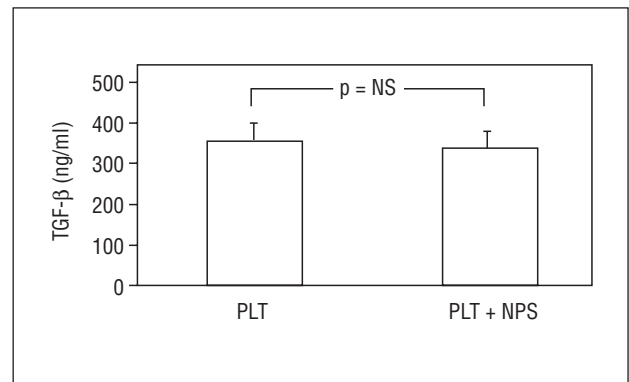


Fig. 5. Gráfico que demuestra los efectos del nitroprusiato sódico sobre la liberación de factor transformante del crecimiento-beta (TGF- β) por plaquetas activadas con ADP (10^{-5} mol/l). Los resultados se presentan como media $\pm$ EEM de 6 experimentos diferentes.

TABLA 1. Producción de GMPc (pmol) en la incubación de plaquetas con neutrófilos antes y después del tratamiento con triflusal

	Basal		Triflusal		Triflusal + L-NAME		Triflusal + C-PTIO	
	-PMN	+PMN	-PMN	+PMN	-PMN	+PMN	-PMN	+PMN
GMPc (pmol)	19 $\pm$ 3	24 $\pm$ 2*	18 $\pm$ 4	33 $\pm$ 7*	18 $\pm$ 2	15 $\pm$ 4	19 $\pm$ 4	16 $\pm$ 3

El papel del NO en el contenido de GMPc de la coincubación plaqueta-neutrófilos (PMN) se analizó incubando los neutrófilos con L-NAME (10^{-4} mol/l) o añadiendo al medio el captador de NO, C-PTIO (10^{-3} mol/l). Los resultados representan la media $\pm$ EEM de 12 experimentos diferentes. * $p < 0,05$ con respecto al experimento correspondiente en ausencia de neutrófilos (PMN).

vadas con ADP no se modificó en presencia o en ausencia del dador de NO, nitroprusiato sódico.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que en el efecto antiagregante plaquetario del triflusal están implicados los neutrófilos. En este trabajo se demuestra que, si bien los neutrófilos disminuyen por sí mismos la agregación plaquetaria, después de una dosis diaria de triflusal de 600 mg durante cinco días administrada a voluntarios sanos también se estimuló la capacidad de los neutrófilos de liberar NO inhibiendo la agregación plaquetaria en respuesta al ADP.

La homeostasis celular en la sangre incluye tanto interacciones homotípicas (plaqueta-plaqueta) como heterotípicas (la relación de las plaquetas con otras células)¹⁶. La capacidad del triflusal de inhibir las relaciones homotípicas (la agregación de las plaquetas) en respuesta a distintos agonistas como el ADP había sido previamente establecida¹⁷. No obstante, hoy día la agregación plaquetaria no puede considerarse una relación exclusivamente homotípica, ya que otras células como los neutrófilos intervienen en su regulación^{18,19}. En este sentido, De la Cruz et al¹¹ han demostrado que los leucocitos potencian el efecto antiagregante plaquetario del triflusal. Posteriormente, nuestro laboratorio demostró en un estudio *in vitro* en presencia de tri-

flusal que el efecto antiagregante plaquetario de los neutrófilos estaba mediado por el NO¹².

