

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 664**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/21** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2013 PCT/EP2013/061131**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13178715**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2013 E 13726197 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2877170**

54 Título: **Inducción de arteriogénesis con nitroglicerina**

30 Prioridad:

**31.05.2012 EP 12004187**

**31.05.2012 US 201261653595 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.11.2019**

73 Titular/es:

**G. POHL-BOSKAMP GMBH & CO. KG (100.0%)**

**Kieler Strasse 11**

**25551 Hohenlockstedt, DE**

72 Inventor/es:

**GORATH, MICHAELA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 731 664 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Inducción de arteriogénesis con nitroglicerina

- 5 La presente invención se refiere a la nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para usar en un método para tratar o prevenir una insuficiencia arterial, en la que la nitroglicerina se administra de forma lingual, sublingual, inhalativa, bucal, transmucosa u oromucosa en una forma intermitente en la inducción de arteriogénesis, caracterizada porque la nitroglicerina se administra al menos una vez al día y al menos un día a la semana durante al menos dos semanas.
- 10 Las enfermedades cardiovasculares, así como otras enfermedades que implican una insuficiencia cardiovascular y, más específicamente, la insuficiencia arterial afecta a una población creciente de pacientes, encabezan las estadísticas internacionales de mortalidad y morbilidad y tienen una enorme importancia económica. En Alemania, por ejemplo, alrededor de 280000 pacientes sufren cada año un infarto cardíaco, mientras que unos 65000 pacientes mueren.
- 15 Una razón importante para una enfermedad cardiovascular es la oclusión parcial o completa de los vasos arteriales que resulta en un suministro reducido de oxígeno y nutrientes del tejido suministrado por el vaso arterial.
- 20 La angina de pecho, el dolor torácico, es un síndrome clínico que refleja un suministro inadecuado de oxígeno para las demandas metabólicas miocárdicas con isquemia resultante y generalmente es provocada por obstrucción (estenosis), espasmo de las arterias coronarias, disfunción endotelial o microvascular.
- 25 La arteriogénesis es un proceso en el cual colaterales arteriolas pequeños ya existentes pueden desarrollar arterias de conductancia funcional completa que evitan el sitio de una oclusión arterial y/o compensan el flujo de sangre a los territorios isquémicos suministrados por la arteria insuficiente. En consecuencia, la arteriogénesis es un mecanismo endógeno altamente eficaz para el mantenimiento y la regeneración del flujo sanguíneo después de un evento oclusivo agudo o crónico en un vaso arterial. En este caso los colaterales pueden funcionar como desvíos naturales.
- 30 La arteriogénesis es un proceso distinto de la angiogénesis o neovascularización, donde se produce una formación de novo de los vasos arteriales (Buschmann I y Schaper W., *Journal of Pathology*, 2000, 190: 338-342).
- 35 El donante de óxido nítrico (NO) nitroglicerina (gliceril trinitrato) se utiliza desde décadas como agente vasodilatador en enfermedades cardiovasculares como enfermedad coronaria (CAD, también enfermedad cardíaca isquémica o enfermedad de las arterias coronarias), que es la principal causa de muerte y discapacidad en todo el mundo (McGrae McDermott M., *Journal of the American Medical Association*, 2007, 297 (11): 1253-1255). La nitroglicerina se ha utilizado únicamente para tratar los síntomas de estas enfermedades, por ejemplo, angina de pecho estable debido a su efecto vasodilatador en venas y arterias, lo que reduce la carga de trabajo y el consumo de energía del corazón (al disminuir la precarga y la poscarga) y aumenta el suministro de oxígeno al miocardio (al dilatar las arterias coronarias). Estos síntomas incluyen dolor en el pecho, presión, malestar o disnea. Sin embargo, la nitroglicerina no se ha utilizado para curar la enfermedad subyacente o mejorar su pronóstico.
- 40 En consecuencia, la nitroglicerina se ha utilizado y se usa principalmente para el alivio agudo o la profilaxis de los ataques de angina de pecho, el síntoma más común de la EAC (Fox K. et al., *Guidelines on the management of stable angina pectoris: full text. The Task Force on the Management of Stable Angina Pectoris of the European Society of Cardiology. European Heart Journal* doi:10.1093/eurheartj/ehl002; Gibbons R. J. et al., *ACC/AHA/ACP-ASIM Guidelines for the Management of Patients With Chronic Stable Angina. Journal of the American College of Cardiology*, 1999, 33 (7): 2092-2197.
- 45 En la técnica, se ha descrito que la nitroglicerina no es capaz de inducir angiogénesis (neovascularización) o arteriogénesis en un entorno donde esta sustancia se ha administrado de forma continua (Hopkins SP et al., *Journal of Vascular Surgery*, 1998, 27 (5): 886-894; Troidl K. et al., *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2010, 55 (2): 153-160).
- 50 Donantes de NO de acción prolongada que abarcan el grupo de diazeniumdiolates y diazeniumtriolates (también llamados NONOates) han sido implicados en la inducción y/o mejora de la formación de colaterales en el tratamiento de enfermedades arteriales mediante la administración de bombas de flujo continuo (Schaper W., DE 10 2008 005 484 A1).
- 55 Hay una necesidad de proporcionar agentes para promover la circulación colateral.
- 60 El documento DE 10 2008 005 484 A1 (Schaper W., 2009) se refiere a una administración continua de los NONOatos de donantes de NO, en particular a la administración de NONOato de dietilentriamina de acción prolongada (DETA NONOato).

Cui X. et al. (Neuroscience, 2009, 159: 744-750) describe la función de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y el DETA-NONOato donante de óxido nítrico (NO) en la arteriogénesis después del accidente cerebrovascular en ratones.

5 Kumar D. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, 105 (21): 7540-7545) se refiere a la inducción de angiogénesis y arteriogénesis en el contexto de la enfermedad de la arteria periférica y divulga que la terapia crónica de nitrito de sodio aumenta la angiogénesis inducida por isquemia y arteriogénesis y cambios agudos en el flujo sanguíneo del tejido isquémico.

10 ROTE LISTE 2004, Cantor Verlag, Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/Main (Hrsg.), Secciones 55001 a 55006, divulga diversas preparaciones de nitroglicerina y formas de dosificación para aplicaciones medicinales con respecto a varias indicaciones, particularmente con respecto a tratamiento, así como la profilaxis aguda a corto plazo del síntoma agudo más común de la enfermedad arterial coronaria, es decir, la angina de pecho. Entre las diversas preparaciones, una cápsula de liberación prolongada debe administrarse por vía oral de 2 a 3 veces al día y se  
15 considera su uso en el tratamiento sintomático continuo del flujo sanguíneo alterado de los vasos coronarios.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a la nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para usar en un método para tratar o prevenir una insuficiencia arterial, en la que la nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) se administra de forma intermitente a un sujeto en una cantidad efectiva para la inducción. de la arteriogénesis, en la que la nitroglicerina se  
20 administra de forma intermitente, lingual, sublingual, inhalativa, bucal, transmucosa u oromucosal en una cantidad efectiva para la inducción de la arteriogénesis, caracterizada porque la nitroglicerina se administra al menos una vez al día a la semana durante al menos dos semanas.

Se ha encontrado sorprendentemente que los donantes de NO son efectivos en la inducción de la arteriogénesis, incluso si no se administran constantemente, pero de una manera en que los niveles plasmáticos solo se elevan por un corto tiempo (consulte la sección de ejemplos). En consecuencia, se describen agentes efectivos para la promoción de la circulación colateral. Basado en el descubrimiento de que los donantes de NO son capaces de inducir arteriogénesis, la presente invención proporciona ahora una herramienta eficaz para prevenir y tratar una insuficiencia  
25 arterial.

De acuerdo con la presente invención, el término "tratamiento" o "prevención" significa que no solo se alivian los síntomas de la enfermedad, sino que también la enfermedad en sí se trata o se previene. En una realización preferida, el término "tratamiento" significa mejorar el pronóstico de dicha enfermedad.  
30

De acuerdo con la invención, el término "insuficiencia arterial" se refiere a cualquier suministro insuficiente de sangre u oxígeno o cualquier otro suministro insuficiente de un tejido que es proporcionado por una arteria. Este suministro insuficiente se puede superar mediante los métodos y usos de la presente invención en donde se usa nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para aumentar el suministro de un tejido dado. La insuficiencia arterial puede ocurrir tanto durante el reposo físico como durante un ejercicio.  
35

En una realización preferida de la presente invención, la insuficiencia arterial se debe a un suministro insuficiente de oxígeno o sangre de un tejido suministrado por la arteria o un bypass o derivación durante el reposo físico o el ejercicio.  
40

De acuerdo con una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial se debe a una mayor demanda de oxígeno o flujo sanguíneo de un tejido suministrado por la arteria o un bypass o derivación.  
45

Este aumento de la demanda de oxígeno o flujo sanguíneo puede tener varias razones, entre las que se incluyen el deporte o la actividad física, y el aumento de la actividad mental o una enfermedad que requiere una mayor demanda de oxígeno o flujo sanguíneo.  
50

De acuerdo con una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial se caracteriza por una oclusión parcial (estenosis) o completa de un vaso arterial. En el contexto de la presente invención, el término "oclusión parcial" es equivalente a una estenosis.  
55

La oclusión parcial o completa de un vaso arterial es un fenómeno bien conocido. Puede tener varias razones que incluyen, pero no se limitan a, la deposición de material en los vasos sanguíneos (incluidas las estenosis no revascularizables), la compresión del tejido o líquido externo al lado del vaso (incluida la alteración en la relajación diastólica del miocardio), espasmos vasculares, disfunción del endotelio del vaso, lo que resulta en una vasoconstricción paradójica durante el ejercicio o un deterioro microvascular debido a una disfunción endotelial o anomalías de las células del músculo liso.  
60

En una realización preferida, la insuficiencia arterial se debe a la deposición de material en los vasos sanguíneos.

La deposición de materiales en los vasos sanguíneos es un fenómeno bien conocido que resulta, por ejemplo, en la aterosclerosis.  
65

En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial se debe a una compresión externa o interna de una arteria.

5 La compresión interna de una arteria puede deberse a un edema, pero también a un tumor que ejerce presión sobre la arteria. Además, esto incluye una constricción vasoespástica de la arteria, por ejemplo, en la angina de Prinzmetal. Además, esto también incluye la vasoconstricción paradójica que, por ejemplo, a veces ocurre en una disfunción endotelial o en pequeños vasos arteriales constreñidos debido a una disfunción de las células endoteliales o de las células del músculo liso.

10 Una compresión externa puede deberse a un accidente o cualquier fuerza externa que pueda ejercer presión sobre una arteria.

15 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial es una enfermedad vascular.

De acuerdo con una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en aterosclerosis, una enfermedad isquémica y una enfermedad arterial crónica adicional.

20 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial coronaria.

En una realización preferida, la insuficiencia coronaria es una insuficiencia arterial coronaria aterosclerótica, en particular enfermedad arterial coronaria (enfermedad cardíaca coronaria o enfermedad cardíaca isquémica), angina de pecho estable, angina de pecho inestable, isquemia de miocardio o isquemia de miocardio crónica, síndrome coronario agudo, o infarto de miocardio (infarto de miocardio o infarto de miocardio isquémico).

25 En una realización preferida adicional, la insuficiencia coronaria es una enfermedad microvascular no aterosclerótica, en particular coronaria o enfermedad de pequeños vasos, angina de Prinzmetal y síndrome cardíaco X.

30 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial cerebral (intra o extracraneal).

35 En una realización preferida, la insuficiencia arterial cerebral es una insuficiencia arterial aterosclerótica, en particular isquemia cerebral, enfermedad de la arteria carótida extracraneal, enfermedad de la arteria vertebral extracraneal, previo al accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio (mini accidente cerebrovascular), accidente cerebrovascular, demencia vascular, enfermedad de cerebro isquémico o enfermedad cerebrovascular isquémica.

40 La insuficiencia arterial cerebral también puede ser una enfermedad cerebral microvascular isquémica, demencia vascular de vasos pequeños, encefalopatía arteriosclerótica subcortical (enfermedad de Binswanger), enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.

En una realización preferida, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial periférica.

45 En una realización preferida, la insuficiencia arterial periférica es una insuficiencia arterial periférica aterosclerótica, en particular enfermedad vascular periférica (enfermedad arterial periférica (PAD) o enfermedad oclusiva de la arteria periférica (PAOD), incluida la enfermedad arterial de las extremidades inferiores y superiores).

50 En una realización preferida, la insuficiencia arterial periférica es una insuficiencia arterial periférica no aterosclerótica, en particular el síndrome de Raynaud (vasoespasmático), la trombangitis obliterante, la endangitis obliterante o la enfermedad de Buerger (inflamación recurrente progresiva y trombosis (coagulación) de pequeñas y medianas arterias y venas) de las manos y los pies), enfermedad vascular inflamatoria (vasculitis), isquemia diabética, neuropatía diabética y síndromes compartimentales.

55 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial puede ser una insuficiencia arterial intestinal, en particular una insuficiencia arterial aterosclerótica, en particular enfermedad intestinal isquémica, isquemia mesentérica o infarto mesentérico.

60 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial puede ser una insuficiencia arterial urogenital, en particular una insuficiencia arterial urogenital aterosclerótica, en particular disfunción eréctil, enfermedad de la arteria renal, isquemia renal o infarto renal.

65 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial puede ser una insuficiencia arterial nerviosa, en particular tinnitus.

Además, la insuficiencia arterial puede estar en el contexto de la esclerodermia (esclerosis sistémica).

Además, la insuficiencia arterial puede estar en el contexto de la displasia fibromuscular.

En una realización preferida, la insuficiencia arterial es una insuficiencia de la arteria retiniana central, en particular una insuficiencia de la arteria retiniana aterosclerótica, en particular la insuficiencia arterial ocular.

5 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial se caracteriza por la ausencia de una disfunción endotelial.

10 La disfunción endotelial es un estado patológico sistémico bien conocido del endotelio y puede definirse ampliamente como un desequilibrio entre las sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras producidas o que actúan sobre el endotelio.

15 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial crónica. En el contexto de la presente invención, el término "insuficiencia arterial crónica" significa que el curso de la insuficiencia arterial es crónico y, a menudo, progresivo.

20 Según una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial crónica incluye disfunción endotelial, aterosclerosis, enfermedad coronaria (enfermedad coronaria o enfermedad cardíaca isquémica), angina de pecho estable, enfermedad microvascular coronaria o enfermedad de vasos pequeños, angina de Prinzmetal y síndrome cardíaco X, demencia vascular, enfermedad cerebral isquémica o enfermedad cerebrovascular isquémica, enfermedad cerebral microvascular isquémica, demencia vascular de vasos pequeños, encefalopatía aterosclerótica subcortical (enfermedad de Binswanger), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad vascular periférica (enfermedad arterial periférica (PAD) o enfermedad oclusiva de la arteria periférica (PAOD), trombangitis obliterans, endangitis obliterans o enfermedad de Buerger, enfermedad inflamatoria vascular (vasculitis), displasia fibromuscular, isquemia diabética, neuropatía diabética, enfermedad isquémica del intestino, disfunción eréctil, arteriopatía renal, tinnitus y escleroderma (esclerosis sistémica).

25 El término "donante de NO" se refiere tanto al propio óxido nítrico como a cualquier molécula que sea capaz de liberar NO después de haber sido administrada a un sujeto.

30 El donante NO es óxido nítrico, nitroprusiato de sodio, nitroglicerina (trinitrato de glicerilo), mononitrato de isosorbida, dinitrato de isosorbida, tetranitrato de pentaeritritol (PETN), molsidomin, nitrito de amilo o nicorandil.

Adicionalmente, los donantes de NO pueden seleccionarse de entre los siguientes:

35 Anorgánico:

óxido nítrico

40 nitrito

nitrato

Nitratos orgánicos:

45 GTN (trinitrato de glicerilo; nitroglicerina)

PETN (tetranitrato de pentaeritritol)

50 ISDN (dinitrato de isosorbida)

ISMN (mononitrato de isosorbida)

Nicorandil

55 Nitritos orgánicos:

IAN (nitrito de isoamilo; nitrito de amilo)

60 IBN (nitrito de isobutilo)

Compuestos N-Nitrosos:

N-Nitrosaminas:

65 Defostatina

NDMA

derivados de N-metil-N-nitrosourea

5 N-hidroxi-nitrosaminas:

Dopastina

Cupferron

10

Alanosina

N-nitrosiminas

15 N-diazeniumdiolatos (NONOato):

espermina NONOato

DEA-NONOato

20

DETA-NONOato

S-Nitrosotioles:

25 S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP)

S-nitrosoglutatión

Complejos de Metal NO:

30

Complejos de hierro:

Nitroprusiato (nitroprusiato de sodio)

35 Complejos de dinitrosil-hierro

Nitrosilos del grupo de azufre y hierro (como por ejemplo Sal roja de Roussin, Sal negra de Roussin, Ester rojo de Roussin)

40 Complejos de rutenio

Heterociclos que liberan NO:

N-óxidos heterocíclicos:

45

Furoxanos

Heterociclos mesoiónicos:

50 Sidnoniminas (como, por ejemplo, molsidomina, linsidomine (SIN-1), ciclosidomina, pirsidomina, marsidomina)

Oxatriazoles mesoiónicos

Guanidinas y N-hidroxiguanidinas:

55

L-arginina

L-homoarginina

60 N-hidroxi-L-arginina

N-hidroxi-L-homoarginina

Otro:

65

Compuestos alquil C-nitroso

## Compuestos Aril C-Nitroso

## Oximas

5

## N-hidroxiureas

El donante de NO es un nitrato orgánico con una estructura fundamental de glicerol.

10 El donante de NO se selecciona del grupo que consiste en nitroglicerina (gliceril trinitrato), glicerol-1,2-dinitrato (1,2-GDN) y glicerol-1,3-dinitrato (1,3-GDN), glicerol-1-nitrato (1-GMN) y glicerol-2-nitrato (2-GMN).

En el contexto de la presente invención, el donante de NO es nitroglicerina (trinitrato de glicerilo).

15 Preferiblemente, el donante de NO es un donante de NO de acción corta. El término "donante de NO de acción corta" se refiere al NO en sí mismo o a un donante de NO que libera NO en breve, con una vida media de vida corta menor que, por ejemplo, 45, 30 o preferiblemente 15 minutos, después de haber sido administrados a un sujeto. Ejemplos de donadores de NO de acción corta son nitroglicerina (gliceril trinitrato), nitrito de amilo y nitroprusiato de sodio.

20 Los donantes de NO de acción corta también pueden incluir donantes de NO que generalmente se consideran nitratos de acción prolongada, pero que pueden actuar como nitratos de acción corta dependientes de su forma de administración, dosificación y formulación (liberación estándar versus liberación sostenida o preparaciones de retardo). Dichos donantes de NO incluyen, entre otros, el dinitrato de isosorbida de nitrato orgánico (ISDN) que tiene una vida media variable de entre 15 y 35 hasta 60 minutos cuando se administra por vía oral o sublingual, por ejemplo, en forma de aerosol o como un comprimido. La vida media después de la administración oral es de aproximadamente 30 a 60 minutos a dosis bajas o aumenta a varias horas en el caso de preparaciones de liberación retardada o sostenida.

25 De acuerdo con lo anterior, un "donante de NO de acción corta" también se refiere a un donante de NO que libera NO con un tiempo de vida media de 60 minutos o menos después de haber sido administrado a un sujeto en una forma particular de administración, preferiblemente cuando Haber sido administrado a un sujeto bucal o sublingualmente.

30 En el contexto de la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que la administración de un donante de NO de acción corta es particularmente adecuada para promover la circulación colateral. Esto podría explicarse por la dilatación a corto plazo del vaso colateral inducida por los donantes de NO de acción corta que, a su vez, tiene un efecto significativamente mejorado en la arteriogénesis cuando se aplica repetitivamente. El efecto mejorado de los donantes de NO de acción corta en la formación de nuevos buques colaterales y, por lo tanto, en la promoción de la circulación colateral se ilustra en detalle en el Ejemplo 1 de la presente solicitud.

35 Por consiguiente, en una realización preferida de la invención, el donante de NO es un donante de acción corta.

40 La nitroglicerina es un ejemplo especialmente preferido de dicho donante de NO de acción corta.

45 De acuerdo con la invención, el donante de NO se administra en una cantidad capaz de inducir arteriogénesis. El experto apreciará que esta cantidad dependerá del sujeto al que se administra el donante de NO. En general, la cantidad a administrar puede estar entre 0.1 y 8 mg por día, pero esto puede variar debido al peso del sujeto, su respuesta hemodinámica al donante de NO y/o la gravedad de la enfermedad.

50 La cantidad de donante de NO que se administrará también puede estar entre 0.1 y 10 mg por día, o, alternativamente, entre 0.1 y 40 mg por día, dependiendo de la naturaleza del donante de NO y/o su forma de administración. Es decir, si el donante de NO está, por ejemplo, en forma de dinitrato de isosorbida de nitrato orgánico (ISDN), la cantidad a administrar puede estar entre 1 y 40 mg por día, preferiblemente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mg por día cuando se administra a un sujeto por vía oral o sublingual.

55 De acuerdo con lo anterior, el dinitrato de isosorbida (ISDN) es un ejemplo igualmente preferido de un donante de NO de acción corta.

60 En una realización preferida, la cantidad de donante de NO se aplica en una dosis de 0.2 hasta 0.8 mg (0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8) por lo menos 1 hasta 4 veces al día, dando como resultado un máximo Dosis diaria de 3,2 mg. Estas cifras se aplican especialmente en los casos en que el donante de NO es nitroglicerina.

65 El término "administración de un donante de NO" significa que se administra una dosis dada del donante de NO. Dependiendo de la forma de administración, el experto apreciará que la administración puede tomar algún tiempo. En una realización preferida, nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) se administra nitroglicerina en forma de un aerosol, solución pulverizable o inyectable, cápsula masticable, gas inhalable, aerosol o polvo inhalable, gránulos, polvo o un comprimido, preferiblemente un comprimido sublingual, bucal o masticable, lo que significa que la administración se puede completar en segundos.

Además, de acuerdo con la invención, la nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) se administra de una manera capaz de inducir arteriogénesis.

5 Como se muestra en los ejemplos, los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que una nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) es capaz de inducir arteriogénesis cuando se administra de manera intermitente.

10 El término "manera intermitente" significa que el donante de NO se administra de manera que sus niveles en plasma o tejido solo se elevan a corto plazo después de la administración del donante de NO, pero luego vuelven a disminuir. Esto se puede lograr, por ejemplo, si el donante de NO es un donante de NO de acción corta como se definió anteriormente y la administración del donante de NO de acción corta es seguida por un período de tiempo sin administración y luego el donante de NO se administra nuevamente al sujeto. Además, esta forma de administración evita que el sujeto desarrolle tolerancias contra el donante de NO y que el sujeto desarrolle disfunción endotelial.

15 La inducción de disfunción endotelial es un parámetro que tiene una importancia pronóstica en pacientes con enfermedad arterial coronaria. El desarrollo de tolerancias, así como la inducción de disfunción endotelial son desventajas bien conocidas provocadas por la exposición prolongada a donantes de NO (Uxa A. et al., Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2010, 56 (4): 354-359).

20 Además, la administración de un donante de NO de acción corta de manera intermitente tiene el efecto mejorado de que imita la situación fisiológica del organismo como, por ejemplo, comparable a la liberación endógena de NO en el entrenamiento físico. En otras palabras, el donante de NO de la presente invención actúa como un biomimético cuando se aplica de manera intermitente. Esto representa claramente una mejora con respecto a la técnica en la que hasta  
25 ahora solo se ha observado la inducción de arteriogénesis al administrar donantes de NO de acción prolongada por medio de una administración continua y, por lo tanto, no intermitente.

30 De acuerdo con lo anterior, el donante de NO es un donante de NO de acción corta que se administra de manera intermitente.

En una realización preferida, los niveles de plasma o tejido del donante de NO se elevan durante no más de 180, 120 o 60 minutos, o durante no más de 50, 40, 30, 15, 10 o 5 minutos.

35 Además, esto también implica que el donante de NO puede administrarse de manera crónica, es decir, sin tener en cuenta los desarrollos de la enfermedad que implican un tratamiento agudo con el donante de NO. Además, también implica que se puede establecer un plan de terapia sin tener en cuenta los desarrollos de la enfermedad que implican un tratamiento agudo con el donante de NO.

40 En el contexto de la presente invención, el donante de NO en la forma de nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) se administra, entre otros, para inducir la arteriogénesis. Esto implica que el donante de NO también puede administrarse en momentos o períodos de tiempo donde no hay necesidad de vasodilatación y dicho alivio de los síntomas como el alivio del dolor.

45 Esto contrasta con las aplicaciones anteriores en las que el donante de NO, por ejemplo, la nitroglicerina se ha utilizado para lograr un alivio o una prevención aguda (es decir, inmediata) de los síntomas de una enfermedad correspondiente. Estos síntomas, por ejemplo, incluyen dolor y/o disnea en el caso de una enfermedad cardiovascular, y el alivio o la prevención aguda de los síntomas se logró mediante la vasodilatación y el dolor resultante y/o el alivio de la disnea. Sin embargo, el propósito de la administración del donante de NO no fue, como se discutió anteriormente, el tratamiento de la enfermedad subyacente, porque era bien sabido que las enfermedades no se pueden tratar con vasodilatación o alivio del dolor.  
50

La identificación de un donante de NO como un agente pro-arteriogénico también hace posible que el donante de NO se administre en puntos temporales o periodos de tiempo donde no se necesita un alivio de síntomas como el alivio del dolor. En una realización preferida adicional, el donante de NO también se puede administrar en los casos en que  
55 no hay síntomas correspondientes como disnea o dolor o en los casos en que no se esperan tales síntomas.

60 En el contexto de la presente invención, el término "intermitentemente" también significa que el donante de NO, en la forma de nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) no se administra de forma continua, por ejemplo, mediante infusión intravenosa a largo plazo o con la ayuda de una bomba implantada. que constantemente entrega el donante NO al sujeto. Más bien, este término también significa que hay un intervalo entre dos administraciones del donante de NO, y que el donante de NO se administra varias veces, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12 o 16 veces al día.

65 Como apreciará el experto, una administración del donante de NO puede incluir una administración en una o más formas de dosificación, por ejemplo, comprimidos o cubos (bocanadas) en caso de un spray. Por ejemplo, una administración puede incluir la administración de dos comprimidos o de uno a tres centros (bocanadas).

En cuanto al calendario de administración, el experto apreciará que hay muchas maneras de lograr esta administración intermitente. Por ejemplo, es posible administrar el donante de NO al menos una vez al día y al menos un día a la semana durante al menos dos semanas. Sin embargo, es igualmente posible administrar el donante de NO solo durante una semana si el donante de NO se administra varias veces durante esta semana.

5 Preferiblemente, el donante de NO se administra una, dos o tres veces al día, en el que aún más preferido el período de tiempo entre dos administraciones del donante de NO es al menos 4 horas, en particular 8 horas, en particular al menos 10 horas o 12 horas.

10 Aunque es posible, no es necesario que los períodos de tiempo entre dos administraciones del donante de NO sean los mismos. Más bien, se prefiere que estos períodos de tiempo difieran, dependiendo del calendario de administración individual.

15 El donante de NO se administra al menos un día a la semana. Sin embargo, el donante de NO también se puede administrar en 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días a la semana. En una realización especialmente preferida, el donante de NO se administra al menos 3 o 4 días a la semana.

20 De acuerdo con la invención, es posible administrar el donante de NO durante un período de varias semanas o meses. Esto es particularmente preferido para inducir la arteriogénesis de manera eficiente, aunque también es posible una administración más corta de una o dos semanas.

25 El donante de NO se administra durante 2 a 8 semanas. Se prefiere igualmente administrar el donante de NO durante 3 a 6, 3 a 8, 3 a 10 o 4 a 8, 4 a 10 o 4 a 12 semanas. Estos números son solo ejemplos y pueden variar según el programa individual de la materia objeto.

El donante de NO se toma al menos una vez a la semana durante al menos 8 semanas, en particular durante al menos 12 semanas.

30 El donante de NO se toma no más de 6, 8 o 12 meses. Sin embargo, también es posible tomar el donante de NO durante 2, 3 o incluso más años. Además, también es posible que el donante de NO se administre durante décadas o incluso durante toda la vida del sujeto.

35 En el contexto de tales administraciones a largo plazo, se prefiere que el donante de NO se administre una o dos veces a la semana o al menos una o dos veces a la semana.

Se ha descrito anteriormente que una estimulación exógena de las fuerzas de cizallamiento pulsátiles en un individuo puede producir arteriogénesis. Además, se ha descrito cómo se pueden medir las fuerzas de corte pulsátiles (documento WO 2010/072416).

40 Por consiguiente, el donante de NO se administra junto con una estimulación exógena de las fuerzas de cizallamiento pulsátiles en la arteria.

45 Con respecto a dicha realización de la invención, el donante de NO debe administrarse de manera que sea activo en el cuerpo del sujeto cuando se aplica la estimulación exógena. En este contexto, activo significa que la liberación de NO aún no ha finalizado o que la liberación de NO del donante de NO todavía está presente y activa. Dependiendo del donante de NO específico que se use, el medio tiempo fisiológico en el sujeto y su formulación, el experto será capaz de determinar cuándo debe administrarse el donante de NO al sujeto para garantizar que esté activo luego del estímulo exógeno.

50 En el caso de la nitroglicerina, el medio tiempo y su persistencia en el cuerpo del sujeto se han estudiado intensamente, por ejemplo, después de la aplicación intravenosa o sublingual, donde hay 2 a 5 minutos en el plasma sanguíneo, ver, por ejemplo, Armstrong P. W. et al., *Circulation*, 1979, 59: 585-588 o Armstrong P. W. et al., *Circulation*, 1980, 62: 160-166.

55 En general, el medio tiempo de nitroglicerina en el plasma sanguíneo es de 2 a 5 minutos.

Debe entenderse que, en el contexto de la presente invención, el término "medio tiempo" se refiere a la vida media y/o al tiempo de vida media del donante NO en el cuerpo del sujeto, en particular en el plasma de sangre del sujeto.

60 El donante de NO se administra en el período de tiempo de 30 minutos antes del inicio de la estimulación exógena hasta 30 minutos después de la terminación de la estimulación exógena.

65 El donante de NO se administra en el período de tiempo de 15 minutos, preferiblemente 5 minutos, más preferiblemente 2 minutos antes de la estimulación exógena hasta 30, preferiblemente 15, más preferiblemente 5 minutos después del inicio de la estimulación exógena.

El donante de NO se administra una vez al día, cinco veces a la semana durante 6 semanas 2-5 minutos antes de la estimulación exógena.

5 La estimulación exógena de las fuerzas de cizallamiento pulsátiles se puede lograr de cualquier forma conocida. Esto incluye una estimulación con la ayuda de medicamentos como medicamentos que aumentan la presión arterial.

En una realización preferida, dicha estimulación se logra mediante ejercicio físico o la aplicación de una fuerza endógena al vaso arterial.

10 De acuerdo con la invención, el término "ejercicio físico" significa cualquier entrenamiento del sujeto, que incluye, entre otros, entrenamiento en salas de ejercicio, trote, caminata, marcha nórdica, natación, baile, ciclismo y senderismo. El experto apreciará que cualquier ejercicio será útil en el contexto de la invención, siempre que se realice junto con la administración del donante de NO. Preferiblemente, el término "ejercicio físico" no incluye movimientos de rutina sin supervisión ni prescripción, como caminar de forma casual o hacer tareas domésticas.

15 Como se discutió anteriormente, se ha encontrado en el contexto de la presente invención que la nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) es capaz de inducir arteriogénesis. Esto permite no solo el tratamiento de una enfermedad ya existente. Más bien, en el contexto de la presente invención, también es posible prevenir la enfermedad. En consecuencia, en una realización preferida de la presente invención, el método apunta a la prevención de dicha insuficiencia arterial.

20 Como se muestra en la sección de ejemplo, en el contexto de la presente invención, ha sido posible reducir el tamaño del infarto en caso de una oclusión ya existente. Además, ha sido posible reducir las arritmias en los sujetos. El método da como resultado una reducción del tamaño del infarto, en arritmias reducidas o en una disminución de la elevación del segmento ST.

25 En el contexto de la presente invención se administra nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) lingualmente, sublingualmente, inhalativamente, oralmente, por transmucosa u oromucosa.

30 En el caso de una administración lingual, sublingual u oromucosa, se prefiere que la nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) se administre con la ayuda de una solución en spray, pulverizable o inyectable, una cápsula masticable o en forma de comprimido, preferiblemente un comprimido sublingual, bucal o masticable, polvo o gránulos o incluso mediante un dispositivo inhalador, desde el cual la nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) se puede inhalar y adsorber fácilmente. Se prefiere igualmente que la nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) se administre en forma de un gas, aerosol o polvo inhalable.

35 La administración del donante de NO es una administración no tópica, es decir, que el donante de NO no se administra a la piel del sujeto. En el contexto de la presente invención, el término "piel" excluye las membranas mucosas del sujeto.

40 El donante de NO puede formularse de cualquier manera adecuada para los modos de administración mencionados anteriormente. Dichas formulaciones son conocidas por los expertos en la materia e incluyen la formulación en tampones adecuados, en forma de gas, aerosol, en forma de comprimidos, polvo o gránulos.

45 En una realización preferida, el donante de NO se formula de una manera que permite una liberación rápida del donante de NO de la formulación. Esto incluye, por ejemplo, formulaciones que no retienen al donante de NO por un período de tiempo más largo, pero que liberan al donante de NO dentro de, por ejemplo, 45, 30 o 15, 10, 5 minutos o 1 minuto.

50 A través de la invención, se prefiere que el sujeto al que se aplica nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) sea un sujeto humano.

55 En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para uso en un método para la prevención o el tratamiento de una insuficiencia arterial, en el que la nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) se administra en una cantidad y de manera eficaz para la inducción de arteriogénesis.

60 Todas las características y realizaciones preferidas discutidas anteriormente para el método de tratamiento o prevención de una insuficiencia arterial también se aplican a la nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para su uso de acuerdo con este aspecto de la invención.

65 En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método de supresión de los efectos negativos asociados con cualquier tratamiento de una insuficiencia arterial que es antiarteriogénica o que inhibe la arteriogénesis, que comprende administrar a un sujeto sometido a dicho tratamiento de nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) en una cantidad y de manera eficaz para la inducción de la arteriogénesis.

En una realización preferida, dicho tratamiento es un ácido acetilsalicílico (ASA), antagonistas IIb/IIIa de la glucoproteína o un tratamiento con etanercept (receptor alfa del factor de necrosis tumoral soluble).

5 Se sabe en la técnica que el ASA es un inhibidor de la arteriogénesis (Singer E. et al., Vasa, 2006, 35 (3): 174-177). En consecuencia, el tratamiento ASA de las enfermedades cardiovasculares, aunque es una terapia estándar, tiene importantes efectos secundarios y desventajas. En el contexto de la presente invención, se ha encontrado que nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) son capaces de superar los efectos genitivos asociados con un tratamiento de ASA (ver sección de ejemplo). Sobre la base de estos hallazgos, los inventores concluyen que también los efectos secundarios negativos asociados con otros medicamentos como los antagonistas de la glucoproteína IIIII o el tratamiento con etanercept también pueden disminuir.

10 Además, la presente invención también se refiere a una nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para su uso en un método de supresión de efectos negativos asociados con cualquier tratamiento de una insuficiencia arterial que sea antiarteriogénica o que inhiba la arteriogénesis, en el que la nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) se administra a un sujeto sometido a Dicho tratamiento en una cantidad y manera efectiva para la inducción de la arteriogénesis.

15 En una realización preferida, dicho tratamiento es un ácido acetilsalicílico (ASA), antagonistas IIb/IIIa de glucoproteína o tratamiento con etanercept (receptor de factor de necrosis tumoral soluble alfa).

20 Todas las características y realizaciones preferidas discutidas anteriormente para el método de tratamiento o prevención de una insuficiencia arterial también se aplican al método para la supresión de efectos negativos según este aspecto de la invención o a dicha nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para uso de acuerdo con este aspecto de la invención.

25 En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de una arritmia cardíaca, en el que se administra un donante de NO a un sujeto en una cantidad y de manera eficaz para el tratamiento de dicha arritmia cardíaca. Además, la presente invención también se refiere a un donante de NO para su uso en un método para la prevención o tratamiento de una arritmia cardíaca, en el que el donante de NO se administra a un sujeto en una cantidad y de manera efectiva para el tratamiento de dicha arritmia cardíaca.

30 Los inventores han encontrado que los donantes de NO son capaces de prevenir y tratar las arritmias (ver la sección de ejemplos).

35 Todas las características y realizaciones definidas anteriormente con respecto al donante de NO y su formulación y administración también se aplican a este método o NO o donante para uso como se indicó anteriormente.

40 La presente invención también se refiere a un método para promover la circulación colateral que comprende la etapa de exponer a un sujeto a una cantidad terapéuticamente eficaz de un donante de NO en el que la cantidad terapéuticamente eficaz del donante de NO promueve la arteriogénesis suficiente para aumentar la circulación colateral en una condición fisiológica o patológica.

45 El término circulación colateral describe la circulación de la sangre a través de los llamados vasos colaterales. Estos vasos son pequeñas arteriolas, que forman parte de una red que interconecta territorios de perfusión de ramas arteriales. En el caso de que la arteria principal en sí misma no sea capaz de suministrar suficiente tejido, por ejemplo, debido a una oclusión arterial, estos vasos colaterales se reclutan y pueden desarrollarse en grandes arterias de conductancia, para evitar el sitio de una oclusión arterial y/o para compensar el flujo de sangre a los territorios isquémicos suministrados por la arteria o insuficiencia. En el contexto de la presente invención, la promoción de la circulación colateral se produce a través de la arteriogénesis.

50 Según la invención, el término "afección fisiológica" denota cualquier afección del sujeto que no esté relacionada con ninguna enfermedad.

55 De acuerdo con la invención, el término "condición patológica" denota cualquier condición del sujeto que está relacionada con una enfermedad.

Preferiblemente, el sujeto padece una insuficiencia arterial.

60 Todas las características y realizaciones preferidas discutidas anteriormente para el método de tratamiento o prevención de una insuficiencia arterial también se aplican al método de promover la circulación colateral.

Con respecto a los aspectos definidos anteriormente en los que la nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) se administra de una manera suficiente para inducir la arteriogénesis, esta manera es preferiblemente una manera intermitente como se definió anteriormente.

65 La invención se describe adicionalmente mediante las figuras y ejemplos adjuntos, que pretenden ilustrar, pero no limitar la invención.

Breve descripción de las figuras

5 Figura 1: Curso de la elevación del segmento ST por latido después de la FPO (= oclusión final para inducir infarto) de grupos de control de 5 y 10 días. El gráfico de ECG en gris medio indica 5 DÍAS RIP PBS, n = 8:  $0.104 \pm 0.016$  mV; El gráfico de ECG en negro indica 5 DÍAS SIMULADO PBS, n = 8:  $0.134 \pm 0.034$  mV; El gráfico de ECG en gris claro indica 10 DÍAS RIP PBS, n = 7:  $0.055 \pm 0.033$  mV; El gráfico de ECG en gris oscuro indica 10 DÍAS SIMULADO PBS, n = 7:  $0.124 \pm 0.039$  mV. El ECG se registró 90 minutos después de la FPO. El curso de la elevación del segmento ST por latido en los primeros 1200 latidos no reveló diferencias entre los grupos simulados de 5 y 10 días y el grupo RIP de 5 días. Solo en el grupo RIP de 10 días se observó una elevación más baja del segmento ST.

15 Figura 2: Elevación del segmento ST de grupos de control de 5 y 10 días. La columna 1 muestra la elevación del segmento ST del grupo 5 DÍAS SIMULADO PBS; la columna 2 muestra la elevación del segmento ST del grupo RIP PBS de 5 DÍAS; la columna 3 muestra la elevación del segmento ST del grupo 10 DÍAS SIMULADO PBS; la columna 4 muestra la elevación del segmento ST del grupo RIP PBS de 10 DÍAS; la desviación estándar se indica en barras de error; el asterisco indica significativo en comparación con 10 DÍAS SIMULADO PBS (valor nominal de  $p < 0.025$ ); el doble asterisco indica significativo en comparación con 5 DÍAS RIP PBS (valor  $p$  nominal  $< 0.025$ ).

20 El diagrama muestra la media de la elevación máxima del segmento ST por grupo. Después de 5 días no se encontraron diferencias significativas entre RIP y SHAM. Después de 10 días en el grupo RIP, la elevación del segmento ST fue significativamente menor en comparación con la simulación (\*) y el control RIP a 5 días (\*\*) (\*, \*\* valor  $p$  nominal  $< 0.025$ ).

25 Figura 3: Curso de la elevación del segmento ST por latido después de FPO (módulo 1: operación simulada sin el RIP). El gráfico de ECG en negro indica 5 DÍAS SIMULADO PBS, n = 8:  $0.134 \pm 0.034$  mV; El gráfico de ECG en gris claro indica 5 DÍAS SIMULADO NTG, n = 7:  $0.124 \pm 0.058$  mV; El gráfico de ECG en gris medio indica 5 DÍAS SIMULADO NTG-PLACEBO, n = 6:  $0.131 \pm 0.043$  mV.

30 El curso de la elevación del segmento ST por latido después de la FPO no reveló diferencias entre los grupos de control simulado y los grupos tratados después de 5 días.

35 Figura 4: elevación del segmento ST (módulo 1: operación simulada sin el RIP). La columna 1 muestra 5 DÍAS SIMULADO PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS SIMULADO NTG-Placebo; la columna 3 muestra 5 DÍAS SIMULADO NTG; La desviación estándar se indica mediante barras de error.

El diagrama muestra la media de la elevación máxima del segmento ST por grupo. No se encontraron diferencias en la elevación máxima del segmento ST entre el control simulado y los grupos tratados.

40 Figura 5: Curso de la elevación del segmento ST por latido después de FPO (módulo 2: NO intermitente (NTG)). El gráfico de ECG en gris claro indica RIP PBS a 5 DÍAS, n = 8:  $0.104 \pm 0.016$  mV; El gráfico de ECG en gris medio indica 5 DÍAS NTG-PLACEBO, n = 6:  $0.096 \pm 0.061$  mV; El gráfico de ECG en negro indica 5 DÍAS RIP NTG, n = 7:  $0.052 \pm 0.030$  mV. En comparación con el tratamiento de control con PBS o NTG-Placebo, se detectó un curso de elevación del segmento ST más bajo después del tratamiento con NTG 5 días después del RIP.

45 En el grupo NTG ("5 DÍAS RIP NTG"), la elevación del segmento ST disminuye significativamente en comparación con el grupo PBS y NTG-Placebo. No hay significancia entre el grupo PBS y NTG-PLACEBO.

50 Figura 6: Elevación del segmento ST (módulo 2: NO intermitente (NTG)). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS NTG-PLACEBO; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG; la desviación estándar se indica mediante barras de error, el asterisco indica una disminución significativa de la elevación del segmento ST en comparación con el grupo PBS y NTG-Placebo (valor de  $p$  nominal  $< 0.017$ ).

55 El diagrama muestra la media de la elevación máxima del segmento ST por grupo. Después del tratamiento con NTG, el máximo de elevación del segmento ST se redujo significativamente en comparación con el tratamiento con PBS y NTG-Placebo 5 días después del RIP (\* valor nominal de  $p < 0.017$ ).

60 Figura 7: Curso de la elevación del segmento ST por tiempo después de FPO (módulo 3: NO continuo (retardo de ISDN)). El gráfico de ECG en gris claro indica RIP PBS a 5 DÍAS, n = 8:  $0.104 \pm 0.016$  mV; El gráfico de ECG en gris medio indica 5 DÍAS ISDN-PLACEBO, n = 7:  $0.110 \pm 0.069$  mV; El gráfico de ECG en negro indica ISDN RIP DE 5 DÍAS, n = 7:  $0.062 \pm 0.027$  mV. En comparación con el tratamiento de control con PBS o ISDN-Placebo, se detectó un curso de elevación del segmento ST inferior después del tratamiento con ISDN 5 días después del RIP.

65 La elevación del segmento ST en el grupo ISDN ("5 DÍAS RIP ISDN") disminuye en comparación con el grupo PBS, pero no tiene importancia, así como entre el grupo PBS y el grupo ISDN-PLACEBO.

Figura 8: elevación del segmento ST (módulo 3: NO continuo (retardo ISDN)). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP ISDN-PLACEBO; la columna 3 muestra 5 días de RIP ISDN; La desviación estándar se indica mediante barras de error.

5 El diagrama muestra la media de la elevación máxima del segmento ST por grupo. Después del tratamiento con ISDN, el máximo de elevación del segmento ST no se redujo significativamente en comparación con el tratamiento con PBS y ISDN-Placebo 5 días después del RIP.

Figura 9: Curso de la elevación del segmento ST por tiempo después de FPO (módulo 4: NO intermitente más ASA). El gráfico de ECG en gris claro indica 5 DÍAS RIP PBS, n = 8:  $0.104 \pm 0.016$  mV; El gráfico de ECG en gris medio indica 5 DÍAS RIP ASA + PBS, n = 7:  $0.138 \pm 0.098$  mV; El gráfico de ECG en gris oscuro indica 5 DÍAS RIP ASA + NTG-PLACEBO, n = 6:  $0.144 \pm 0.091$  mV; El gráfico de ECG en negro indica 5 DÍAS RIP NTG + ASA, n = 7:  $0.088 \pm 0.071$  mV.

10 El gráfico de ECG en gris claro indica 5 DÍAS RIP PBS, n = 8:  $0.104 \pm 0.016$  mV; El gráfico de ECG en gris medio indica 5 DÍAS RIP ASA + PBS, n = 7:  $0.138 \pm 0.098$  mV; El gráfico de ECG en gris oscuro indica 5 DÍAS RIP ASA + NTG-PLACEBO, n = 6:  $0.144 \pm 0.091$  mV; El gráfico de ECG en negro indica 5 DÍAS RIP NTG + ASA, n = 7:  $0.088 \pm 0.071$  mV.

15 El tratamiento con NTG+ASA se comparó con PBS+ASA, NTG-Placebo+ASA y PBS. En general, todas las curvas se superponen en el mismo rango.

La elevación del segmento ST en el grupo tratado con PBS y ASA es mayor en comparación con el grupo de control de PBS, pero no tiene importancia, así como entre el grupo ASA+NTG-PLACEBO. En el grupo ASA+NTG, la elevación del segmento ST disminuye en comparación con el grupo tratado con ASA y PBS.

20 La elevación del segmento ST en el grupo tratado con PBS y ASA es mayor en comparación con el grupo de control de PBS, pero no tiene importancia, así como entre el grupo ASA+NTG-PLACEBO. En el grupo ASA+NTG, la elevación del segmento ST disminuye en comparación con el grupo tratado con ASA y PBS.

Figura 10: elevación del segmento ST (módulo 4: NO intermitente más ASA). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP PBS+ASA; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO; la columna 4 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO+ASA; la columna 5 muestra 5 DÍAS RIP NTG; la columna 6 muestra 5 DÍAS RIP NTG+ASA; la desviación estándar se indica mediante barras de error.

25 Figura 10: elevación del segmento ST (módulo 4: NO intermitente más ASA). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP PBS+ASA; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO; la columna 4 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO+ASA; la columna 5 muestra 5 DÍAS RIP NTG; la columna 6 muestra 5 DÍAS RIP NTG+ASA; la desviación estándar se indica mediante barras de error.

El diagrama muestra la media de la elevación máxima del segmento ST por grupo. El tratamiento con NTG+ASA se comparó con PBS + ASA, NTG-Placebo + ASA y PBS. Además, todos los grupos de ASA (PBS+ASA, NTG-Placebo+ASA, NTG+ASA) se compararon con sus controles (PBS, NTG-Placebo, NTG). No se detectaron diferencias significativas.

30 El diagrama muestra la media de la elevación máxima del segmento ST por grupo. El tratamiento con NTG+ASA se comparó con PBS + ASA, NTG-Placebo + ASA y PBS. Además, todos los grupos de ASA (PBS+ASA, NTG-Placebo+ASA, NTG+ASA) se compararon con sus controles (PBS, NTG-Placebo, NTG). No se detectaron diferencias significativas.

Figura 11: Arritmias durante FPO (módulo 1: Operación simulada (sin RIP)). Los números de columnas se dan en orden consecutivo de las columnas en el grupo IVb. La columna 1 muestra 5 DÍAS SIMULADO PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS SIMULADO NTG-PLACEBO; La columna 3 muestra 5 DÍAS SIMULADO NTG.

35 Figura 11: Arritmias durante FPO (módulo 1: Operación simulada (sin RIP)). Los números de columnas se dan en orden consecutivo de las columnas en el grupo IVb. La columna 1 muestra 5 DÍAS SIMULADO PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS SIMULADO NTG-PLACEBO; La columna 3 muestra 5 DÍAS SIMULADO NTG.

De acuerdo con la clasificación de Lown, todos los grupos simulados se escalaron predominantemente al grado IVb.

En el grupo "5 DÍAS SIMULADO PBS", el 87.5 % de las ratas tienen arritmias clase IVb y el 12.5% clase IVa. En el grupo "5 DÍAS SIMULADO NTG-PLACEBO", el 83.3% tiene arritmias IVb y el 16.7% de clase IVa y en el grupo "5 DÍAS SIMULADO NTG" el 85.7% tiene arritmias IVb y el 14.3% de arritmias clase IIIa.