En la primera parte del estudio determinamos que el tratamiento con triflusal estimula la capacidad de los neutrófilos de producir NO. Este resultado confirmó los hallazgos anteriormente mencionados que se habían realizado en experimentos *in vitro*¹². Tras el tratamiento con triflusal los neutrófilos demostraron una mayor capacidad inhibidora de la agregación de las plaquetas. El mecanismo por el cual los neutrófilos ejercerían este efecto se relacionó con la liberación de NO, ya que cuando los neutrófilos fueron tratados con L-NAME se revirtió la inhibición de la agregación plaquetaria producida por los neutrófilos. Además, el aumento del contenido de GMPc en la coincubación plaqueta-neutrófilo tras el tratamiento con triflusal fue inhibido tanto por el captador de NO, CPTIO, como incubando los neutrófilos con L-NAME. Estos resultados apoyan la implicación del NO en el efecto antiagregante plaquetario de los neutrófilos tras el tratamiento con triflusal. Además, cuando se incubaron las plaquetas con un dador exógeno de NO, nitroprusiato sódico, éste inhibió la agregación de las plaquetas en respuesta al ADP confirmando que el NO es capaz de inhibir la agregación plaquetaria.

En un segundo grupo de experimentos se analizó el efecto del triflusal sobre la secreción de los gránulos alfa determinando los valores de TGF- β en las mues-

tras de plasma rico en plaquetas antes y después del tratamiento con triflusal.

El TGF- β se encuentra en los gránulos alfa y se secreta después de la activación plaquetaria²⁰⁻²². Por lo tanto, podemos correlacionar los valores de TGF- β en el sobrenadante de las plaquetas incubadas con ADP con la activación de la secreción de estos gránulos por las plaquetas.

Los estudios publicados, la mayoría de ellos realizados *in vitro*, habían demostrado que los inhibidores de la ciclooxigenasa no modificaban la capacidad de las plaquetas *per se*, para liberar TGF- β ¹⁶. En este sentido, Knight y Scrutton²³ han demostrado que plaquetas sometidas a un alto voltaje eléctrico secretan serotonina de forma independiente a la síntesis de los endoperóxidos de las prostaglandinas. Tras el tratamiento con triflusal, los neutrófilos redujeron significativamente la liberación de TGF- β . Sin embargo, a diferencia de los resultados observados en los experimentos de agregación, la inhibición de la producción de NO por los neutrófilos no modificó su efecto sobre la liberación de TGF- β por las plaquetas. La falta de implicación del NO sobre la desgranulación de las plaquetas fue, además, sugerida por el hecho de que un dador exógeno de NO, nitroprusiato sódico, no modificó la liberación de TGF- β por las plaquetas activadas con ADP.

Un aspecto interesante de estos resultados es la diferente regulación que los neutrófilos ejercen sobre la secreción y la agregación de las plaquetas, sugiriendo la independencia entre estos dos mecanismos de activación plaquetaria. En este sentido, Gerrard y White²⁴ han demostrado que puede incluso ocurrir la secreción plaquetaria en ausencia de agregación.

Durante la isquemia miocárdica existe una disminución de los valores de NO liberados por las células endoteliales²⁵. Se han hecho diferentes intentos de incrementar los valores de NO con el fin de atenuar el daño miocárdico. En modelos animales, la infusión de dadores orgánicos de NO o del sustrato de formación del mismo, la L-arginina, ha producido un efecto cardioprotector contra la isquemia^{26,27}. Por lo tanto, los fármacos capaces de incrementar la formación endógena de NO podrían tener efectos beneficiosos adicionales, en este caso de sus propiedades antitrombóticas.