40 En el grupo "5 DÍAS SIMULADO PBS", el 87.5 % de las ratas tienen arritmias clase IVb y el 12.5% clase IVa. En el grupo "5 DÍAS SIMULADO NTG-PLACEBO", el 83.3% tiene arritmias IVb y el 16.7% de clase IVa y en el grupo "5 DÍAS SIMULADO NTG" el 85.7% tiene arritmias IVb y el 14.3% de arritmias clase IIIa.

Figura 12: Arritmias durante la FPO (módulo 2: NO intermitente (NTG)). Los números de columnas se dan en orden consecutivo de las columnas en el grupo IVb. La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO; La columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG.

45 Figura 12: Arritmias durante la FPO (módulo 2: NO intermitente (NTG)). Los números de columnas se dan en orden consecutivo de las columnas en el grupo IVb. La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO; La columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG.

Mientras que las arritmias en ambos grupos de control, PBS y NTG-Placebo, se escalaron predominantemente en el grado IVb, el grupo tratado con NTG fue más a menudo escalado en el grado 0.

En el grupo "5 DÍAS RIP PBS", el 75.0% de las ratas tienen arritmias clase IVb, 12.5% IVa y 12.5% clase 0.

50 En el grupo "5 DÍAS RIP PBS", el 75.0% de las ratas tienen arritmias clase IVb, 12.5% IVa y 12.5% clase 0.

Con respecto al grupo "5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO", el 50,0% de las ratas presentaron arritmias clase IVb, 16.7% IVa, 16.7% clase IIIb y 16.7% clase 0 arritmias. Curiosamente, el grupo "5 DÍAS RIP NTG" muestra un 42.9% de arritmias de clase IVb y un 57.1% de arritmias de clase 0.

55 Con respecto al grupo "5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO", el 50,0% de las ratas presentaron arritmias clase IVb, 16.7% IVa, 16.7% clase IIIb y 16.7% clase 0 arritmias. Curiosamente, el grupo "5 DÍAS RIP NTG" muestra un 42.9% de arritmias de clase IVb y un 57.1% de arritmias de clase 0.

Figura 13: Arritmias durante la FPO (módulo 3: NO continuo (retardo de la ISDN)). Los números de columnas se dan en orden consecutivo de las columnas en el grupo IVb. La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP ISDN-PLACEBO; la columna 3 muestra 5 días RIP ISDN.

60 Figura 13: Arritmias durante la FPO (módulo 3: NO continuo (retardo de la ISDN)). Los números de columnas se dan en orden consecutivo de las columnas en el grupo IVb. La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP ISDN-PLACEBO; la columna 3 muestra 5 días RIP ISDN.

En todos los grupos, las arritmias también se escalaron en grado IVb.

60 En todos los grupos, las arritmias también se escalaron en grado IVb.

En el grupo "5 DÍAS ISDN-PLACEBO", el 57.1% de las ratas tienen arritmias clase IVb, el 14.3% clase IVa y el 28.6% clase IIIb. El grupo de "ISDN RIP DE 5 DÍAS" muestra arritmias menos graves con 57.1% de clase IVb, 28.6% de clase IIIb y 14.3% de arritmias de clase 0.

60 En el grupo "5 DÍAS ISDN-PLACEBO", el 57.1% de las ratas tienen arritmias clase IVb, el 14.3% clase IVa y el 28.6% clase IIIb. El grupo de "ISDN RIP DE 5 DÍAS" muestra arritmias menos graves con 57.1% de clase IVb, 28.6% de clase IIIb y 14.3% de arritmias de clase 0.

Figura 14: Arritmias durante la FPO (módulo 4: NO intermitente más AAS). Los números de columnas se dan en orden consecutivo de las columnas en el grupo IVb. La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP ASA+PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP ASA+NTG-PLACEBO; La columna 3 muestra 5 DÍAS RIP ASA+NTG.

5 Las arritmias se escalaron de manera similar en grado IVb en todos los grupos.

En el grupo "5 DÍAS RIP ASA+PBS", en el grupo tratado con ASA+NTG-PLACEBO y en el grupo "5 DÍAS RIP ASA+NTG", 83.3% de las ratas tienen arritmias clase IVb y 16.7% clase IIIa.

10 Figura 15: Puntuación VPB. La columna 1 muestra SIMULADO PBS; la columna 2 muestra SIMULADO NTG-Placebo; la columna 3 muestra SIMULADO NTG; la columna 4 muestra RIP PBS; la columna 5 muestra RIP NTG-Placebo; la columna 6 muestra RIP NTG; la columna 7 muestra RIP PBS; la columna 8 muestra RIP ISDN-Placebo la columna 9 muestra RIP ISDN; la columna 10 muestra RIP PBS+ASA; la columna 11 muestra RIP NTG-Placebo+ASA; La columna 12 muestra RIP NTG+ASA.

15 Con respecto al porcentaje de cada grado de Lown de cada grupo, se puede determinar una puntuación de VBP. Mientras más animales muestren un grado más alto, más alta es la puntuación VBP.

20 La puntuación de VBP muestra el porcentaje de cada grado de Lown de cada grupo. Los grupos de Sham tienen puntuaciones VBP más altas. En comparación con el grupo con un protocolo isquémico (grupo de control, tratado con PBS), más ratas muestran arritmias graves. El tratamiento con NTG reveló arritmias reducidas y, en consecuencia, una puntuación VPB más baja. La puntuación VPB en los grupos tratados con ASA solo o NTG+ASA es mayor en comparación con los controles (tratados con PBS).

25 Figura 16: Tamaño de infarto de los grupos de control de 5 días y 10 días. La columna 1 muestra 5 DÍAS SIMULADO PBS,  $n = 8$ :  $13.36 \pm 5.22\%$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP PBS,  $n = 8$ :  $11.05 \pm 5.12\%$ ; la columna 3 muestra 10 DÍAS SIMULADO PBS,  $n = 7$ :  $13.71 \pm 6.04\%$ ; la columna 4 muestra 10 DÍAS RIP PBS,  $n = 6$ :  $6.57 \pm 3.26\%$ ; la desviación estándar se indica mediante barras de error; el asterisco indica significativo en comparación con los simulados (valor  $p$  nominal  $<0.013$ ).

30 Después de un protocolo isquémico de 5 días, no hay un tamaño de infarto significativamente menor medible, pero después de un RIP de 10 días, el área infestada disminuye significativamente en comparación con los simulados (valor de  $p$  nominal  $<0.013$ ).

35 Después de 90 minutos de oclusión de LAD y 20 minutos de reperfusión, se analizó el tamaño del infarto. El grupo "10 DÍAS RIP PBS" tiene un área de infarto significativamente más pequeña en comparación con el grupo "10 DÍAS SIMULADO PBS". No hay significación entre ambos grupos de 5 DÍAS.

40 Figura 17: Tamaño del infarto (módulo 1: Operación simulada (sin RIP)). La columna 1 muestra 5 DÍAS SIMULADO PBS,  $n = 8$ :  $13.36 \pm 5.22\%$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS SIMULADO NTG-PLACEBO,  $n = 6$ :  $14.21 \pm 5.79\%$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS SIMULADO NTG,  $n = 7$ :  $14.09 \pm 5.18\%$ ; La desviación estándar se indica mediante barras de error.

45 El tamaño del infarto no muestra diferencia entre los grupos de SIMULADO.

No hay ningún significado entre los tres grupos de SIMULADO.

50 Figura 18: Tamaño del infarto (módulo 2: NO intermitente (NTG)). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS,  $n = 8$ :  $11.05 \pm 5.12\%$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS NTG-PLACEBO:  $n = 6$ ;  $9.80 \pm 6.79\%$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG,  $n = 7$ :  $3.61 \pm 2.08\%$ ; la desviación estándar se indica mediante barras de error, el asterisco indica que es significativo en comparación con el RIP PBS de 5 DÍAS (valor  $p$  nominal  $<0.017$ ).

55 El tamaño del infarto es significativamente menor después del tratamiento con NTG en comparación con los controles (tratados con PBS) (valor de  $p$  nominal  $<0.033$ ).

En comparación con el "5 DÍAS RIP PBS", se observa un área de infarto significativamente más pequeña en el grupo "5 DÍAS RIP NTG". No hay importancia entre el grupo PBS y NTG-PLACEBO.

60 Figura 19: Tamaño del infarto (módulo 3: NO continuo (ISDN retardado)). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS,  $n = 8$ :  $11.05 \pm 5.12\%$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS ISDN-PLACEBO,  $n = 6$ :  $9.97 \pm 3.65\%$ ; la columna 3 muestra ISDN RIP de 5 DÍAS,  $n = 7$ :  $7.59 \pm 4.38\%$ ; La desviación estándar se indica mediante barras de error.

El tamaño del infarto después del tratamiento con ISDN es menor en comparación con los controles (tratados con PBS o ISDN-Placebo), pero no hay importancia.

65

El tamaño del infarto en el grupo ISDN ("5 DÍAS RIP ISDN") es más pequeño en comparación con el grupo PBS, así como el grupo ISDN-PLACEBO.

Figura 20: Tamaño del infarto (módulo 4: NO intermitente más ASA). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS, n = 8;  $11,05 \pm 5,12\%$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP ASA + PBS, n = 6:  $12,51 \pm 3,05\%$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS NTG-PLACEBO: n = 6;  $9,80 \pm 6,79\%$ ; la columna 4 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO + ASA, n = 6:  $13,92 \pm 1,71\%$ ; la columna 5 muestra 5 DÍAS RIP NTG, n = 7:  $3,61 \pm 2,08\%$ ; la columna 6 muestra 5 DÍAS RIP NTG + ASA, n = 6:  $13,00 \pm 3,82\%$ ; la desviación estándar se indica mediante barras de error, el asterisco indica que es significativo en comparación con el RIP NTG de 5 DÍAS (valor p nominal <0.017).

El tamaño del infarto después del tratamiento con NTG más ASA aumenta significativamente en comparación con el tratamiento con NTG solo (valor de p nominal <0.017).

El tamaño del infarto en el grupo tratado con ASA ("5 DÍAS ASA + PBS") aumenta mínimamente en comparación con el grupo de control de PBS, así como el grupo ASA + NTG-PLACEBO. No hay diferencia entre el grupo ASA + NTG y el grupo tratado con ASA y PBS. Sin embargo, el área de infarto en el grupo NTG es significativamente más pequeña en comparación con el grupo ASA + NTG.

Figura 21: Tinción TTC. Las imágenes muestran rebanadas de tres niveles. El tejido infartado mancha un blanco pálido ya que carecen de las enzimas con las que reacciona el TTC. Así, las áreas de necrosis son claramente discernibles y cuantificables.

Figura 22: Diámetros colaterales de ROI (módulo 1: Operación simulada (sin el RIP)). La columna 1 muestra 5 DÍAS SIMULADO PBS, n = 3:  $82,7 \pm 3,7 \mu\text{m}$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS SIMULADO NTG-PLACEBO, n = 3:  $89,6 \mu\text{m} \pm 10,6 \mu\text{m}$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS SIMULADO NTG, n = 3:  $86,8 \pm 9,0 \mu\text{m}$ ; La desviación estándar se indica mediante barras de error.

No hay crecimiento de colaterales y no hay diferencias medibles entre los grupos de SIMULADO.

No hay importancia entre los tres grupos de SIMULADO.

Figura 23: Diámetros colaterales de ROI (módulo 2: NO intermitente (NTG)). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS, n = 3:  $129,8 \pm 6,9 \mu\text{m}$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO: n = 3;  $127,0 \pm 12,1 \mu\text{m}$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG, n = 3:  $158,4 \pm 9,2 \mu\text{m}$ ; la desviación estándar se indica mediante barras de error, el asterisco indica una diferencia significativa en comparación con 5 DÍAS RIP NTG (valor p nominal <0.033).

Los diámetros de las colaterales aumentan significativamente con el tratamiento con NTG en comparación con los controles (tratados con PBS o NTG-Placebo) (valor de p nominal <0.033).

En comparación con los "5 DÍAS RIP PBS", los diámetros de los colaterales en el ROI en el grupo "5 DÍAS RIP NTG" aumentan significativamente. No hay diferencia entre el grupo PBS y el grupo NTG-PLACEBO.

Figura 24: Diámetros colaterales de ROI (módulo 3: NO continuo (ISDN retardado)). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS, n = 3:  $129,8 \pm 6,9 \mu\text{m}$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS ISDN-PLACEBO, n = 3:  $133,0 \pm 11,5 \mu\text{m}$ ; la columna 3 muestra ISDN RIP de 5 DÍAS, n = 3:  $148,2 \pm 11,3 \mu\text{m}$ ; la desviación estándar se indica mediante barras de error.

No se pueden medir diferencias en el diámetro de los colaterales tras el tratamiento con ISDN o ISDN-Placebo.

Los diámetros de las colaterales en el grupo ISDN ("ISDN RIP DE 5 DÍAS") se mejoran en comparación con el grupo PBS, así como en comparación con el grupo ISDN-PLACEBO.

Figura 25: Diámetro colateral del ROI (módulo 4: NO intermitente más ASA). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS, n = 3;  $129,8 \pm 6,9 \mu\text{m}$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP PBS + ASA, n = 3:  $102,5 \pm 8,0 \mu\text{m}$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO: n = 3;  $127,0 \pm 12,1 \mu\text{m}$ ; la columna 4 muestra 5 DÍAS NTG-PLACEBO + ASA, n = 3:  $97,1 \pm 8,6 \mu\text{m}$ ; la columna 5 muestra 5 DÍAS RIP NTG, n = 3:  $158,4 \pm 9,2 \mu\text{m}$ ; la columna 6 muestra 5 DÍAS RIP ASA + NTG, n = 3:  $124,4 \pm 5,6 \mu\text{m}$ ; la desviación estándar se indica mediante barras de error, un asterisco indica que es significativo en comparación con el RIP PBS de 5 DÍAS (valor p nominal <0.039); el doble asterisco indica significativo en comparación con 5 DÍAS RIP ASA + NTG (valor p nominal <0.039).

Los diámetros de las colaterales son significativamente más pequeños después del tratamiento con ASA en comparación con el control (tratado con PBS) (\* valor de p nominal <0.039). Un tratamiento adicional con NTG eliminó el efecto inhibitorio de ASA, pero el tratamiento con NTG solo muestra un diámetro significativamente mayor en comparación con el tratamiento con NTG + ASA (\*\* significativo comparado con 5 DÍAS RIP ASA + NTG, valor de p nominal <0.039).

Los diámetros en el grupo tratado con PBS y ASA son significativamente más pequeños en comparación con el grupo control de PBS, pero no hay importancia en comparación con el grupo ASA + NTG-PLACEBO. En el grupo ASA + NTG, los diámetros aumentaron significativamente en comparación con el grupo tratado con PBS y ASA.

5 Figura 26: imagen MicroCT del "ROI": (A) "5 DÍAS SIMULADO PBS"; (B) "5 DÍAS SIMULADO NTG"; (C) "5 DÍAS RIP ISDN"; (D) "5 DÍAS RIP PBS"; (E) "5 DÍAS RIP NTG"; (F) "5 DÍAS RIP ASA + PBS"; (G) "5 DÍAS RIP ASA + NTG". Las imágenes muestran el crecimiento del diámetro colateral en la región de interés por el protocolo isquémico tratado con PBS (D), NTG (E) o ISDN (C) en comparación con SIMULADO tratado con PBS (A) o NTG (B). La inhibición del crecimiento colateral por el tratamiento con ASA (F) se elimina parcialmente con el tratamiento adicional con NTG (G).

10 Figura 27: Diagrama de flujo del estudio. La duración del período de referencia se estima en aproximadamente 2 semanas. La duración del período de intervención será de seis semanas. El período de seguimiento incluirá una investigación inmediata (un día hasta tres días como máximo después del período de intervención) y una investigación de seguimiento a largo plazo (1 mes después del período de intervención).

## 15 EJEMPLO 1

Estudio pre-clínico

### 20 1. Introducción

Un mecanismo importante de la arteriogénesis es la inducción de fuerzas hemodinámicas a través de las arterias colaterales reclutadas.

25 El NO cumple una función fundamental en este escenario, ya que regula la capacidad vasodilatadora de la arteria y los aspectos de proliferación terapéutica de las células musculares lisas de las arterias colaterales.

30 Aquí evaluamos los efectos de Nitrolingual Akut® Spray (G. Pohl-Boskamp GmbH & Co.KG, Hohenlockstedt, Alemania; marca estadounidense Nitrolingual® Pumpspray) en un modelo único de arteriogénesis sin infarto de miocardio. El crecimiento colateral en este modelo se induce a través de la oclusión repetitiva de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). El tamaño del infarto en estos animales se midió como el punto final al final del experimento. Por lo tanto, ninguna interferencia entre el infarto de miocardio y la arteriogénesis ha debilitado el experimento. Además, evaluamos el efecto del ácido acetilsalicílico (ASA) en este modelo de oclusión coronaria repetitiva como posible inhibidor de la arteriogénesis. Se evaluó si una aplicación concomitante de NO (uso intermitente de nitroglicerina) puede compensar este efecto negativo de la ASA.

### 35 2. Materiales y métodos

#### 40 1.1. Preparación de animales

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho (300 g de peso corporal al inicio del estudio; n = 182) para los experimentos. Para la cirugía (día 0), las ratas son premedicadas (ketamina 50 mg/ml más xilacina 4 mg/ml intraperitoneal) e intubadas. La intubación oral (tubo de polietileno 14-G) se realiza bajo observación directa de las cuerdas vocales con un otoscopio. La anestesia general se introduce y mantiene por inhalación de isoflurano (1.0% a 2.0%, con 100% de oxígeno). La temperatura corporal se controla a 37°C mediante una mesa de calentamiento eléctrico. La cirugía se realiza mediante técnica aséptica. El animal se coloca inicialmente en su lado dorsal y los clips cutáneos se fijan. Con un amplificador diferencial BioAmp acoplado a un sistema de adquisición de datos PowerLab (AD Instruments), los parámetros de ECG (frecuencia cardíaca) se monitorean y registran durante la cirugía. El corazón está expuesto por toracotomía izquierda. Se implanta un oclisor de caja mini-neumático (consulte la sección del oclisor de caja mini-neumática para obtener más información) alrededor de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). La confirmación de que el oclisor es funcional, es decir, que produce isquemia miocárdica, se determina inicialmente mediante la observación del escaldado y la hipocinesia del ventrículo izquierdo (LV) y la observación del electrocardiograma (elevación del ST) durante el inflado. Las ratas se dividen aleatoriamente en 4 módulos terapéuticos:

- 55 Módulo 1: Operación simulada
- Módulo 2: NO intermitente (nitroglicerina)
- Módulo 3: NO continuo (preparación retardada de dinitrato de isosorbida)
- Módulo 4: NO intermitente más ASA

60 Después de la instrumentación y las mediciones, el tórax se cierra bajo una presión espiratoria final positiva y la cavidad torácica se evacua del aire. Los oclisores se canalizan por vía subcutánea y se exteriorizan entre las escápulas. Estos catéteres están protegidos por una bobina de resorte de acero inoxidable conectada a un anillo que se sujeta subcutáneamente entre las escápulas. Después de la cirugía, se administran analgésicos (buprenorfina 0.05 mg/kg SC) y antibióticos (enrofloxacin 10 mg/kg SC). Las ratas se observan en una jaula de recuperación durante 2 horas y luego se transfieren a las instalaciones de cuidado de animales, donde son supervisadas continuamente por

los técnicos. Después de la operación, se administra buprenorfina (0.5 mg/kg SC) para el dolor dos veces al día durante 8 resp. 13 días. En el tercer día después de la cirugía (día 3), se inicia el protocolo isquémico. Después de 5 resp. 10 días (solo en el módulo 1A y 2A) del protocolo experimental (día 8 y día 13), las ratas se anestesian y el tórax se abre por medio de una toracotomía. En el grupo de micro-CT, los corazones se escinden inmediatamente. Para la detección del tamaño final del infarto, la LAD se ocluye permanentemente (oclusión final definitiva, FPO) y el tamaño del infarto se mide mediante tinción con TTC.

#### 1.2. Ocluidor de caja mini-neumático para el corazón de rata

Se utiliza un ocluidor de caja mini-neumático que consiste en un mini-globo, tubo de vaina, sutura y catéter. El globo (7 mm de largo) está hecho de membrana de látex suave y es suficientemente flexible para dar una fuerza física despreciable en los vasos coronarios durante la deflación del globo. El globo se monta dentro de una funda de paraguas (3.2 o 4.8 mm de diámetro, 12 mm de longitud; protege al globo de la infiltración fibrosa). Prolene (5-0) se pasa alrededor de la LAD y se une a la vaina, asegurando el ocluidor al corazón, de modo que la isquemia de miocardio se produce por inflado del balón. El volumen de inflado es pequeño (0.2 a 0.25 mL de aire), pero la oclusión se produce por 2 acciones físicas: "enrosca" la LAD hacia arriba/afuera y comprime la LAD con el globo/vaina inflada. El globo está conectado a un catéter (PE-50) que está exteriorizado. La inflación y la deflación del globo se controlan desde fuera de la jaula de ratas.

#### 1.3. Mediciones de los parámetros de ECG

En los cuatro módulos (1-4) al principio (día 3) y al final (día 8 y día 13) del protocolo experimental (RIP), la oclusión coronaria se realiza durante 40 segundos (equivalente a una oclusión en el RIP); vea la página 6) y durante la FPO durante 90 minutos (día 8 y día 13) los parámetros de ECG se miden para examinar la frecuencia cardíaca y la elevación del ST. Además, se determinan las arritmias que ocurren durante la FPO. De acuerdo con la clasificación de Lown, cada animal muestra un cierto grado. Cuanto más alto es un grado, más graves son las arritmias. Para ilustrar la gravedad media de un grupo completo más descriptivo, se determina una puntuación de VPB. Para eso, cada grado de Lown se refiere a un factor en particular (grado 0 = factor 0; grado I = factor 1; grado II = factor 2; grado IIIa = factor 3; grado IIIb = factor 4; grado VIa = factor 5; grado VIb = factor 6 y grado V = factor 7). Cada grupo tiene un porcentaje diferente de animales que presentan cada grado. El porcentaje de las calificaciones respectivas se multiplica por el factor apropiado que conduce a los resultados individuales que luego se suman a la puntuación VPB de todo el grupo. En consecuencia, un grupo de animales con grados Lown más altos tiene una puntuación VPB correlativamente alta.

#### 1.4. Imagen microvascular coronaria con micro-TC

Además, Micro-CT se utiliza como un punto final adicional para colaterales de imagen. Se prepara un grupo de ratas (3 ratas de cada grupo en cada módulo; un total de 36 ratas) para la visualización vascular coronaria mediante micro-CT. La circulación coronaria se rellena con medio de contraste (microfil amarillo) mediante la modificación de la metodología para el estudio de micro-TC en ratas. La viscosidad del medio de contraste permite el llenado hasta el nivel arteriolar coronario con un llenado mínimo o nulo de capilares. El corazón escindido se canula inmediatamente con una cánula aórtica y la circulación coronaria se perfunde retrógradamente a 85 mm Hg. Para evitar la contracción metabólica del miocardio y dilatar al máximo la vasculatura coronaria, se utiliza un perfundido (25°C a 27°C de solución salina con 2% de procaína). El tubo de polietileno se inserta en el LV a través de un apéndice izquierdo a través de la válvula mitral para descargar el LV. El medio de contraste calentado (42°C) se inyecta a una presión de 85 mmHg durante 3 minutos mientras se controla la presión de perfusión. El corazón se enfría por inmersión en solución salina fría (0°C a 4°C) hasta que se solidifique (microfil amarillo). Luego, se retira el corazón y se fija en solución de paraformaldehído al 4% (4°C) durante la noche. Corazones completos se utilizan para imágenes de micro-TC del crecimiento colateral coronario. La vasculatura coronaria se visualiza con micro-TC. En resumen, todo el corazón se escanea en incrementos de 1° a aproximadamente 360° alrededor de su eje longitudinal de vértice a base. La resolución espacial seleccionada en el presente estudio tiene un tamaño de voxel de 18\*18\*18 m<sup>3</sup> para enfocarse en el tamaño de los vasos colaterales y para minimizar las señales de los vasos más pequeños. Finalmente, los datos de TC se reconstruyen como imágenes en 3D. El propósito principal de estas imágenes es establecer la presencia o ausencia de conexiones anastomóticas arterio-arteriales. Los vasos colaterales, es decir, las conexiones anastomóticas arterio-arteriales, se miden por observadores independientes de los grupos. La morfología de la red arterial colateral se analiza con el software Amira 5.2.2 (Visage Imaging, Berlín, Alemania).

#### 1.5. Protocolo experimental

El protocolo de isquemia repetitiva (RIP) se introduce mediante inflado automatizado del ocluidor utilizando el siguiente protocolo: 40 segundos de oclusión cada 20 minutos durante 2 horas y 20 minutos, seguido de un período de "descanso" (deflación) durante 5 horas y 40 minutos. Este conjunto de 8 horas se repite 3 veces al día durante 5 resp. 10 días (solo en módulo 1A y 2A). La LAD se ocluye automáticamente mediante inflado remoto o deflación a través del catéter. En ratas simuladas (ver módulo 1), el globo se implanta, pero no se aplica RIP. Las ratas bajo el protocolo RI se dividen aleatoriamente en los tres módulos 2, 3 y 4.

1.6. Detección del tamaño del infarto

El tamaño del infarto se detecta mediante tinción con TTC después de la oclusión final definitiva. Después de 5 resp. 10 días (solo en el módulo 1A y 2A) del protocolo experimental, el oclisor se infla permanentemente durante 90 minutos. El tamaño del infarto se mide mediante tinción con TTC (n = 10/grupo). Por lo tanto, las ratas se anestesian y se someten de nuevo al registro del ECG para confirmar la oclusión (elevación del ST) y para calcular los parámetros del ECG y los números de arritmias. En animales sin colaterales, la oclusión coronaria causa deterioro de la hemodinámica sistémica y arritmias, que incluyen contracciones ventriculares prematuras, taquicardia ventricular y fibrilación ventricular; en animales con colaterales bien desarrollados, no se observan tales efectos adversos. Los parámetros de ECG se registraron y analizaron mediante un programa computarizado (Tabla de laboratorio 7).

El tórax se abre mediante toracotomía media. El corazón se extirpa inmediatamente y se secciona desde el ápice hasta la base en cortes transversales de 2 mm de espesor paralelos al surco atrioventricular. Las rodajas se incuban con 0.09 mol/L de tampón de fosfato de sodio que contiene 1.0% de cloruro de trifetil tetrazolio (TTC) y 8% de dextrano durante 20 minutos. a 37°C. Las rodajas se fijan en formaldehído al 10% y luego se fotografían con una cámara digital montada en un estereomicroscopio. El tamaño infartado se cuantifica utilizando un programa planométrico computarizado (Adobe Photoshop). El área infartada se identifica como el tejido TTC negativo y se expresa como un porcentaje del área del ventrículo izquierdo (LV).

1.7. Detalles sobre los compuestos de prueba

ASA NO intermitente (NTG)	Merck Chemicals Solución de nitroglicerina; Nitrolingual akut® Spray, G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Alemania
NO continuo (ISDN retardado)	Gránulos de retardo de dinitrato de isosorbida; Nitrosorbon® retard; G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Alemania
Compuesto portador para NO intermitente (NTG-Placebo)	Solución placebo de Nitrolingual akut® Spray, Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Alemania
NO continuo compuesto portador (ISDN-Placebo)	Gránulos neutros de retardo de Nitrosorbon®; G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Alemania
Tampón de control	PBS (solución salina tamponada con fosfato)

1.8. Ruta, punto de tiempo y concentración de administración a animales

Todos los medicamentos (ASA y NTG e ISDN retardados) se administran por adelantado al siguiente tiempo de oclusión del dispositivo. El tampón de control (PBS) se administra de la misma manera antes de las dos primeras oclusiones.

NO intermitente (NTG)

Una nueva solución de prueba se prepara cada mañana a las ocho en punto. La solución se toma de los viales a través de jeringas.

NO se administra intermitente (NTG) dos veces al día con un intervalo de tiempo de 8 horas.

Debido a la instrumentación crónica de las ratas y para evitar un mayor estrés, la NTG se administra a través de la aplicación bucal. 50 µl de la solución de prueba preparada diariamente que contiene 17.37 µg de nitroglicerina (equivalente a una dosis humana de 0.8 mg, calculada por la fórmula dosis/animal [mg] = peso corporal metabólico [kg<sup>0.75</sup>] \* dosis humana [mg/kg] \* el factor de recálculo [kg/kg<sup>0.75</sup>] según Löscher, W., Ungemach, FR, Kroker, R., 1998, Blackwell Science, 3ª edición) se administra por aplicación bucal en el módulo 1, 2 y 4. El momento en que se aplica la aplicación es directamente al inflado del globo a las 9 a.m. y 5 p.m., por lo tanto, con los efectos máximos en las arterias colaterales reclutadas.

Esta concentración se toma de los viales de reacción mencionados anteriormente justo antes de la administración.

La solución de compuesto portador sirvió como solución madre para la preparación de la solución de prueba.

Compuesto de portador para NO intermitente (NTG-Placebo)

El compuesto portador se administra de una manera idéntica a la NO intermitente.

NO Continuo (ISDN retardado)

La medicación para el suministro prolongado de NO (preparación retardada de dinitrato de isosorbida = nitrato de acción prolongada ISDN) se administra en forma de gránulos de retardo 1 x por día.

5 Para la preparación retardada se elige ISDN en una dosis de 2.6 mg ISDN/rata. Por lo tanto, se suspenden gránulos de 13 mg en 0.5 ml de agua potable y se aplican por sonda a las 9 a.m. cada mañana (equivalente a una dosis humana de 2 mg/kg/bw).

10 Compuesto portador de NO continuo (ISDN-Placebo)

El compuesto portador se administra de una manera idéntica a la NO continua.

NO Intermitente más ASA (ácido Acetilsalicílico)

15 Cada mañana a las 9.30 a.m. 2.22 mg de ASA por rata se disuelve en 0.5 ml de agua potable por sonda directamente en el estómago.

20 La concentración de ASA de 2,22 mg de ASA por rata (6.34 mg/kg de peso corporal) se correlaciona con la dosis humana de 100 mg/día.

1.9. Animales y grupos

25 10 ratas por grupo (FPO = oclusión final permanente para inducir infartos)

Grupo d: 3 animales adicionales se tratan con los mismos medicamentos y esquema de ligación como los grupos correspondientes a, b y c, pero sin FPO. Estos 9 animales por módulo se utilizan para imágenes de micro CT.

Módulo 1: Operación simulada (sin RIP):

30 A. Tampón de control (solución salina tamponada con fosfato PBS) con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n = 20

35 1. n = 10: "5 DÍAS SIMULADO PBS"

2. n = 10 "10 DÍAS SIMULADO PBS"

B. Compuesto portador sin NO más FPO funcional para la detección del tamaño del infarto

40 n = 10: "5 DÍAS SIMULADO NTG-PLACEBO"

C. NTG con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto

45 n = 10: "5 DÍAS SIMULADO NTG"

D. A1.) N = 3 A2.) N = 3 B) n = 3 C) n = 3 para imágenes de micro CT

n = 12

50 total: n = 52

Módulo 2: NO intermitente:

A. Búfer de control intermitente con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n = 20

55 1. n = 10: "5 DÍAS RIP PBS"

2. n = 10: "10 DÍAS RIP PBS"

60 B. compuesto portador intermitente más FPO funcional para el tamaño del infarto detección

n = 10: "5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO"

C. NTG intermitente con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto

65 n = 10: "5 DÍAS RIP NTG"

D. A1.) n = 3 A2.) n = 3 B.) n = 3 C.) n = 3 para imágenes de micro CT

n = 12

5

total: n = 52

Módulo 3: NO continuo:

10 A. Control continuo de tampón (agua potable) con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto (n = 10): "5 DÍAS RIP DW"

B. Compuesto de portador continuo más FPO funcional para la detección del tamaño del infarto

15 n = 10: "5 DÍAS RIP ISDN- PLACEBO"

C. FPO funcional NO continuo para la detección del tamaño del infarto

n = 10: "5 DÍAS RIP ISDN"

20

DA) n = 3 B.) n = 3 C.) n = 3 para imágenes de micro CT CT

n = 9

25 total: n = (39)

Módulo 4: NO intermitente más ASA:

A. Control intermedio intermitente más ASA con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto

30

n = 10: "5 DÍAS RIP PBS+ASA"

B. Intermitente NO Portador compuesto más ASA más FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n = 10: "5 DÍAS RIP NTG -PLACEBO+ASA"

35

C. FPO intermitente funcional NTG más ASA para detección de tamaño de infarto

n = 10: "5 DÍAS RIP NTG+ASA"

40 D.A.) n = 3 B.) n = 3 C.) n = 3 para imágenes de micro CT

n = 9

total: n = 39

45

2. Análisis estadístico

Todos los datos se dan como media  $\pm$ DE. Los gráficos se muestran como media  $\pm$ EEM.

50 Los resultados obtenidos al medir la elevación del segmento ST, el tamaño del infarto y los diámetros de los vasos se analizan por su significancia estadística mediante el uso del paquete de software SPSS 20 (IBM SPSS Statistics, NY, EE. UU.). Se utiliza ANOVA con una tasa de descubrimiento falso, FDR, corrección. Los valores de p se ajustan para pruebas múltiples utilizando un procedimiento de FDR para lograr un significado de  $p \leq 0.05$  en todo el experimento. FDR tiene en cuenta el número de hipótesis nulas rechazadas y se ha demostrado que aumenta el poder estadístico en comparación con la corrección de Bonferroni.

55

3. Resultados

3.1 Oclusión permanente final

60

La oclusión de la LAD permitió un estudio prospectivo de la función de los vasos colaterales. Dichos vasos pueden proteger el tejido miocárdico con riesgo de isquemia después de la oclusión coronaria.

Al final del protocolo de RI, la oclusión permanente de la LAD se realiza en un subgrupo de todos los grupos y se miden los parámetros de ECG para examinar la elevación del segmento ST y se miden las arritmias ventriculares. Después de 90 minutos de oclusión permanente, se determina el área infartada.

65

3.2 Análisis de ECG

5 Las manifestaciones electrocardiográficas de la isquemia iniciada por la oclusión de LAD son menos pronunciadas cuando los vasos colaterales están presentes.

3.3 Elevación del segmento ST

10 Durante la oclusión de la LAD, existe una correlación inversa entre la magnitud de la elevación del segmento ST y la extensión de la oferta colateral.

15 La función colateral es un determinante importante de la dirección de la respuesta del segmento ST a la isquemia durante la oclusión coronaria aguda. La elevación del segmento ST reversible durante la oclusión aguda de LAD se relaciona con una función arterial colateral inadecuada. En pacientes con depresión del segmento ST reversible, la función colateral coronaria parece ser mejor y, como consecuencia, muestra menos resultados de isquemia.

20 Durante los 90 minutos de oclusión, la elevación del segmento ST en "10 DÍAS SIMULADO PBS" es significativamente mayor en comparación con el grupo "10 DÍAS RIP PBS" (10 DÍAS SIMULADO, n = 7:  $0.124 \pm 0.039$  mV; 10 DÍAS RIP DÍAS n = 7:  $0.055 \pm 0.033$  mV). En contraste, la elevación del segmento ST en "5 DÍAS SIMULADO PBS" es similar al grupo "5 DÍAS RIP PBS" (5 DÍAS SIMULADO, n = 8:  $0.134 \pm 0.034$  mV; 5 DAYS RIP, n = 8:  $0.104 \pm 0.016$  mV) (figuras 1 y 2).

Módulo 1: Operación simulada (sin el RIP)

25 No hay importancia entre los tres grupos de SIMULADO (5 DÍAS SIMULADO PBS, n = 8:  $0.134 \pm 0.034$  mV; 5 DÍAS SIMULADO NTG-PLACEBO, n = 6:  $0.131 \pm 0.043$  mV; 5 DÍAS SIMULADO NTG, n = 7:  $0.124 \pm 0.058$  mV) (Figuras 3 y 4).

30 Módulo 2: NO intermitente (NTG)

En el grupo NTG ("5 DAYS RIP NTG"), la elevación del ST se reduce significativamente en comparación con el grupo PBS (5 DÍAS RIP PBS, n = 8:  $0.104 \pm 0.016$  mV; 5 DÍAS RIP NTG, n = 7:  $0.052 \pm 0.030$  mV ). No hay importancia entre el grupo de PBS y NTG-PLACEBO (5 DÍAS NTG-PLACEBO: n = 6;  $0.096 \pm 0.061$  mV) (Figuras 5 y 6).

35 Módulo 3: NO Continuo (ISDN retardo)

40 La elevación del segmento ST en el grupo ISDN ("ISDN RIP DE 5 DÍAS") disminuye en comparación con el grupo PBS (RIP PBS de 5 DÍAS, n = 8:  $0.104 \pm 0.016$  mV; ISDN RIP DE 5 DÍAS, n = 7:  $0.062 \pm 0.027$  mV ), pero no tiene importancia, así como entre el PBS y el grupo ISDN-PLACEBO (5 DÍAS ISDN-PLACEBO, n = 7:  $0.110 \pm 0.069$  mV) (Figuras 7 y 8).

Módulo 4: NO intermitente más ASA

45 La elevación del segmento ST en el grupo tratado con PBS y ASA es mayor en comparación con el grupo de control de PBS (5 DÍAS RIP ASA + PBS, n = 7:  $0.138 \pm 0.098$  mV; 5 DÍAS RIP PBS, n = 8:  $0.104 \pm 0.016$  mV ), pero no hay importancia, así como entre el grupo ASA + NTG-PLACEBO (5 DÍAS RIP ASA + NTG-PLACEBO, n = 6:  $0.144 \pm 0.091$  mV). En el grupo ASA + NTG, la elevación del ST disminuye en comparación con el grupo tratado con ASA y PBS (5 DÍAS RIP NTG + ASA, n = 7:  $0.088 \pm 0.071$  mV) (Figuras 9 y 10).

50 3.4. Arritmias ventriculares

La importancia de los latidos prematuros ventriculares (VPB) se debe a su posible asociación con un mayor riesgo de muerte súbita cardíaca. Los VPBs fueron estratificados según la clasificación de Lown. Se ha demostrado que un alto grado de Lown predice la mortalidad después de un infarto agudo de miocardio.

55 Grado 0: sin latidos ectópicos ventriculares

Grado I: ocasional, aislado VPB

60 Grado II: VPB frecuente (> 1/min o 30/h)

Grado III: multiforme VPB

65 (a) VPB

(b) Bigemimus

Grado IV: VPB repetitivo

(a) Pareados

5

(b) Salvos

Grado V: VPB temprano

10 Módulo 1: Operación simulada (sin el RIP)

En el grupo "5 DÍAS SIMULADO PBS", el 87.5% de las ratas tienen arritmias clase IVb y el 12.5% clase IVa. En el grupo "5 DÍAS SIMULADO NTG-PLACEBO", el 83.3% tiene arritmias IVb y el 16.7% de clase IVa y en el grupo "5 DAYS SIMULADO NTG" el 85.7% tiene arritmias IVb y el 14.3% de arritmias clase IIIa (FIG. 11).

15

Módulo 2: NO intermitente (NTG)

En el grupo "5 DÍAS RIP PBS", el 75.0% de las ratas tienen arritmias clase IVb, 12.5% IVa y 12.5% clase 0. Con respecto al grupo "5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO", el 50.0% de las ratas presentaron arritmias clase IVb, 16.7% IVa, 16.7% clase IIIb y 16.7% clase 0 arritmias. Curiosamente, el grupo "5 DÍAS RIP NTG" muestra un 42.9% de arritmias de clase IVb y un 57.1% de arritmias de clase 0 (FIG. 12).

20

Módulo 3: NO Continuo (ISDN de retardo)

25 En el grupo "5 DÍAS ISDN-PLACEBO", el 57.1% de las ratas tienen arritmias clase IVb, el 14.3% clase IVa y el 28.6% clase IIIb. El grupo "ISDN RIP DE 5 DÍAS" muestra arritmias menos graves con un 57.1% de clase IVb, un 28.6% de clase IIIb y un 14.3% de arritmias de clase 0 (FIG. 13).

25

Módulo 4: NO intermitente Plus ASA

30

En el grupo "5 DÍAS RIP ASA + PBS", en el grupo tratado con ASS + NTG-PLACEBO y en el grupo "5 DÍAS RIP ASS + NTG" el 83.3% de las ratas posee arritmias clase IVb y 16.7% clase IIIa (FIG. 14).

35 Con respecto al porcentaje de cada grado de Lown de cada grupo, se puede determinar una puntuación de VBP. Mientras más animales muestren un grado más alto, mayor será la puntuación VBP (FIG. 15).

35

La figura 15: Puntuación VPB

Tabla 1: Puntuación VPB

40

Grupo	Puntuación VPB
Módulo 1	
SIMULADO PBS	5.88
SIMULADO NTG-PLACEBO	5.83
SIMULADO NTG	5.71
Módulo 2	
RIP PBS	5.13
RIP NTG-PLACEBO	4.50
RIP NTG	2.57
Módulo 3	
RIP PBS	5.13
RIP ISDN-PLACEBO	5.29
RIP ISDN	4.57
Módulo 4	
RIP ASA + PBS	5.50
RIP ASA + NTG-PLACEBO	5.50
RIP ASA + NTG	5.50

3.5. Tamaño del infarto

Después de 90 minutos de oclusión de LAD y 20 minutos de reperfusión, se analizó el tamaño del infarto.

El grupo "10 DÍAS RIP PBS" tiene un área de infarto significativamente más pequeña en comparación con el grupo "10 DÍAS SIMULADO PBS" (10 DÍAS RIP PBS, n = 6:  $6.57 \pm 3.26\%$ ; 10 DÍAS SIMULADO PBS, n = 7:  $13.71 \pm 6.04\%$ ). No hay significación entre ambos grupos de 5 DÍAS (5 DÍAS SIMULADO PBS, n = 8:  $13.36 \pm 5.22\%$ ; 5 DÍAS RIP PBS, n = 8:  $11.05 \pm 5.12\%$ ) (FIG. 16).

Módulo 1: Operación simulada (sin el RIP)

No hay importancia entre los tres grupos de SIMULADO (5 DÍAS SIMULADO PBS, n = 8:  $13.36 \pm 5.22\%$ ; 5 DÍAS SIMULADO NTG-PLACEBO, n = 6:  $14.21 \pm 5.79\%$ ; 5 DÍAS SIMULADO NTG, n = 7:  $14.09 \pm 5.18\%$ ) (FIG. 17).

Módulo 2: NO intermitente (NTG)

En comparación con el "5 DÍAS RIP PBS", se observa un área de infarto significativamente más pequeña en el grupo "5 DÍAS RIP NTG" (5 DÍAS RIP PBS, n = 8:  $11.05 \pm 5.12\%$ ; 5 DÍAS RIP NTG, n = 7:  $3.61 \pm 2.08\%$ ). No hay importancia entre el PBS y el grupo NTG-PLACEBO (5 DÍAS NTG-PLACEBO: n = 6;  $9.80 \pm 6.79\%$ ) (FIG. 18).

Módulo 3: NO Continuo (ISDN Retard)

El tamaño del infarto en el grupo ISDN ("ISDN RIP DE 5 DÍAS") es menor en comparación con el grupo PBS (RIP PBS de 5 DÍAS, n = 8:  $11.05 \pm 5.12\%$ ; ISDN RIP DE 5 DÍAS, n = 7:  $7.59 \pm 4.38\%$ ), así como el grupo ISDN-PLACEBO (5 DÍAS ISDN-PLACEBO, n = 6:  $9.97 \pm 3.65\%$ ) (FIG. 19).

Módulo 4: NO intermitente más ASA

El tamaño del infarto en el grupo tratado con ASA ("5 DÍAS ASA + PBS") aumenta mínimamente en comparación con el grupo de control de PBS (5 DÍAS RIP ASA + PBS, n = 6:  $12.51 \pm 3.05\%$ ; RIP PBS de 5 DÍAS, n = 8:  $11.05 \pm 5.12\%$ ), así como el grupo ASA + NTG-PLACEBO (5 DÍAS RIP ASA + NTG-PLACEBO, n = 6:  $13.92 \pm 1.71\%$ ). No hay diferencia entre el grupo ASA + NTG y el grupo tratado con ASA y PBS (FIG. 20). Sin embargo, el área de infarto en el grupo de NTG es significativamente más pequeña en comparación con el grupo de ASA + NTG (5 DÍAS RIP NTG, n = 7:  $3.61 \pm 2.08\%$ ; 5 DÍAS RIP NTG + ASS, n = 6:  $13.00 \pm 3.82\%$ ) (Figura 20).

3.6. Imagen microvascular coronaria con micro-TC

Las arterias colaterales son vasos preexistentes que corren paralelos a una arteria principal. En caso de que la arteria principal esté ocluida, incluso durante un corto periodo de tiempo (40 segundos durante este PIR), los colaterales asumen el suministro de sangre. Como resultado, las arterias colaterales en esta área (ROI, región de interés) comienzan a crecer en longitud (claramente visible por el patrón de tornillo de corcho) y más notablemente en su diámetro. Así que medimos el diámetro de las colaterales en la ROI.

Módulo 1: Operación simulada (sin el RIP)

No hay importancia entre los tres grupos de SIMULADO (5 DÍAS SIMULADO PBS, n = 3:  $82.7 \pm 3.7 \mu\text{m}$ ; 5 DÍAS SHAM NTG-PLACEBO, n = 3:  $89.6 \mu\text{m} \pm 10.6 \text{ m}$ ; 5 DÍAS SIMULADO NTG, n = 3 :  $86.8 \pm 9.0 \mu\text{m}$ ) (Figuras 22 y 26).

Módulo 2: NO intermitente (NTG)

En comparación con los "5 DÍAS RIP PBS", los diámetros de las colaterales en el ROI en el grupo "5 DÍAS RIP NTG" aumentan significativamente (5 DÍAS RIP PBS, n = 3:  $129.8 \pm 6.9 \mu\text{m}$ ; 5 DÍAS RIP NTG, n = 3:  $158.4 \pm 9.2 \mu\text{m}$ ). No hay diferencia entre el grupo de PBS y NTG-PLACEBO (5 DÍAS NTG-PLACEBO: n = 3;  $127.0 \pm 12.1 \mu\text{m}$ ) (Figuras 23 y 26).

Módulo 3: NO Continuo (ISDN de Retardo)

El diámetro de las colaterales en el grupo ISDN ("ISDN RIP DE 5 DÍAS") se mejora en comparación con el grupo PBS (RIP PBS 5 DÍAS, n = 3:  $129.8 \pm 6.9 \mu\text{m}$ ; ISDN RIP DE 5 DÍAS, n = 3:  $148.2 \pm 11.3 \mu\text{m}$ ), así como en comparación con el grupo ISDN-PLACEBO (5 DÍAS ISDN-PLACEBO, n = 3:  $133.0 \pm 11.5 \mu\text{m}$ ) (Figuras 24 y 26).

Módulo 4: NO intermitente más ASA

El diámetro en el grupo tratado con PBS y ASA es significativamente menor en comparación con el grupo de control de PBS (5 DÍAS RIP PBS + ASA, n = 3:  $102.5 \pm 8.0 \mu\text{m}$ ; 5 DÍAS RIP PBS, n = 3:  $129.8 \pm 6.9 \mu\text{m}$ ), pero no hay

importancia en comparación con el grupo ASA + NTG-PLACEBO (5 DÍAS NTG-PLACEBO + ASA, n = 3:  $97.1 \pm 8.6$   $\mu\text{m}$ ). En el grupo ASA + NTG, el diámetro aumenta significativamente en comparación con el grupo tratado con PBS y ASA (5 DÍAS RIP ASA + NTG, n = 3:  $124.4 \pm 5.6$   $\mu\text{m}$ ) (Figuras 25 y 26).

5 4. Conclusión

10 Examinamos los grupos "10 DÍAS SIMULADO PBS" y "5 DÍAS SIMULADO PBS", cada uno sin un RIP (protocolo de isquemia repetitiva) y los grupos "10 DÍAS RIP PBS" y "5 DÍAS RIP PBS", cada uno con un RIP de cinco y diez días. La medición del volumen del infarto después de una oclusión permanente de LAD de 90 minutos (FPO, oclusión final definitiva) reveló áreas infartadas significativamente más pequeñas en el grupo RIP de 10 DÍAS que en el grupo "10 DÍAS SIMULADO". En contraste, después de un RIP de cinco días, no se observaron diferencias en el grupo de SIMULADO y RIP.

15 Además, utilizamos los parámetros de ECG para exámenes y evaluaciones por primera vez. Encontramos que la elevación máxima de ST después de la FPO de la LAD no mostró diferencias cruciales entre "5 DÍAS RIP PBS" y los grupos de SIMULADO, aún. Sin embargo, después de 10 días, las elevaciones de ST disminuyeron significativamente en el grupo RIP.

20 Aparte de la medición de la elevación del ST durante la FPO, pudimos analizar y evaluar las arritmias de manera diferenciada.