En resumen, nuestro estudio demuestra que el tratamiento *in vivo* con triflusal (600 mg/día/5 días) estimula la producción de NO por los neutrófilos. Además, tras el tratamiento con triflusal los neutrófilos inhiben tanto la agregación como la secreción de las plaquetas. Mientras que el efecto antiagregante plaquetario demostrado por los neutrófilos fue dependiente del NO, la inhibición de la desgranulación de los gránulos- α fue independiente del NO. Finalmente, estos resultados demuestran cómo la desgranulación y la agregación de las plaquetas pueden estar reguladas por mecanismos celulares diferentes.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se ha realizado con una beca de la Fundación Uriach S.A. L. Sánchez de Miguel y M. Montón son becarias postdoctorales del Laboratorio de Investigación Cardiovascular. J.I Guerra es becario de la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz. Los autores desean agradecer la colaboración ofrecida por María Begoña Ibarra en el trabajo editorial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marcus AJ. Thrombosis and inflammation as multicellular processes: Pathophysiology significance of transcellular metabolism. *Blood* 1990; 76: 1903-1907.
2. Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 1993; 7: 516-522.
3. Vallés J, Santos MT, Aznar J, Osa A, Lago A, Cosin J et al. Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality: the effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation* 1998; 97: 350-355.
4. López-Farré A, Farré J, Sánchez de Miguel L, Romero J, Gómez J, Rico L et al. Thrombosis and coronary heart disease: neutrophils, nitric oxide and aspirin. *Rev Esp Cardiol* 1998; 51: 171-177.
5. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-141.
6. Hoffmann G, Gobel BO, Harbrecht U, Vette H, Dusing R. Platelet cAMP and cGMP in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1992; 5: 847-850.
7. Shirohani M, Yui Y, Kawai C. Restenosis after coronary angioplasty: pathogenesis of neointimal thickening initiated by endothelial loss. *Endothelium* 1993; 1: 5-22.
8. Francia E, Marín A, García-Rafanell J. Triflusal, an antithrombotic agent. *Drugs Future* 1978; 3: 225-228.
9. Rabasseda X, García-Rafanell J. Triflusal: platelet aggregation inhibition. *Drugs Today* 1993; 29: 1-34.
10. McNeely WL, Goa K. Triflusal. *Drugs* 1998; 55: 823-833.
11. De la Cruz JP, Pavia J, Bellido I, González MC, Sánchez de la Cuesta F. Platelet antiaggregatory effect of triflusal in human whole blood. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1988; 10: 273-277.
12. Sánchez de Miguel L, Casado S, Farré J, García-Durán M, Rico L, Montón M et al. Comparison of *in vitro* effects of triflusal and acetylsalicylic acid on nitric oxide synthesis by human neutrophils. *Eur J Clin Pharmacol* 1998; 343: 57-65.
13. López Farré A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Montón M, Casado S et al. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and ET-1. *Circulation* 1995; 91: 2080-2088.
14. López Farré A, Riesco A, Espinosa G, Cernadas MR, Álvarez V, Digiuni E et al. Effects of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation* 1993; 88: 1166-1171.
15. Riesco A, Caramelo C, Blum G, Montón M, Gallego MJ, Casado S et al. Nitric oxide generating system as an autocrine mechanism in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem J* 1993; 292: 791-796.
16. Rinder CS, Student LA, Bonan JL, Rinder HM, Smith BR. Aspirin does not inhibit adenosine diphosphate-induced platelet α -granule release. *Blood* 1993; 82: 505-512.

17. Albors M, de Castellarnau C, Vila L. Inhibition of thromboxane production and platelet function by triflusal in healthy volunteers. *Rev Farmacol Clin Exp* 1987; 4: 11-16.
18. Marcus AJ. Multicellular eicosanoid and other metabolic interactions of platelet and other cells. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, editores. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice* (3.^a ed.). Filadelfia: Lippincott, 1994; 590-602.
19. Bloom AL, Thomas DP (editores): *Haemostasis and thrombosis* (2.^a ed.). Edimburgo: Churchill Livingstone, 1987.
20. Border WA, Ruoslahti LR. Transforming growth factor- β in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 1992; 90: 1-7.
21. Niewiarowski S. Secreted platelet proteins. En: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, editores. *Haemostasis and thrombosis* (3.^a ed.). Vol. 1. Edimburgo: Churchill Livingstone, 1994; 167-181.
22. Holmsen H. Platelet secretion and energy metabolism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, editores. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice* (3.^a ed.). Filadelfia: Lippincott, 1994; 524-545.
23. Knight DE, Scrutton MC. Direct evidence for a role for Ca^{2+} in amine storage granule secretion by human platelets. *Thromb Res* 1980; 20: 437-442.
24. Gerrard JM, White JG. The influence of aspirin and indomethacin on the platelet contractile wave. *Am J Pathol* 1976; 82: 513-526.
25. Xin-Liang M, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res* 1993; 72: 403-412.
26. Weyrich AS, Xin-Liang M, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 1992; 86: 279-288.
27. Johnson G, Tsao PS, Lefer AM. Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion. *Crit Care Med* 1991; 19: 244-252.