25 Sobre la base de estos nuevos conocimientos sobre la caracterización del modelo de RMI de rata, decidimos utilizar un RIP de 5 días en caso de una estimulación esperada de la arteriogénesis. El grado de aumento de la elevación del ST y el volumen del infarto después de un RIP de 10 días se pueden obtener con sustancias pro-arteriogénicas dentro de un RIP de 5 días, aún.

Esto proporciona parámetros adicionales que pueden aprobar nuestros resultados de medición de volumen de infarto.

30 La aplicación intermitente de la solución de NTG (dos veces al día en la mucosa bucal) disminuyó las arritmias graves del corazón de rata durante la FPO en comparación con el grupo de control. Además, el volumen de infarto se reduce en más del 50% después de 90 minutos de FPO en comparación con el grupo de control. Esta reducción en el tamaño del infarto ni siquiera se puede obtener con los controles establecidos en un RIP de 10 días. Además, un tratamiento con solución de NTG atenuó significativamente la elevación del ST durante la FPO. Sobre la base de los análisis  $\mu\text{CT}$ , las arterias colaterales agrandadas significativamente fueron medibles.

35 El tratamiento de las ratas con retraso de ISDN (una vez al día por vía intragástrica) también condujo a disminuciones en la elevación de ST durante la FPO, menos arritmias y volúmenes reducidos de infarto. Sin embargo, estas mejoras de los parámetros de infarto son menos distintas en comparación con el tratamiento con NTG. Además, no mostraron ninguna significancia.

40 En comparación con los controles, el tratamiento con ASA mostró un deterioro de los parámetros de ECG y un aumento de los volúmenes de infarto debido al deterioro del crecimiento colateral. Estos efectos negativos del ASA en la arteriogénesis ya son conocidos. Curiosamente, pueden eliminarse parcialmente mediante un tratamiento adicional con NTG (dos veces al día en la mucosa bucal). Por lo tanto, los diámetros colaterales se ampliaron en el ROI y se mejoraron los parámetros de ECG. Sin embargo, los volúmenes de infarto después de FPO no mostraron reducción.

Los grupos de SHAM no diferían entre sí.

50 Más adelante, no hubo diferencias medidas entre los grupos de placebo y sus grupos de control correspondientes.

En conclusión, los resultados presentados indican que un tratamiento intermitente con solución de NTG disminuye el tamaño de un infarto de miocardio inducido experimentalmente. Además, los efectos sobre el ritmo cardíaco pueden mejorar. Estas ideas son de gran relevancia para los aspectos clínicos.

55 Ejemplo 2

Estudio clínico

60 El objetivo de este estudio es investigar los efectos de un programa de ejercicio estandarizado supervisado por un médico para el tratamiento sintomático, la mejora funcional y el aumento de la capacidad arteriogénica en pacientes con EAC crónica estable.

1 Diseño del estudio

65 1.1 Hipótesis y brazos de estudio.

1.1.1 Hipótesis

I El entrenamiento activo con control médico con aplicación intermitente de GTN es superior al entrenamiento activo con control médico sin GTN.

5

(A+) > (A-)

II El entrenamiento pasivo controlado por un médico (CardioAccel®) con aplicación intermitente de GTN es superior al entrenamiento pasivo controlado por un médico sin GTN.

10

(P+) > (P-)

III La terapia conservadora CAD con aplicación intermitente de GTN es superior a la terapia conservadora CAD sin GTN.

15

(C+) > (C-)

1.1.2 Brazos de estudio

20

A+ Entrenamiento con ejercicios controlados por médicos con aplicación intermitente de GTN

A- Entrenamiento con ejercicios controlados por médicos

25

P+ Entrenamiento de ejercicios pasivo con control médico (CardioAccel®) con aplicación intermitente de GTN

P- Entrenamiento con ejercicios controlados por médicos (CardioAccel®)

30

C+ Terapia CAD conservadora con aplicación intermitente de GTN

C- Terapia conservadora CAD

Los pacientes pueden usar GTN en caso de angina de pecho, sin embargo, se les proporcionará un estudio de GTN adicional para el uso del estudio.

35

Entrenamiento activo con ejercicio controlado por un médico con aplicación intermitente de GTN. La mejor terapia médica y la atención habitual según se detalla en las guías actuales (AHA, ESC) para la atención de pacientes con angina crónica estable. Intervalos diarios (lunes a viernes) de ejercicio físico (cinta rodante) de 30 min ( $\geq 1$  W/kg de peso corporal, luego de la estratificación del riesgo y el cálculo individual y el ajuste de la intensidad de entrenamiento según se detalla en las pautas actuales de EACPR, por un total de seis semanas. Se permite el uso de GTN para el tratamiento de episodios de angina. Además, GTN 0.4 mg se administra 2 a 5 minutos antes del inicio del ejercicio.

40

Entrenamiento activo de ejercicio controlado por un médico. La mejor terapia médica y la atención habitual según se detalla en las guías actuales (AHA, ESC) para la atención de pacientes con angina crónica estable. Intervalos diarios (lunes a viernes) de ejercicio físico (cinta rodante) de 30 min ( $\geq 1$  W/kg de peso corporal), luego de la estratificación del riesgo y el cálculo y ajuste individual de la intensidad del entrenamiento según se detalla en las pautas actuales de la EACPR, por un total de seis semanas. Se permite el uso de GTN para el tratamiento de episodios de angina.

45

Entrenamiento pasivo de ejercicios controlados por médicos (CardioAccel®) con aplicación intermitente de GTN.

50

La mejor terapia médica y la atención habitual según se detalla en las guías actuales (AHA, ESC) para la atención de pacientes con angina crónica estable. Intervalos diarios de tratamiento con CardioAccel® (de lunes a viernes) de una hora por día durante un total de seis semanas, según se detalla (Arora RR, Chou TM, Jain D, Fleishman B, Crawford L, McKiernan T, Nesto RW. The multicenter study of enhanced external counterpulsation (MUST-EECP): effect of EECP on exercise-induced myocardial ischemia and anginal episodes. J Am Coll Cardiol. 1999 Jun; 33(7):1833-40).

55

Se permite el uso de GTN para el tratamiento de episodios de angina. Además, GTN 0.4 mg se administra 2 a 5 minutos antes del inicio del ejercicio. Se permite el uso de GTN para el tratamiento de episodios de angina.

60

Entrenamiento pasivo controlado por un médico (CardioAccel®). La mejor terapia médica y la atención habitual según se detalla en las guías actuales (AHA, ESC) para la atención de pacientes con angina crónica estable. Intervalos diarios de tratamiento de CardioAccel® (de lunes a viernes) de una hora por día durante un total de seis semanas, según se detalla (Arora et al., Supra). Se permite el uso de GTN para el tratamiento de episodios de angina.

Terapia conservadora CAD con aplicación intermitente de GTN.

La mejor terapia médica y la atención habitual según se detalla en las guías actuales (AHA, ESC) para la atención de pacientes con angina crónica estable. Se permite el uso de GTN para el tratamiento de episodios de angina. Además, GTN 0.4 mg se administra una vez al día, preferiblemente antes del inicio de una actividad voluntaria de la vida diaria.

5 Terapia conservadora CAD. La mejor terapia médica y la atención habitual según se detalla en las guías actuales (AHA, ESC) para la atención de pacientes con angina crónica estable. Se permite el uso de GTN para el tratamiento de episodios de angina.

1.2 Diseño de ensayo clínico

10 1.2.1 Diseño de ensayos clínicos - General

El estudio está diseñado como un ensayo clínico

- 15 • prospectivo,  
• aleatorizado,  
20 • multicéntrico (Sitio alemán, Sitio de EE. UU.),

para evaluar los efectos del trinitrato de glicerilo (Nitrolingual®) sobre la capacidad de ejercicio, siendo el mecanismo fisiopatológico propuesto una inducción de efectos pro-arteriogénicos.

1.2.2 Criterio de valoración de estudio

25 Primario

Cambios en

30 la capacidad de ejercicio funcional, medida en la visita 3 por el volumen máximo de consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub> máx.) y el consumo máximo de oxígeno en el umbral anaeróbico (VO<sub>2</sub> máx. AT) desde el inicio en una prueba estandarizada de ejercicio en cinta rodante (sETT).

Secundario

35 Cambios en

(1) Tiempo hasta la isquemia inducida por el ejercicio medida por el tiempo hasta una depresión del segmento ST >1 mm en una prueba de esfuerzo normalizada en cinta rodante (sETT),

40 (2) las respuestas hemodinámicas al sETT, según lo cuantificado por el producto de presión-tasa (RPP)<sup>1</sup>, que se define como la presión arterial sistólica (mm Hg) multiplicada por la frecuencia cardíaca (bpm). La frecuencia cardíaca, la presión arterial y las tendencias del segmento ST se miden electrónicamente en el punto J + 60 ms,

45 1 El producto de frecuencia-presión (RPP) es un índice sensible del consumo de oxígeno en el miocardio (mVO<sub>2</sub>). Los pacientes se clasifican según el producto de presión de frecuencia (RPP) que existía en el momento de la depresión máxima del ST. En ausencia de depresión ST, se registra el máximo RPP.

50 (3) el número de episodios de angina por día,

(4) la duración del ejercicio en sETT,

(5) Índice de pendiente pico relativo (RPSI),

55 (4) Aceleración sistólica máxima derivada de Doppler [ACCmax],

(5) Estado funcional CCS y NYHA,

(6) Duke Treadmill Score<sup>2</sup>,

60 2 El Duke Threadmill calcula el riesgo; es igual al tiempo de ejercicio en minutos menos (5 veces la desviación del segmento ST, durante o después del ejercicio, en milímetros) menos (4 veces el índice de angina, que tiene un valor de "0" si no hay angina, "1" si se produce angina y "2" si la angina es la razón para interrumpir la prueba). Entre los pacientes ambulatorios con sospecha de EAC, los dos tercios de los pacientes con puntuaciones que indican un riesgo bajo tenían una tasa de supervivencia de cuatro años del 99% (tasa de mortalidad anual promedio del 0.25%), y el 4% que tenía puntuaciones que indicaban un riesgo alto tenía una tasa de cuatro años tasa de supervivencia del 79%

(tasa media anual de mortalidad del 5%). El puntaje funciona bien tanto para pacientes hospitalizados como ambulatorios, y los datos preliminares sugieren que el puntaje funciona igual de bien para hombres y mujeres [Gibbons et al., Directriz 2003 AHA/ACC]

5 (7) Incidencia de eventos cardiovasculares durante la fase de tratamiento y

(8) igual que el criterio de valoración primario, pero un mes después del período de intervención.

### 1.2.3 Pacientes

10 Los pacientes elegibles deben ser clínicamente estables, y recibir antes de la inscripción una terapia antianginal y CAD que esté en total acuerdo con las pautas actuales de la ESC/AHA para el tratamiento de la CAD crónica estable.

#### Medicación prohibida

- 15
- nitratos de acción prolongada
  - sildenafil etc.
- 20
- Compuestos antiinflamatorios (distintos de la aspirina), como esteroides o etanercept, etc.

#### Criterios de inclusión:

Edad > 18 años

Evidencia documentada de enfermedad coronaria estable por pruebas de tensión de ejercicio nuclear positivo, estenosis coronaria angiográficamente documentada o historia de elevación ST documentada o infarto de miocardio

#### Criterios de exclusión:

Intolerancia al nitrato o intolerancia a cualquier componente de la medicación del estudio.

Medicamento que presenta un riesgo de interacción farmacológica con GTN.

Síndrome coronario agudo o angina inestable  $\leq 6$  semanas antes.

Estenosis principal izquierda de  $\geq 50\%$ .

PCI o CABG  $\leq 3$  meses antes.

Angiografía coronaria  $\leq 3$  semanas antes.

Insuficiencia cardíaca congestiva/FE de  $\leq 30\%$ .

Cardiopatía valvular o miocarditis.

Hipertensión no controlada con valores de presión arterial  $\geq 180/100$  mmHg PAD sintomática grave, varicosis, trombosis venosa profunda (historial médico documentado o actual), flebitis o úlcera.

Trastorno de coagulación o anticoagulación terapéutica.

Arritmias cardíacas que interfieren con la activación de la ECP.

Características de ECG que invalidarían la monitorización del segmento ST: depresión del segmento ST basal, ritmos dependientes de marcapasos, duración del QRS  $> 0.12$  s, arritmias distintas a la arritmia sinusal.

FEV1 < 1.5l.

Participación actual en un programa de rehabilitación de ejercicios cardíacos.

Aleatorización

Los pacientes inscritos se asignan al azar en una proporción de 1:1:1 para recibir/someterse a un entrenamiento activo, terapia con CardioAccel® o atención habitual, es decir, una continuación del tratamiento de referencia de acuerdo con las pautas actuales. Dentro de estos grupos, los pacientes se asignan al azar en una proporción de 1:1 a un grupo "+GTN" o "-GTN" para recibir trinitrato de glicerol, además de su medicamento estándar, o no.

- 5 1.2.4 Planificación, conducción y gestión de estudios
- El ensayo está previsto por Arteriogenesis Network Art. Net.
- 10 La gestión del estudio estará cubierta por Arteriogenesis Network Art. Net.
- c/o Campus Technologies Freiburg GmbH
- 15 Transferencia de tecnología de la Universidad de Friburgo
- CEO: Prof. Dr. Bernhard Arnolds
- Stefan-Meier Straße 8, 79104 Friburgo (Alemania)
- 20 Teléfono: +49 (0)761 203 4990
- Facsimil: +49 (0)761 203 4992
- El patrocinador de la prueba es CTF.
- 25 Las estructuras de informes y los esquemas de informes se detallarán después de que los centros participantes hayan sido asignados.
- Sitios de investigación
- 30 Centros participantes: por determinar.
- Contacto en caso de dudas, difusión de información.
- 35 Contacto en caso de evento adverso, difusión de información.
- 1.2.5 Estudiar diagrama de flujo y protocolo
- El diagrama de flujo del estudio se da en la FIG. 27.
- 40 1.2.6 Asignación de tratamiento
- La aleatorización se realizará en los centros de conducción a través de envolturas.
- 45 La estratificación se realizará según grupos de edad, sexo y morbilidad.
- Las visitas de estudio son realizadas por un investigador.
- Los centros de estudio asignan de antemano a investigadores ciegos que desconocen la asignación al azar y que realicen los exámenes médicos y las pruebas en valor inicial y el primer seguimiento.
- 50 En cada visita del estudio, se les indica a los pacientes que completen un formulario de evaluación de calidad de vida estandarizado y corto (SF-36<sup>3</sup>). <sup>3</sup> [http://www.rand.org/health/surveys\\_tools/mos/mos\\_core—36item.html](http://www.rand.org/health/surveys_tools/mos/mos_core—36item.html)
- 55 Los pacientes asignados a los grupos C+/C- son contactados regularmente por el personal del estudio para ayudar a controlar los posibles efectos de sesgo, ya que estos sujetos no tienen contactos tan regulares con el personal del estudio como el CardioAccel® o los grupos de ejercicios.
- 1.2.7 Visitas de estudio
- 60 Visita 1: Evaluación de elegibilidad (Día 1)
- Historial médico, incluidas las intervenciones anteriores, examen físico,
- 65 • inscripción s/n

Visita 2: Visita de referencia (hasta el día 14 (+3 días))

• Historial médico detallado y examen físico, incluida la evaluación del número de episodios de angina por día, el estado de CCS y NYHA y la evaluación de la actividad física voluntaria.

5 • Pruebas en cinta rodante en un equipo de cinta calibrada estándar con capacidad de prueba cardiopulmonar (protocolo Naughton modificado):

10 capacidad de ejercicio funcional ( $VO_2$  máx. y  $VO_2$  máx. AT), tiempo hasta la isquemia inducida por el ejercicio medida por el tiempo hasta un segmento ST > 1 mm depresión, producto de presión-frecuencia (RPP), frecuencia cardíaca, presión arterial y tendencias del segmento ST medidas electrónicamente en el punto J + 60 ms, duración del ejercicio, puntuación DUKE en cinta rodante, control continuo de signos vitales, incl. ECG y  $VO_2$  de 12 derivaciones, con  $VO_2$  máx definido como  $VO_2$  en el nivel máximo de ejercicio que el paciente puede lograr (relación respiratoria >1, umbral anaeróbico)

15 • Índice de pendiente pico relativo (RPSI)

• Aceleración sistólica máxima derivada de Doppler [ACCmax]

20 • Aleatorización

Visitas intermedias (no programadas)

25 Se recomienda a los pacientes que se comuniquen con el centro de estudio en cualquier momento con respecto a su condición médica. Se programó que los pacientes regresen para sus primeras visitas de seguimiento a las 6 semanas después de la aleatorización.

Visita 3: Seguimiento a corto plazo (1-3 días después del período de intervención)

30 • Historial médico y examen físico, incluida la evaluación del número de episodios de angina por día, el estado de CCS y NYHA y la evaluación de la actividad física voluntaria.

35 • Pruebas en cinta rodante en un equipo de cinta calibrada estándar con capacidad de prueba cardiopulmonar (protocolo Naughton modificado):

40 capacidad de ejercicio funcional ( $VO_2$  máx. y  $VO_2$  máx. AT), tiempo hasta la isquemia inducida por el ejercicio medida por el tiempo hasta un segmento ST > 1 mm depresión, producto de tasa-presión (RPP), frecuencia cardíaca, presión arterial y tendencias del segmento ST medidas electrónicamente en el punto J + 60 ms, duración del ejercicio, puntuación DUKE en cinta de correr,

control continuo de signos vitales, incl. ECG y  $VO_2$  de 12 derivaciones, con  $VO_2$  máx definido como  $VO_2$  en el nivel máximo de ejercicio que el paciente puede lograr (relación respiratoria >1, umbral anaeróbico)

45 • Índice de pendiente pico relativo (RPSI)

• Aceleración sistólica máxima derivada de Doppler [ACCmax]

• Incidencia de eventos cardiovasculares durante la fase de tratamiento

50 Visita 4: Seguimiento a largo plazo (1 mes después del período de intervención)

(Lo racional de este punto de estudio es evaluar el efecto a largo plazo de la medicación del estudio después del período de intervención).

55 • Historial médico y examen físico, incluida la evaluación del número de episodios de angina por día, el estado de CCS y NYHA y la evaluación de la actividad física voluntaria.

60 • Pruebas en cinta rodante en un equipo de cinta calibrada estándar con capacidad de prueba cardiopulmonar (protocolo Naughton modificado):

65 capacidad de ejercicio funcional ( $VO_2$  máx. y  $VO_2$  máx. AT), tiempo hasta la isquemia inducida por el ejercicio medida por el tiempo hasta un segmento ST >1 mm depresión, producto de presión-frecuencia (RPP), frecuencia cardíaca, presión arterial y tendencias del segmento ST medidas electrónicamente en el punto J + 60 ms, duración del ejercicio, puntuación DUKE en cinta rodante,

control continuo de signos vitales, incl. ECG y VO<sub>2</sub> de 12 derivaciones, con VO<sub>2</sub> máx definido como VO<sub>2</sub> en el nivel máximo de ejercicio que el paciente puede lograr (relación respiratoria >1, umbral anaeróbico)

- Índice de pendiente pico relativa (RPSI)
- Aceleración sistólica máxima derivada de Doppler [ACC<sub>max</sub>]

#### 1.2.8 Consideraciones estadísticas

El principal parámetro de eficacia es la capacidad de ejercicio funcional, medida por el volumen máximo de captación de oxígeno (VO<sub>2</sub> máx.) Y la captación máxima de oxígeno en el umbral anaeróbico (VO<sub>2</sub> máx. AT) en una prueba estandarizada de ejercicio en cinta rodante (sETT). Suponemos que no hay diferencias al inicio, pero valores significativamente más altos en los grupos GTN en el seguimiento.

#### Métodos estadísticos

Hay dos fuentes principales de variación que deben considerarse en este ensayo: los efectos del tratamiento con GTN y los efectos del entrenamiento activo/entrenamiento pasivo/tratamiento conservador. De acuerdo con lo anterior, los datos serán analizados en un ANOVA de dos vías. Cualquier efecto de terapia no relacionado con GTN se informará de manera descriptiva sin estadística de inferencia.

Para parámetros secundarios, se aplicarán pruebas paramétricas o no paramétricas, según corresponda.

#### Tamaño de muestra/Potencia

Para establecer el tamaño de muestra necesario para el ANOVA bidireccional propuesto, hicimos los siguientes supuestos (según la revisión de la literatura y los datos internos): poder estadístico = 80%, desviación estándar para la medida de resultado = 15% de la media, tamaño del efecto (diferencia de grupo en el cambio entre GTN sí/no) = 5% de la media. La potencia se estableció en una simulación de Monte Carlo basada en 10000 repeticiones por tamaño de muestra en un rango de n por grupo de 30 a 60 pacientes. Esta simulación estableció un tamaño de muestra mínimo de 48 sujetos por grupo, para permitir posibles abandonos que proponemos incluir 50 sujetos por grupo, lo que da como resultado un tamaño de muestra total de 300 pacientes.

#### 1.3 Aspectos éticos y legales.

Los investigadores planifican y llevan a cabo experimentos con seres humanos, incluidas muestras identificables tomadas de seres humanos y datos identificables, de conformidad con

(a) la Declaración de Helsinki (Principios éticos para la investigación médica con seres humanos) concluida por la Asociación Médica Mundial (WMA) en junio de 1964, según la última revisión;

(b) la Guía tripartita armonizada de la ICH: Guía para la buena práctica clínica E6/Conferencia internacional sobre la armonización de los requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH E6, 1 de mayo de 1996), así como

(c) las regulaciones alemanas aplicables (por ejemplo, Arzneimittelgesetz) en sus formas actuales, así como las regulaciones aplicables de la FDA (por ejemplo, Guía para patrocinadores, investigadores, elementos de consentimiento informado, 21 CFR §50.25(c).

#### 5. Lista de abreviaturas

ACC<sub>max</sub>: Aceleración sistólica máxima derivada de Doppler

Art. Net.: Subcontratistas de red CTF

CAD: Enfermedad de las arterias coronarias

CardioAccel®: terapia de contrapulsación personalizada

CCS: Canadian Class Society (clasificación de angina)

CTF: Campus Technologies Freiburg

FSS: esfuerzo por cizallamiento por fluidos

GTN: gliceril trinitrato

IABP: bomba de balón intraaórtica

NYHA: New York Heart Association

5

RPSI: índice de pendiente pico relativa

sETT: una prueba estandarizada de ejercicio en cinta ergométrica

10

SMC: células musculares lisas vasculares

VO<sub>2</sub> máx: volumen máximo de captación de oxígeno

15

VO<sub>2</sub> máx. AT: captación máxima de oxígeno en el umbral anaeróbico

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para usar en un método para la prevención o el tratamiento de una insuficiencia arterial, en el que la nitroglicerina se administra de forma lingual, sublingual, inhalativa, bucal, transmucosa u oromucosa en una forma intermitente en una cantidad efectiva para la inducción de arteriogénesis, caracterizada porque la nitroglicerina se administra al menos una vez al día y al menos un día a la semana durante al menos dos semanas.
- 10 2. Nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para el uso de la reivindicación 1, en la que la insuficiencia arterial se caracteriza por una oclusión parcial o completa de un vaso arterial.
- 15 3. Nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la insuficiencia arterial se debe a la deposición de material en los vasos sanguíneos, o donde la insuficiencia arterial se debe a una compresión externa o interna de una arteria.
- 20 4. Nitroglicerina (gliceril trinitrato) para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la insuficiencia arterial es una enfermedad vascular, o en el que la insuficiencia arterial es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en aterosclerosis, una enfermedad isquémica y una arteria crónica adicional. enfermedad o en la que la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial coronaria, una insuficiencia arterial cerebral, una insuficiencia arterial periférica, una insuficiencia arterial intestinal, una insuficiencia arterial urogenital, una insuficiencia arterial nerviosa, una esclerodermia o una insuficiencia de la arteria retiniana central.
- 25 5. Nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la nitroglicerina se administra durante un período de varias semanas o meses.
- 30 6. Nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la nitroglicerina se administra junto con una estimulación exógena de las fuerzas de cizallamiento pulsátil en la arteria.
- 35 7. Nitroglicerina (gliceril trinitrato) para el uso de la reivindicación 6, en el que la nitroglicerina se administra en el período de tiempo de 30 minutos antes del comienzo de la estimulación exógena hasta 30 minutos después de la terminación de la estimulación exógena.
- 40 8. Nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en el que dicha estimulación se logra mediante ejercicio físico o la aplicación de una fuerza endógena al vaso arterial.
- 45 9. Nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el método apunta a la prevención de dicha insuficiencia arterial.
- 50 10. La nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) donante de NO para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la nitroglicerina se administra en forma de un aerosol, una cápsula masticable, un gas inhalable, un aerosol o polvo inhalable, gránulos, polvo o comprimido.
11. Nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para uso en un método de supresión de los efectos negativos asociados con cualquier tratamiento de una insuficiencia arterial que sea arteriogénesis antiarteriogénica o inhibidora, en el que la nitroglicerina se administra a un sujeto a dicho tratamiento en una cantidad y una forma eficaz para la inducción de la arteriogénesis, en la que la nitroglicerina se administra de forma intermitente, sublingual, inhalativa, bucal, transmucosa u oromucosal en una cantidad efectiva para la inducción de la arteriogénesis, caracterizada porque la nitroglicerina se administra al menos una vez día y al menos un día a la semana durante al menos dos semanas, en particular en el que la nitroglicerina se define como en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10.
12. Nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) para usar en un método de la reivindicación 11, en el que el tratamiento de una insuficiencia arterial es un ácido acetilsalicílico (ASA), un antagonista de la glucoproteína IIb/IIIa, o un tratamiento de etanercept (receptor de alfa del factor de necrosis tumoral soluble).

Figura 1

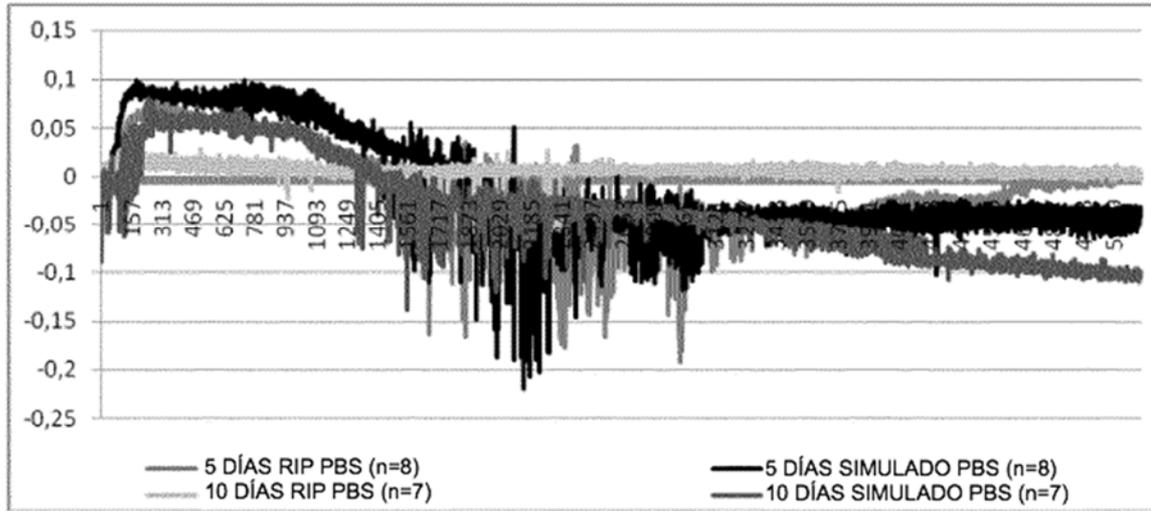


Figura 2

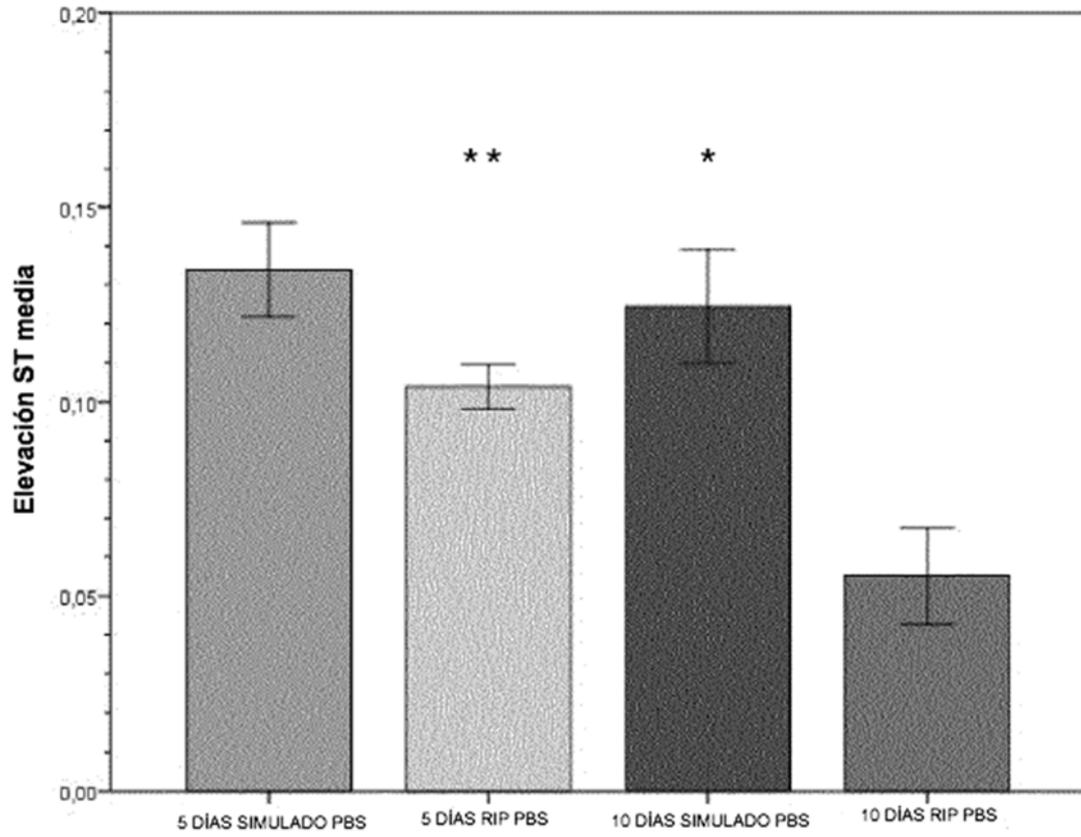
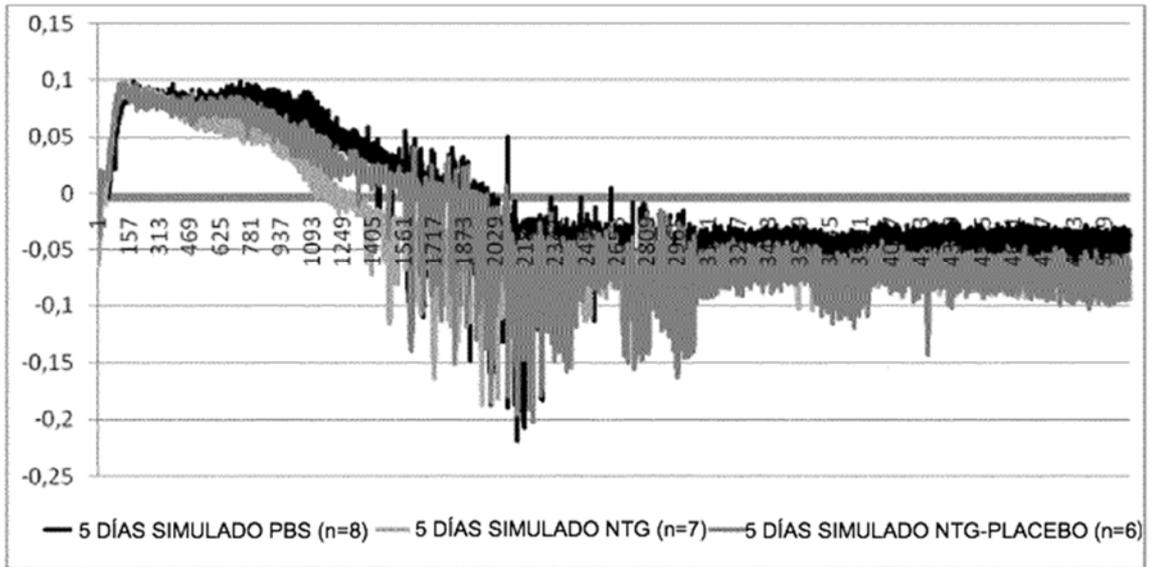


Figura 3



**Figura 4**

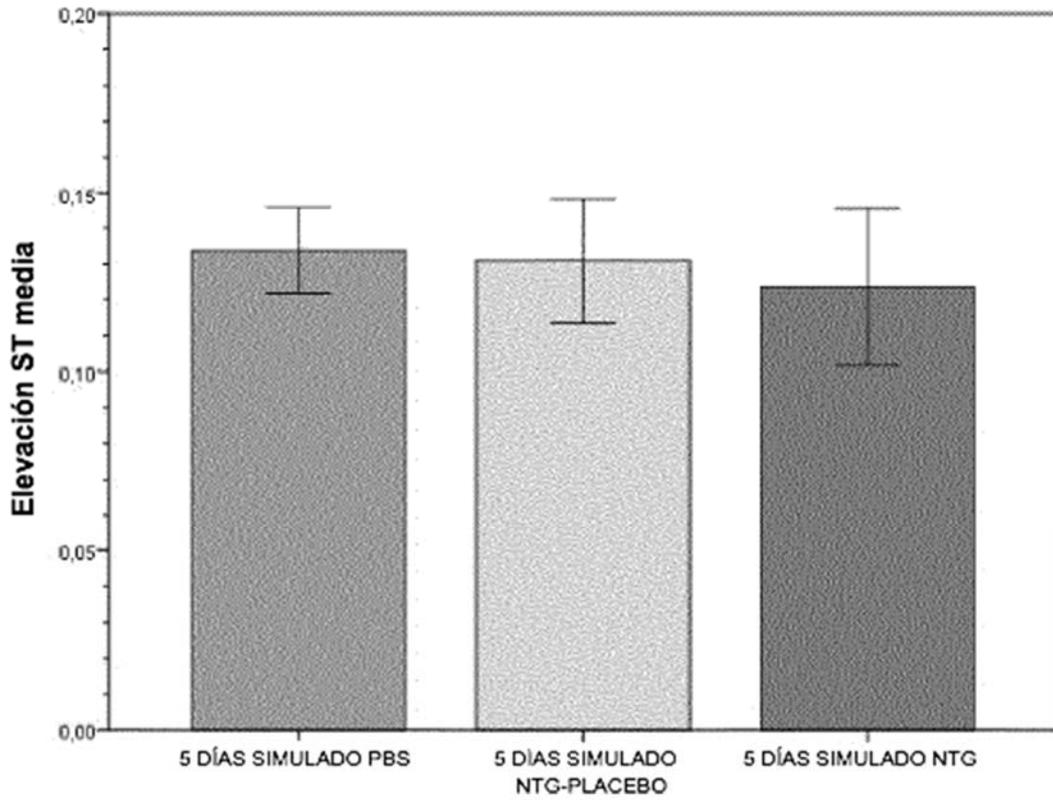
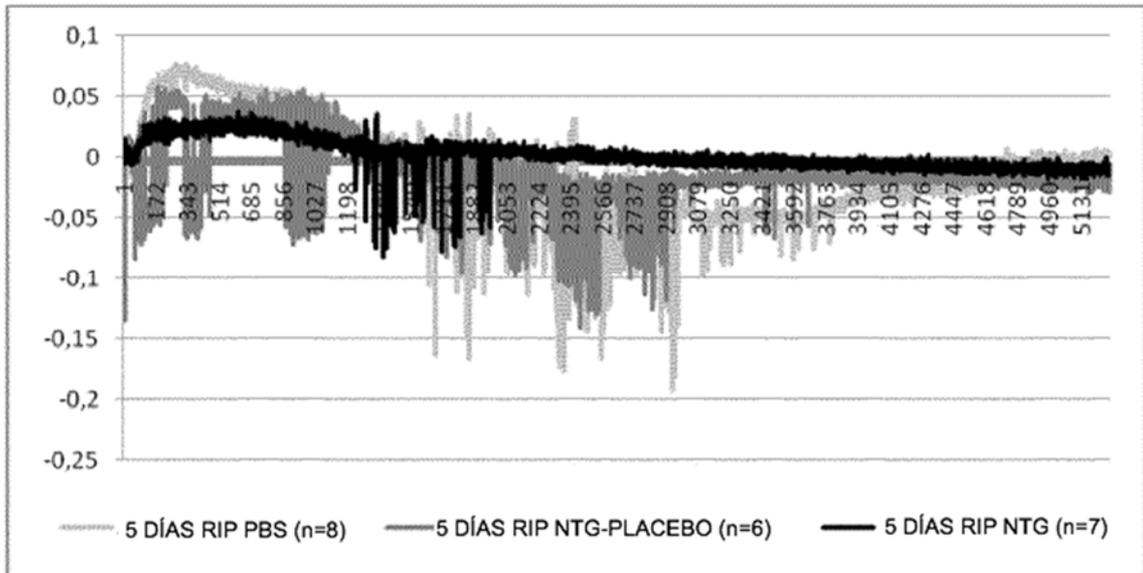


Figura 5



**Figura 6**

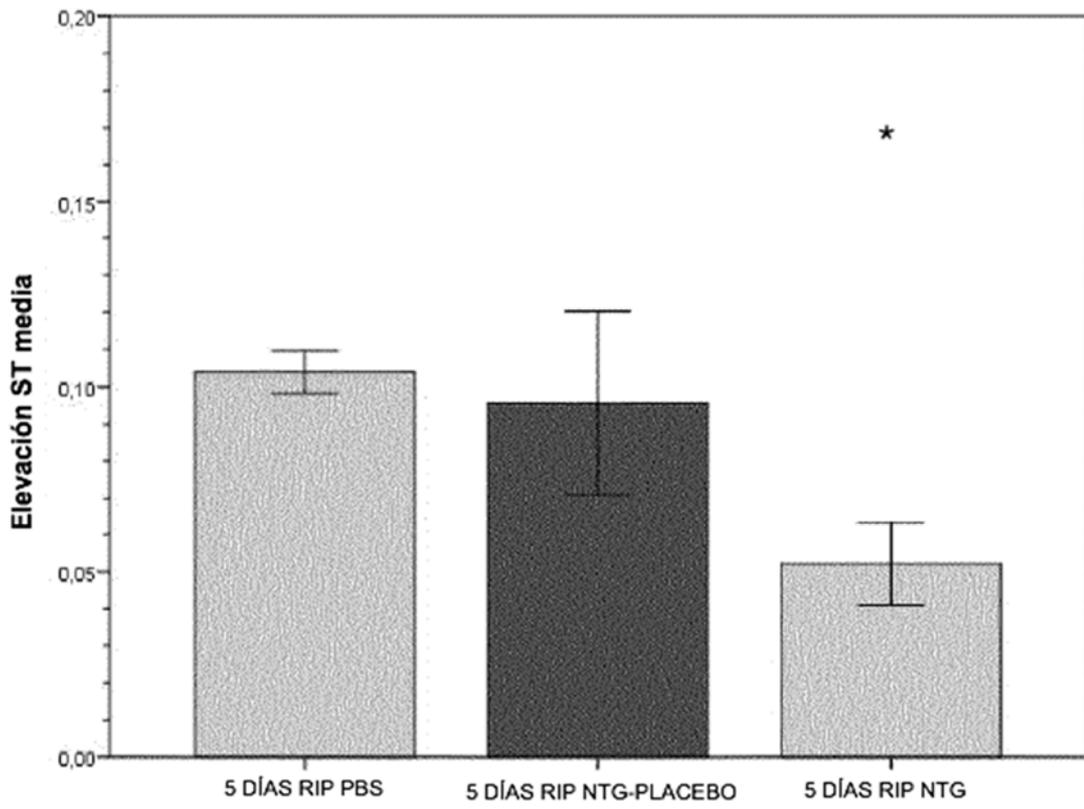
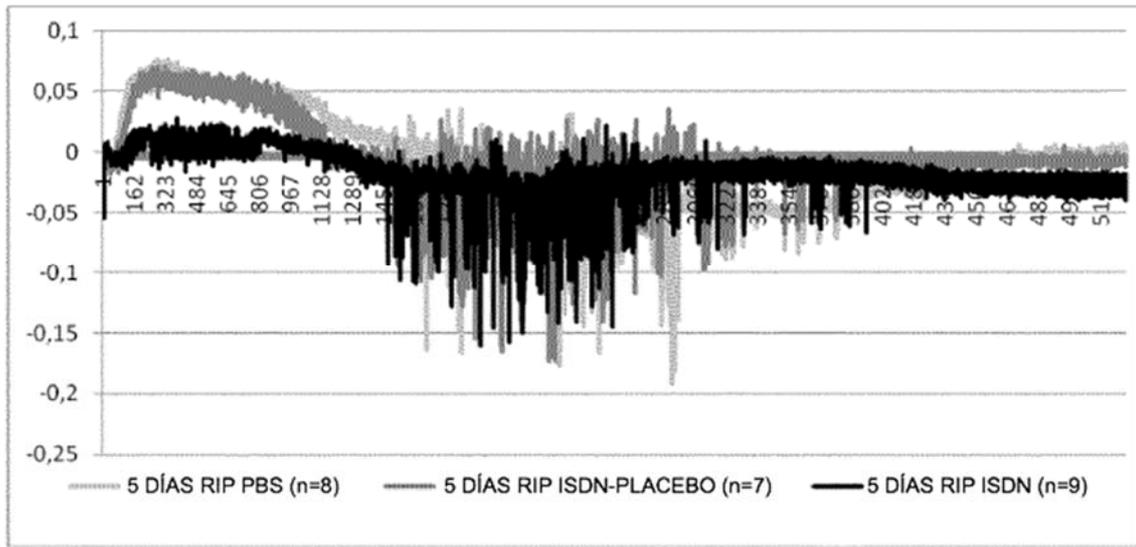


Figura 7



**Figura 8**

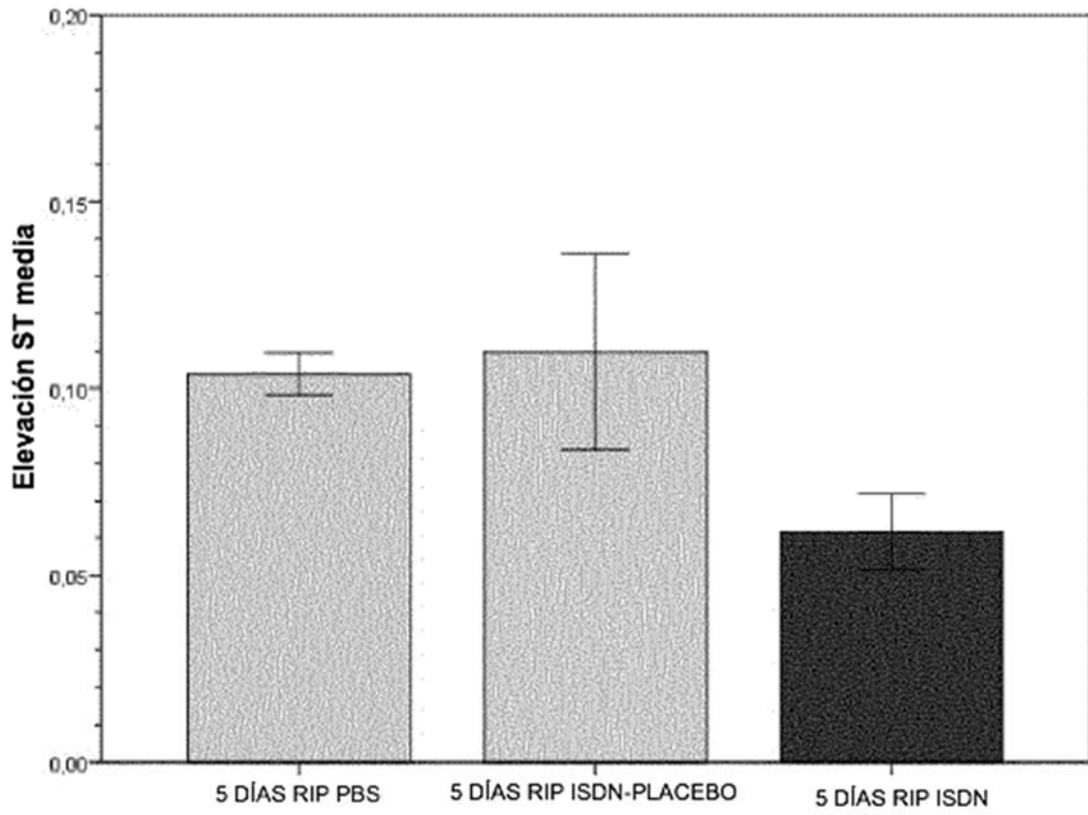
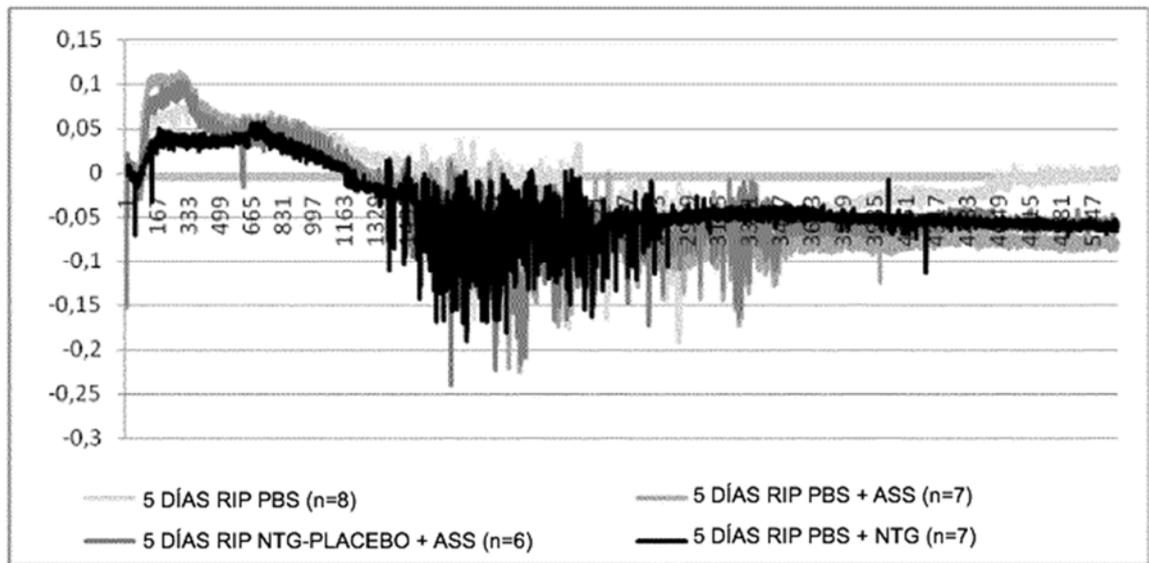
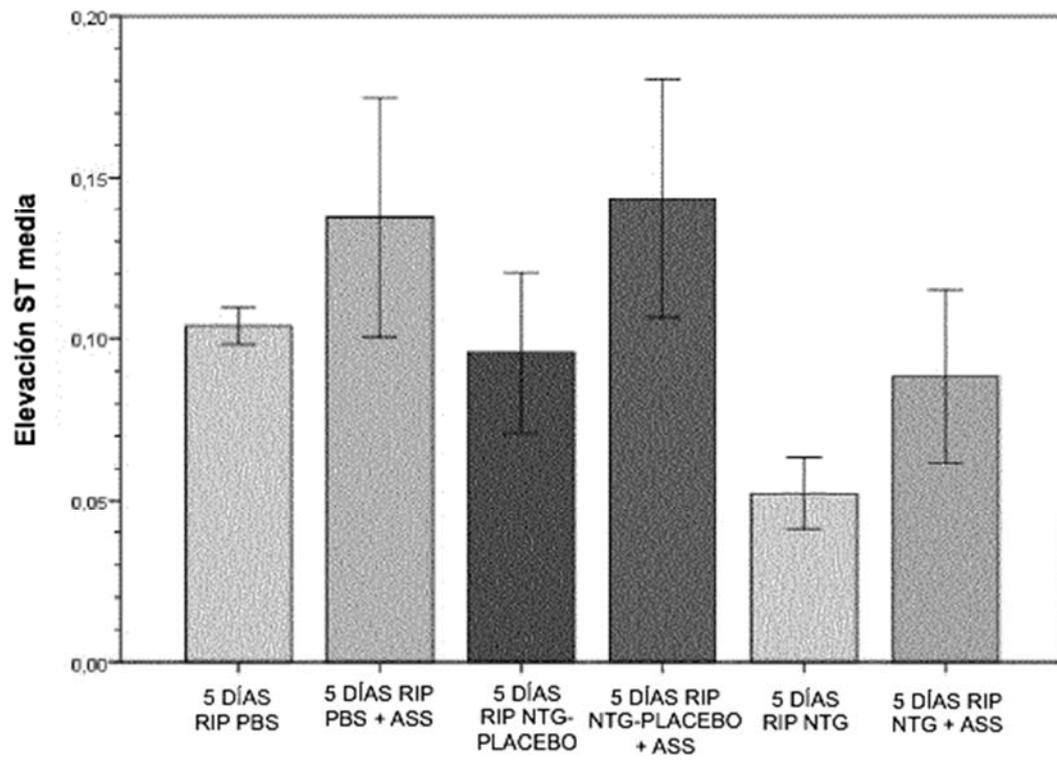


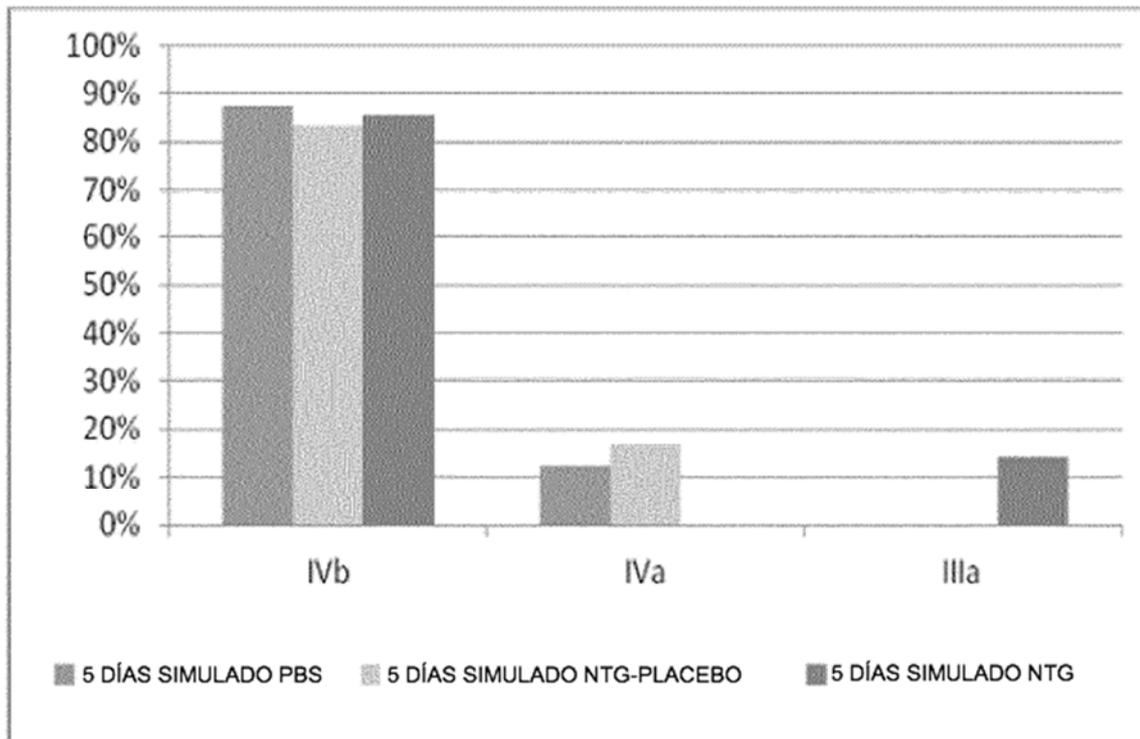
Figura 9



**Figura 10**



**Figura 11**



**Figura 12**

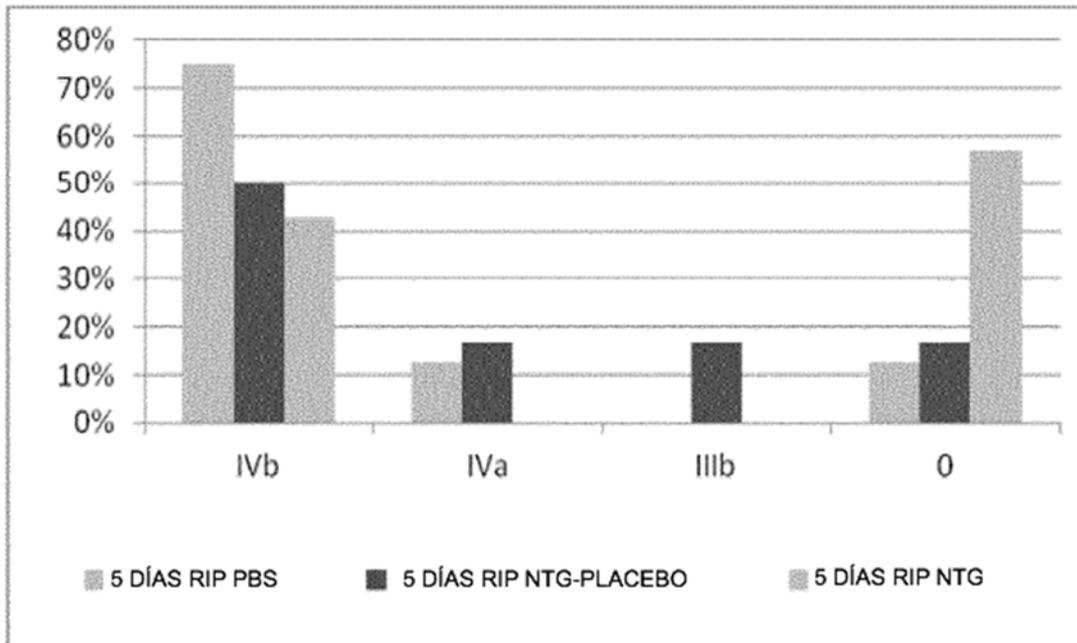
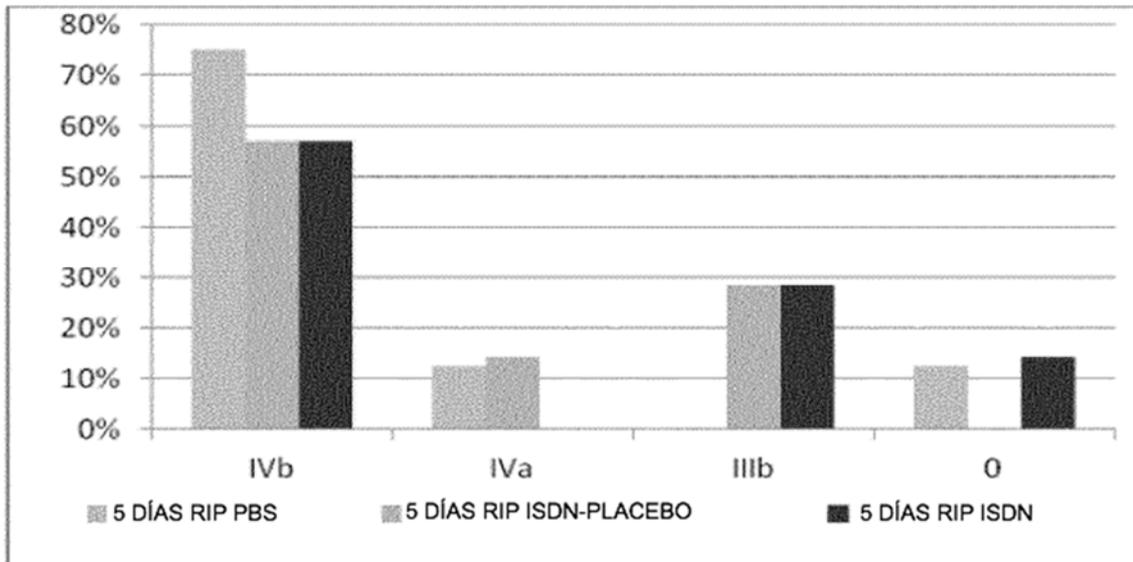


Figura 13



**Figura 14**

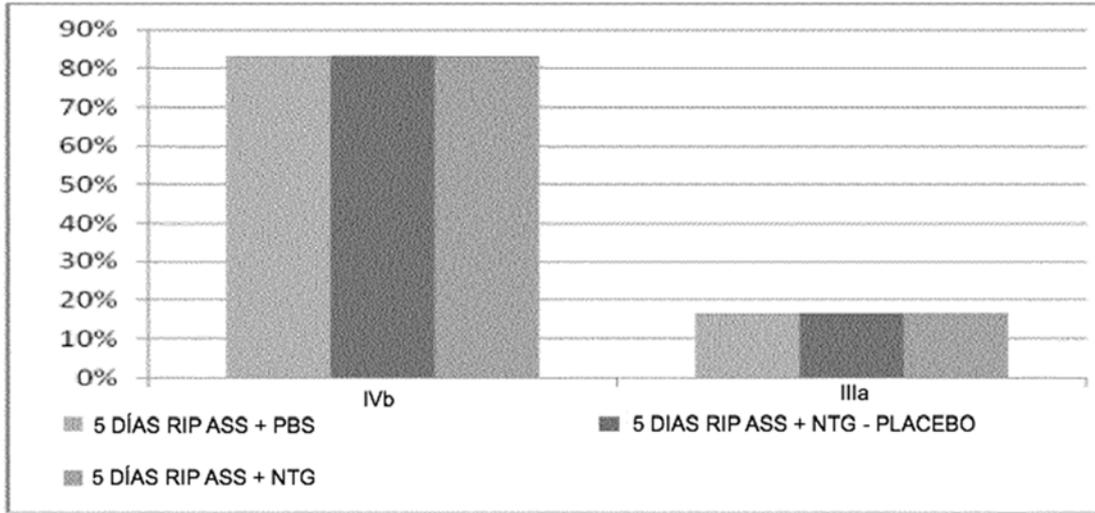


Figura 15

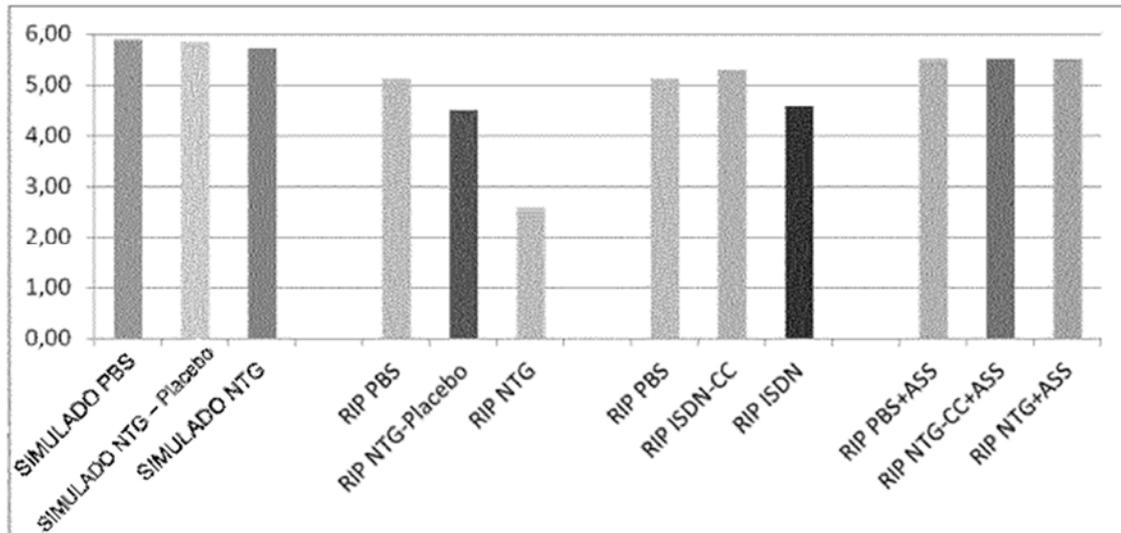


Figura 16

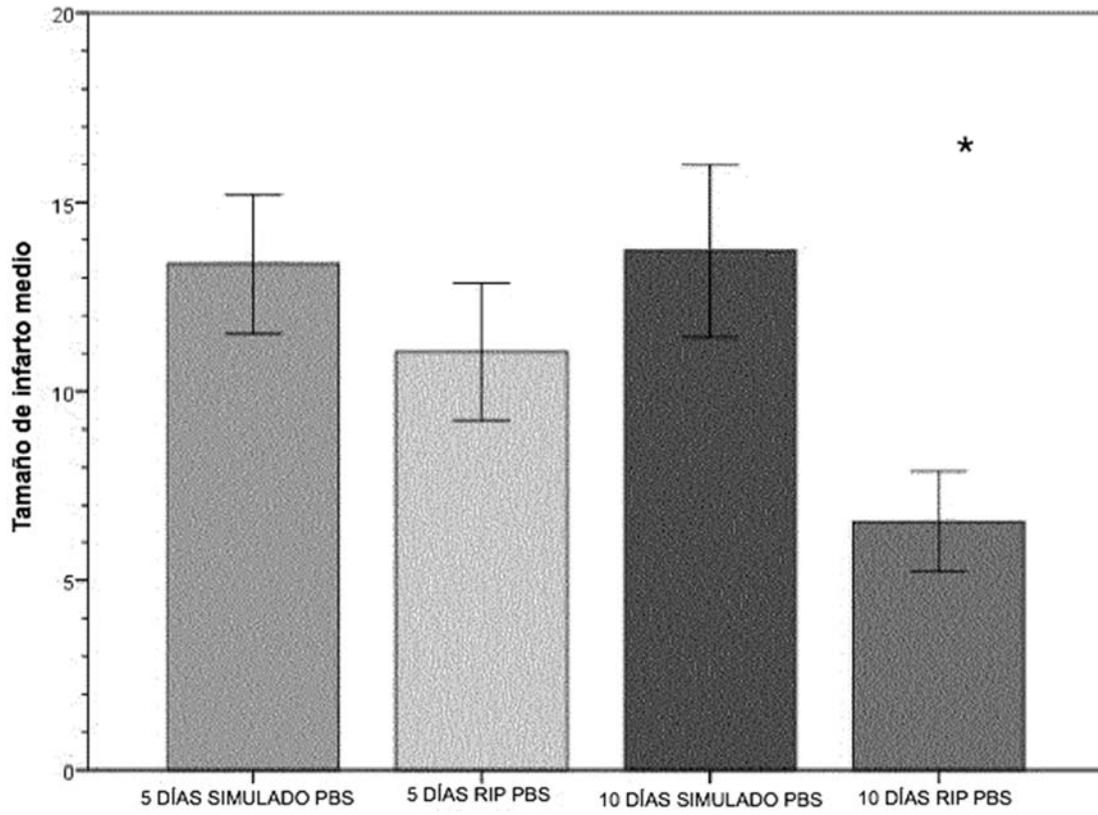


Figura 17

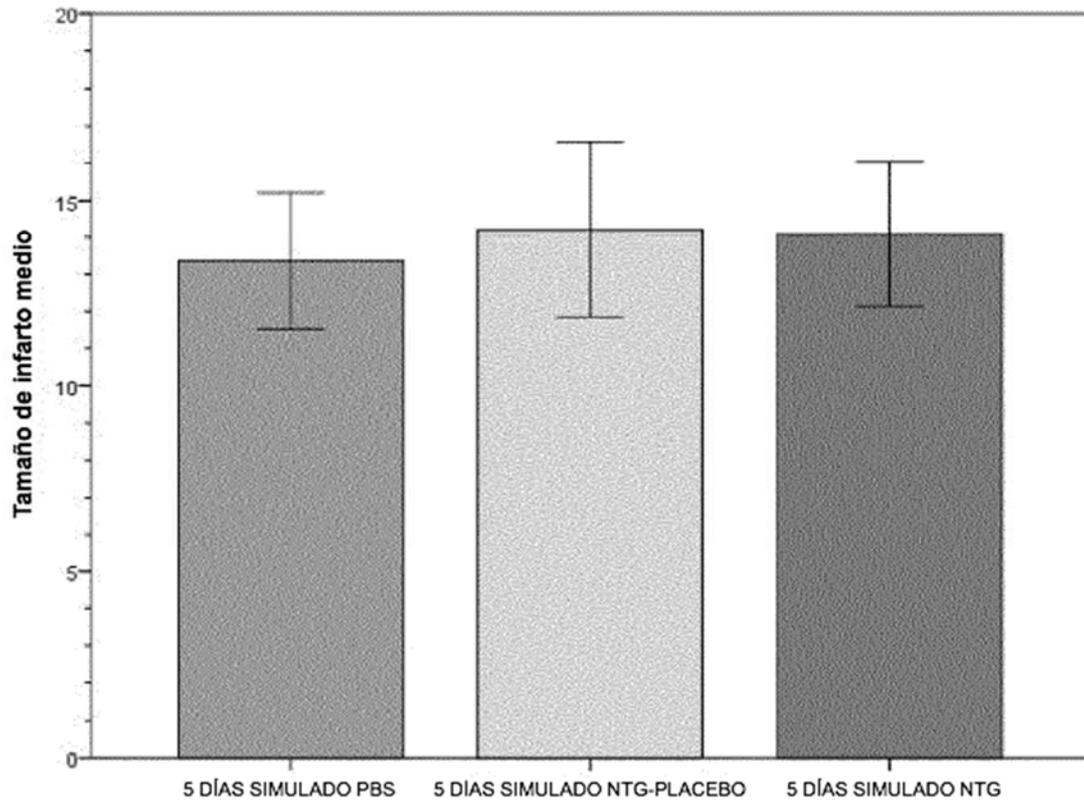


Figura 18

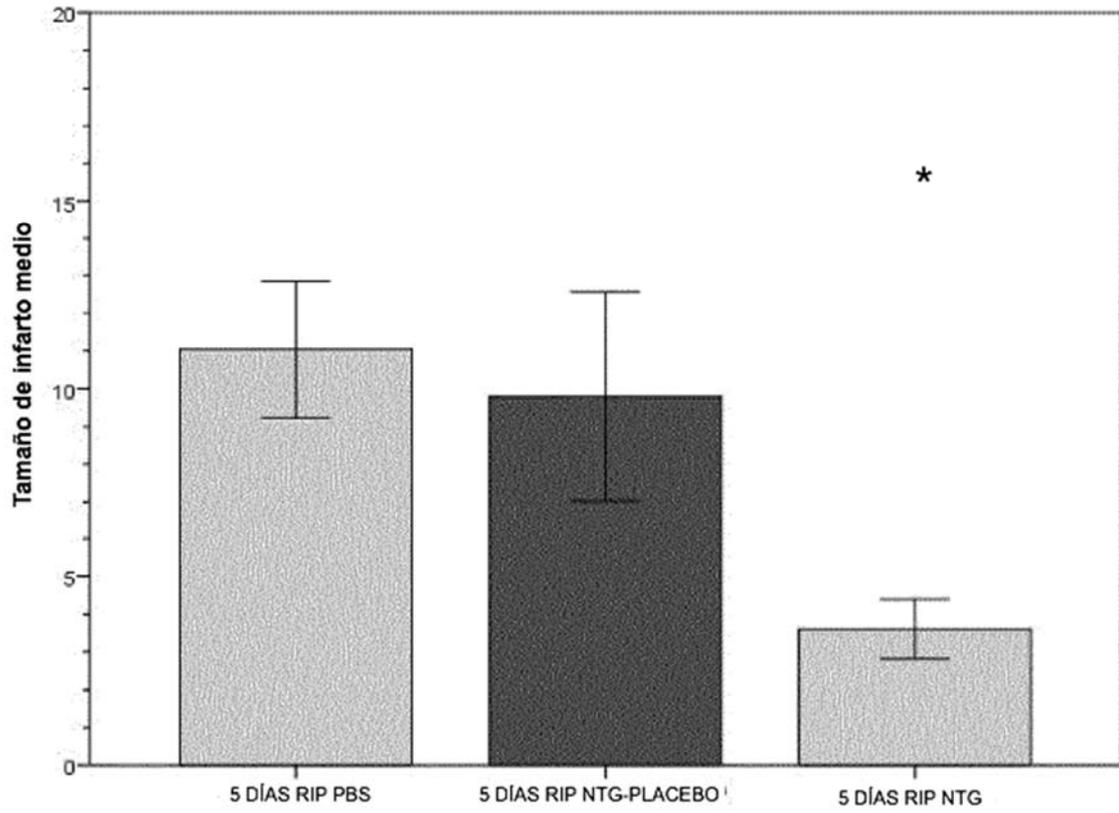


Figura 19

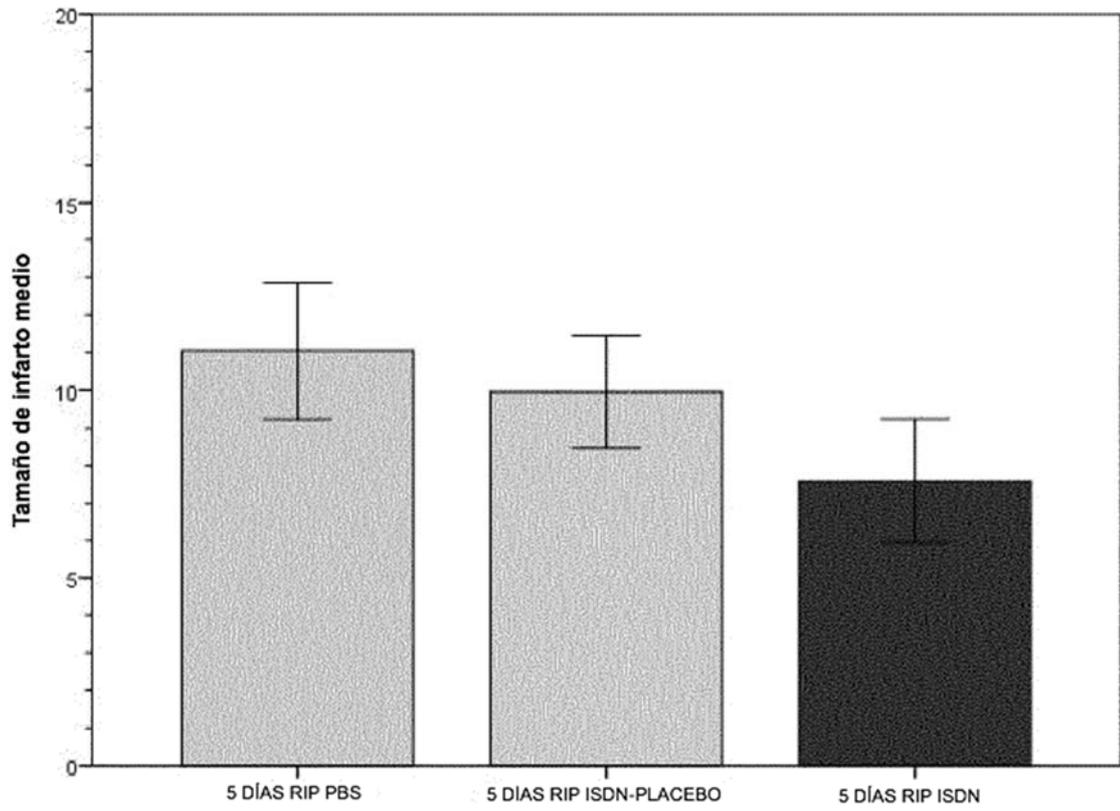
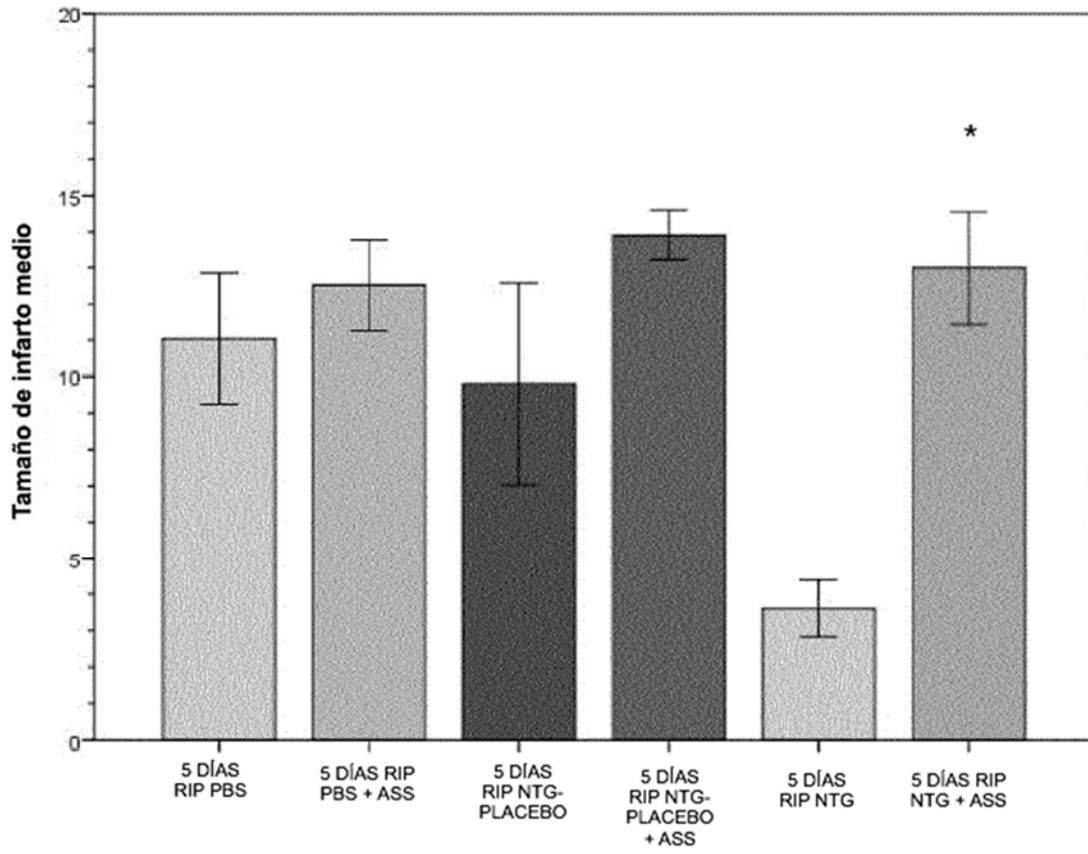
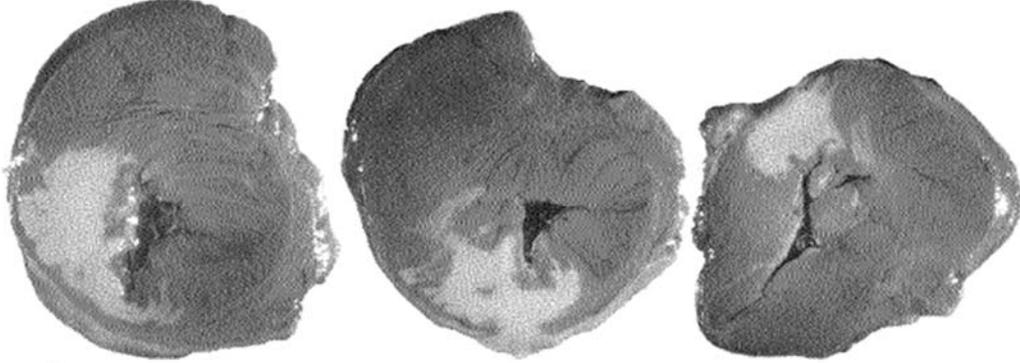


Figura 20

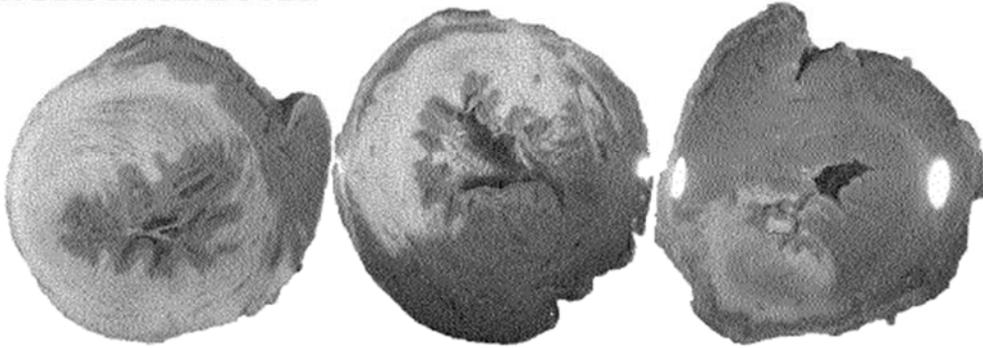


**Figura 21**

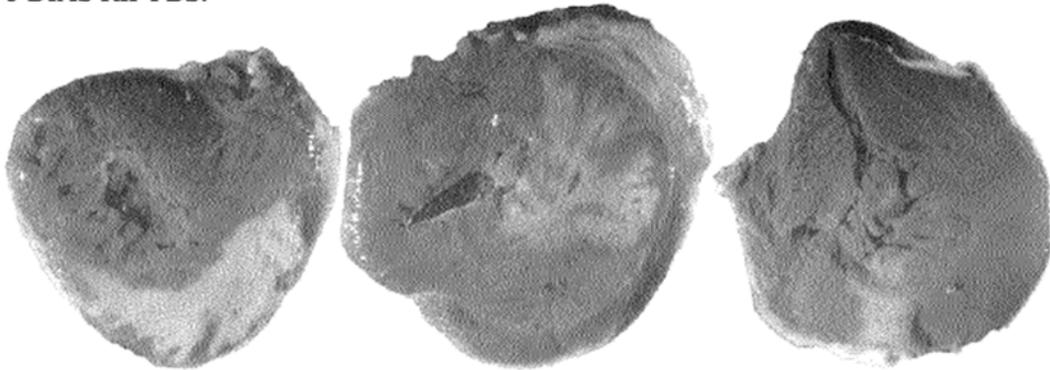
10 DÍAS RIP PBS:



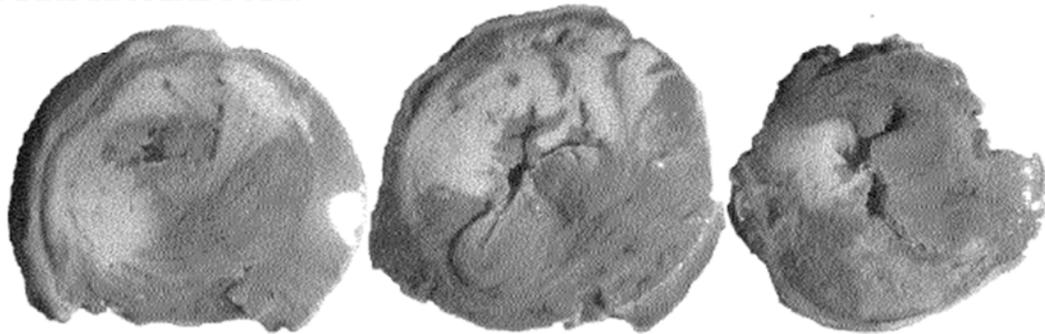
10 DÍAS SIMULADO PBS:



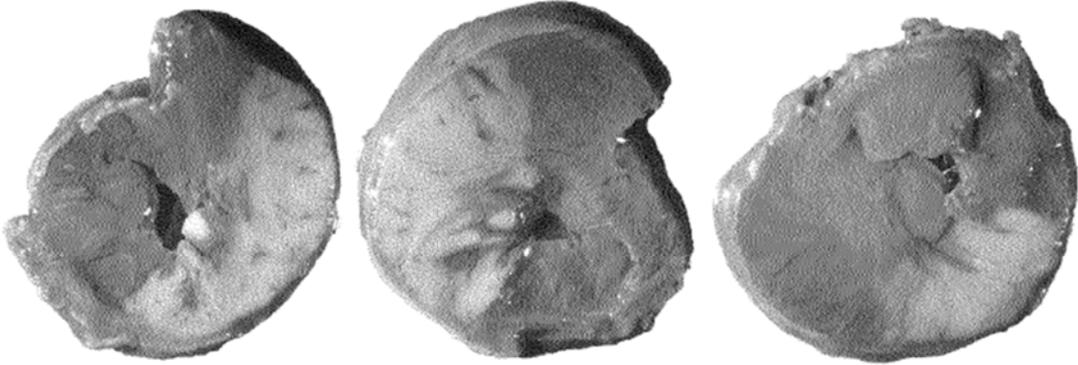
5 DÍAS RIP PBS:



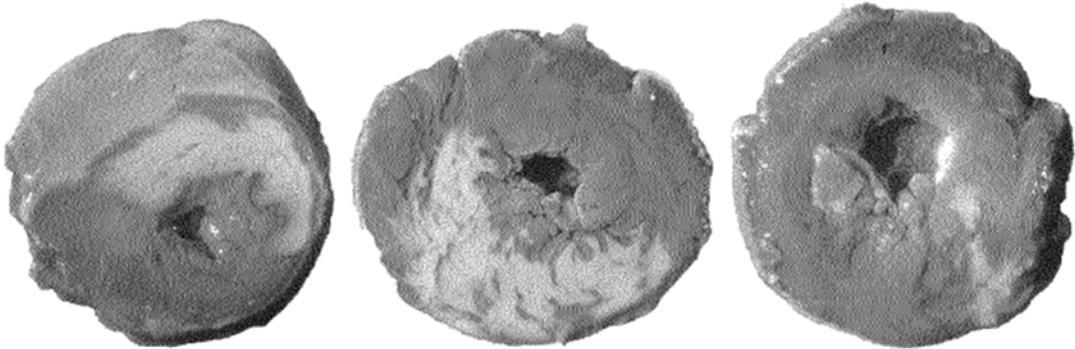
5 DÍAS SIMULADO PBS:



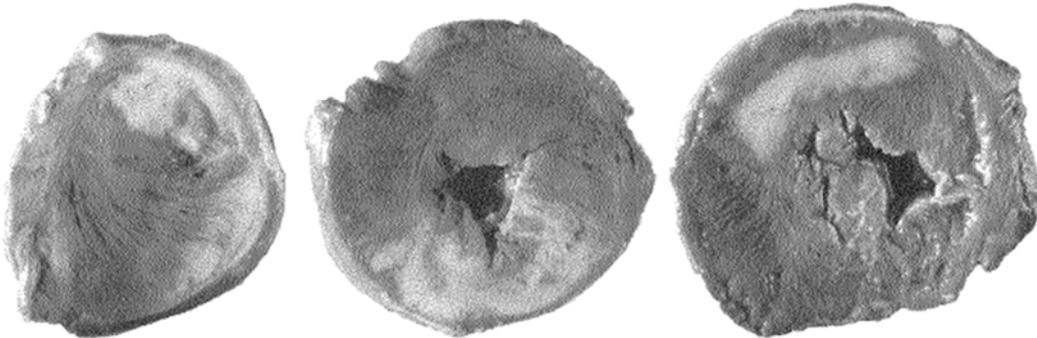
5 DÍAS SIMULADO NTG-PLACEBO:



5 DÍAS SIMULADO NTG:



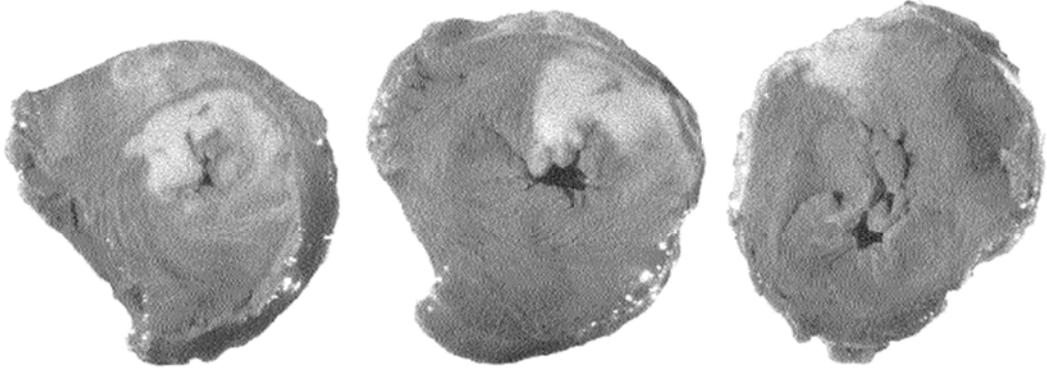
5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO:



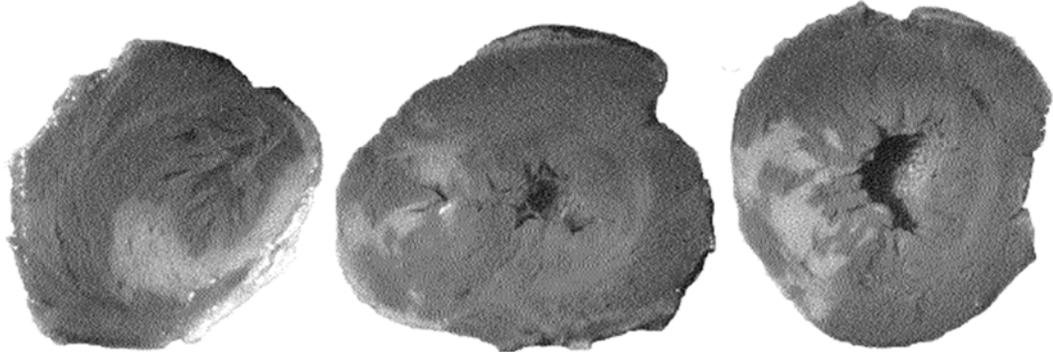
5 DÍAS RIP NTG:



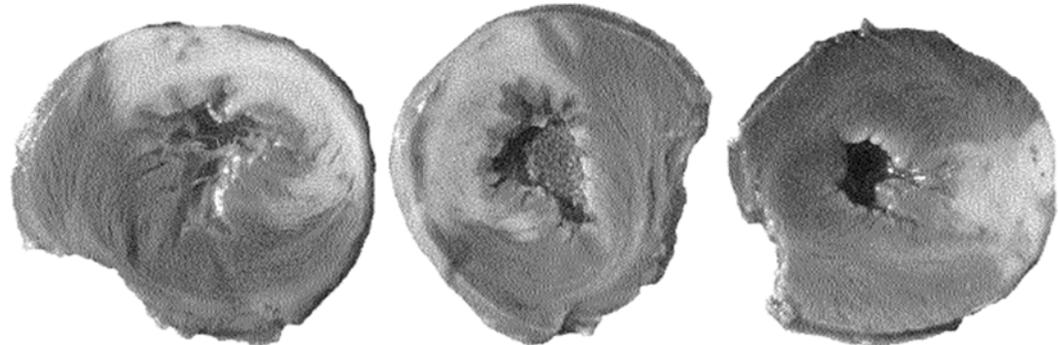
5 DÍAS RIP ISDN-PLACEBO:



5 DÍAS RIP ISDN:



5 DÍAS RIP ASA + PBS:



5 DÍAS RIP ASA + NTG-PLACEBO:



5 DÍAS RIP ASA + NTG:



Figura 22

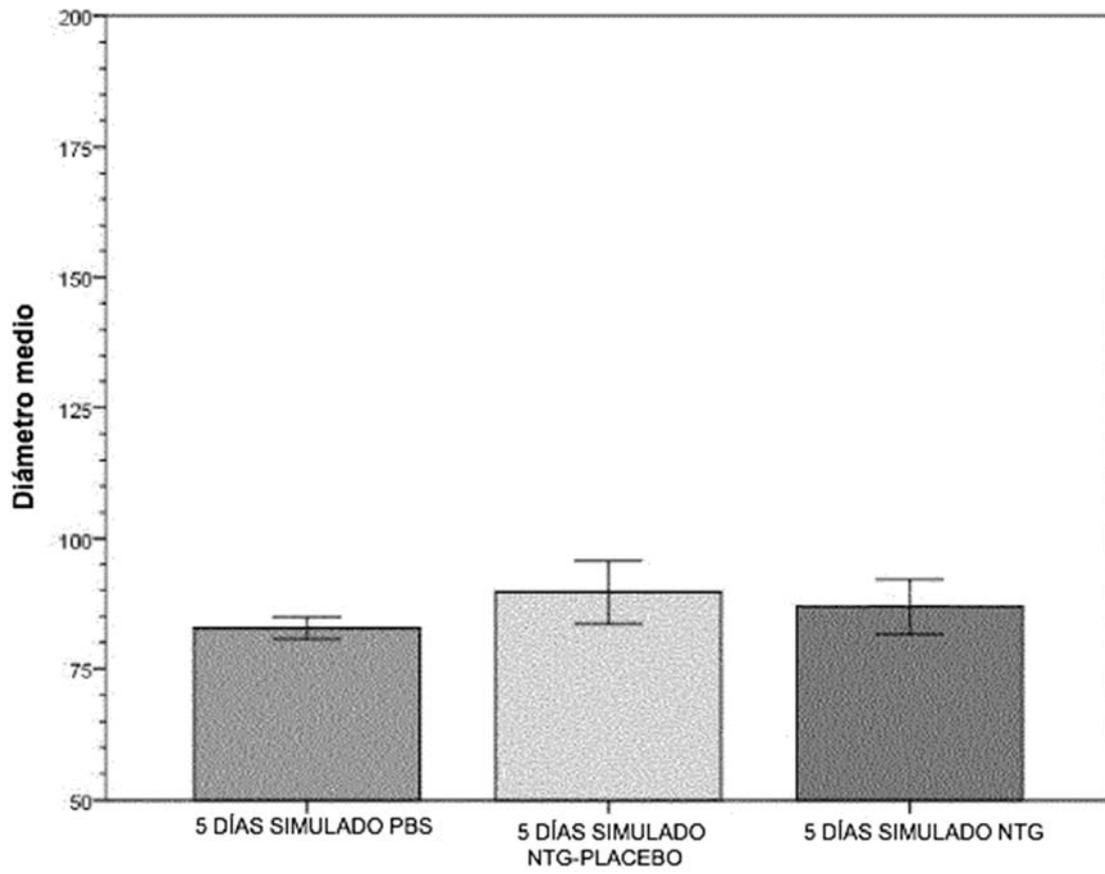


Figura 23

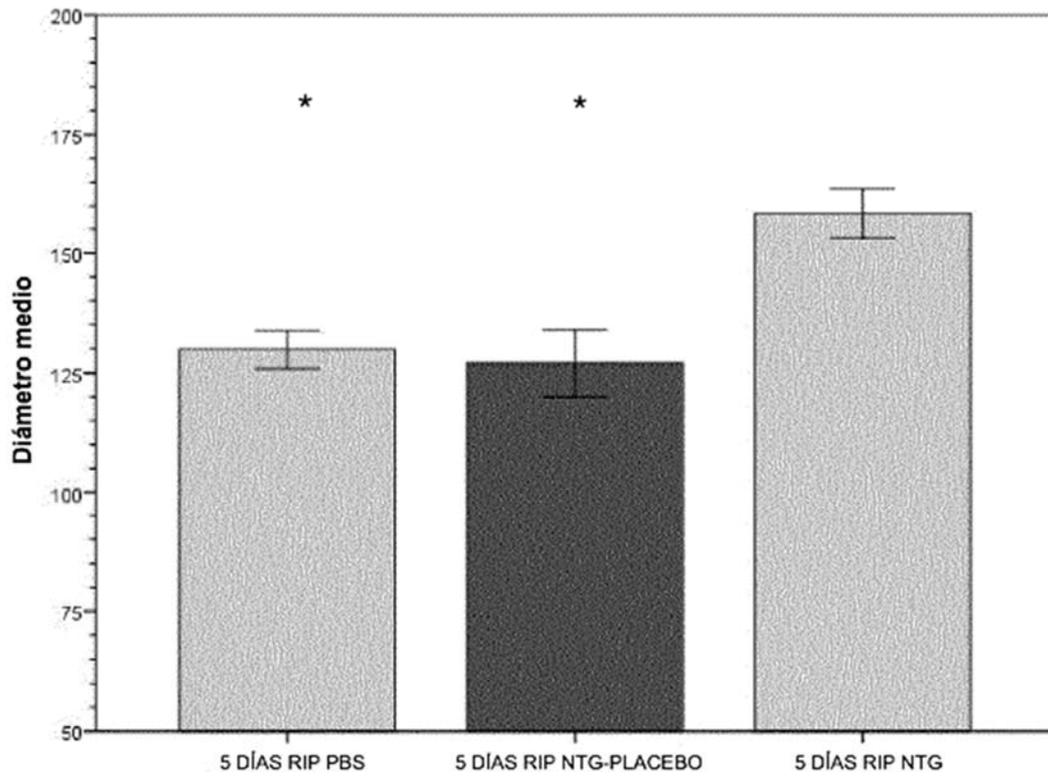


Figura 24

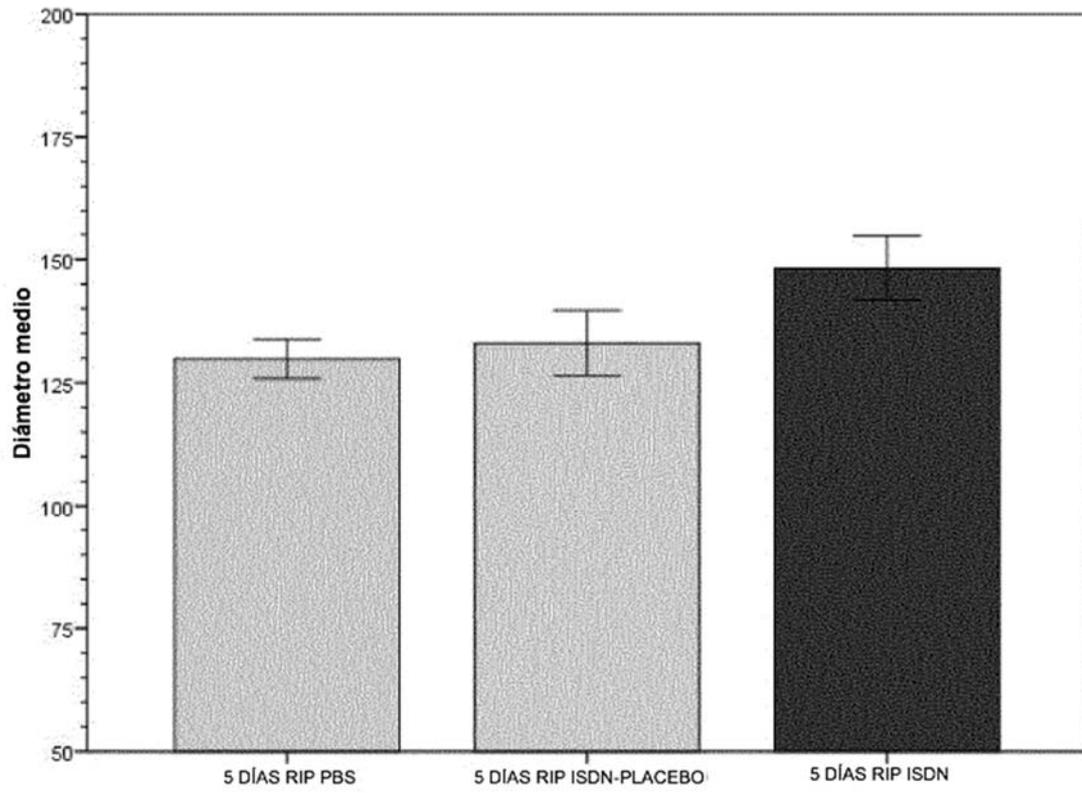


Figura 25

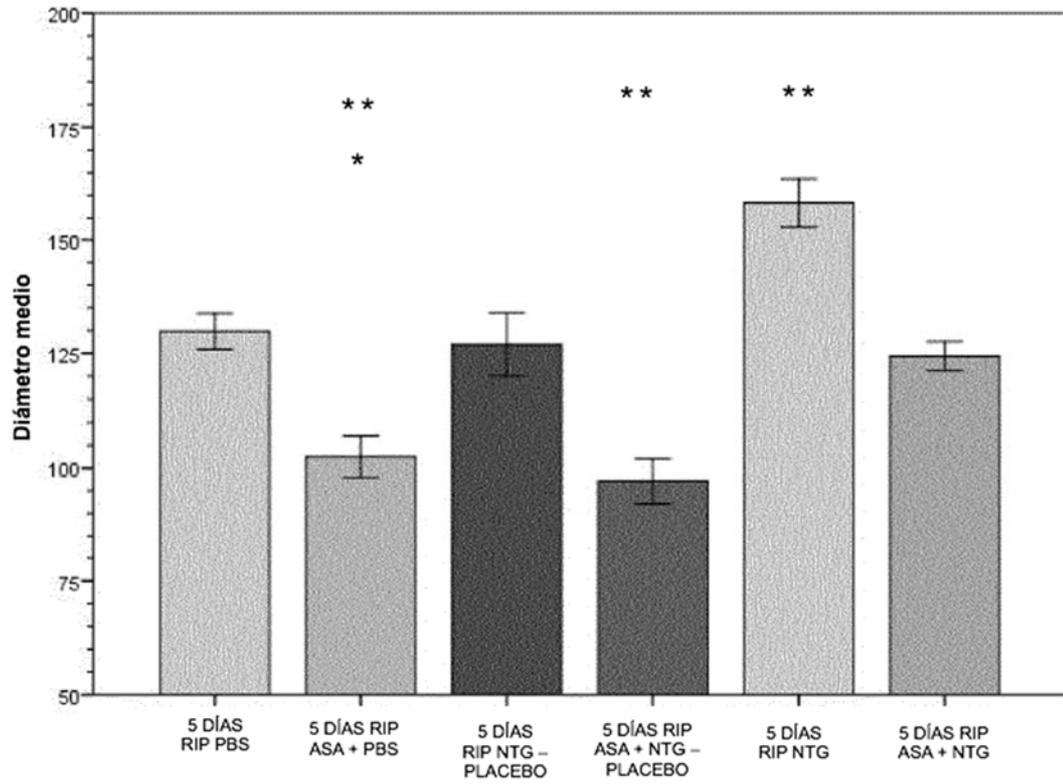


Figura 26

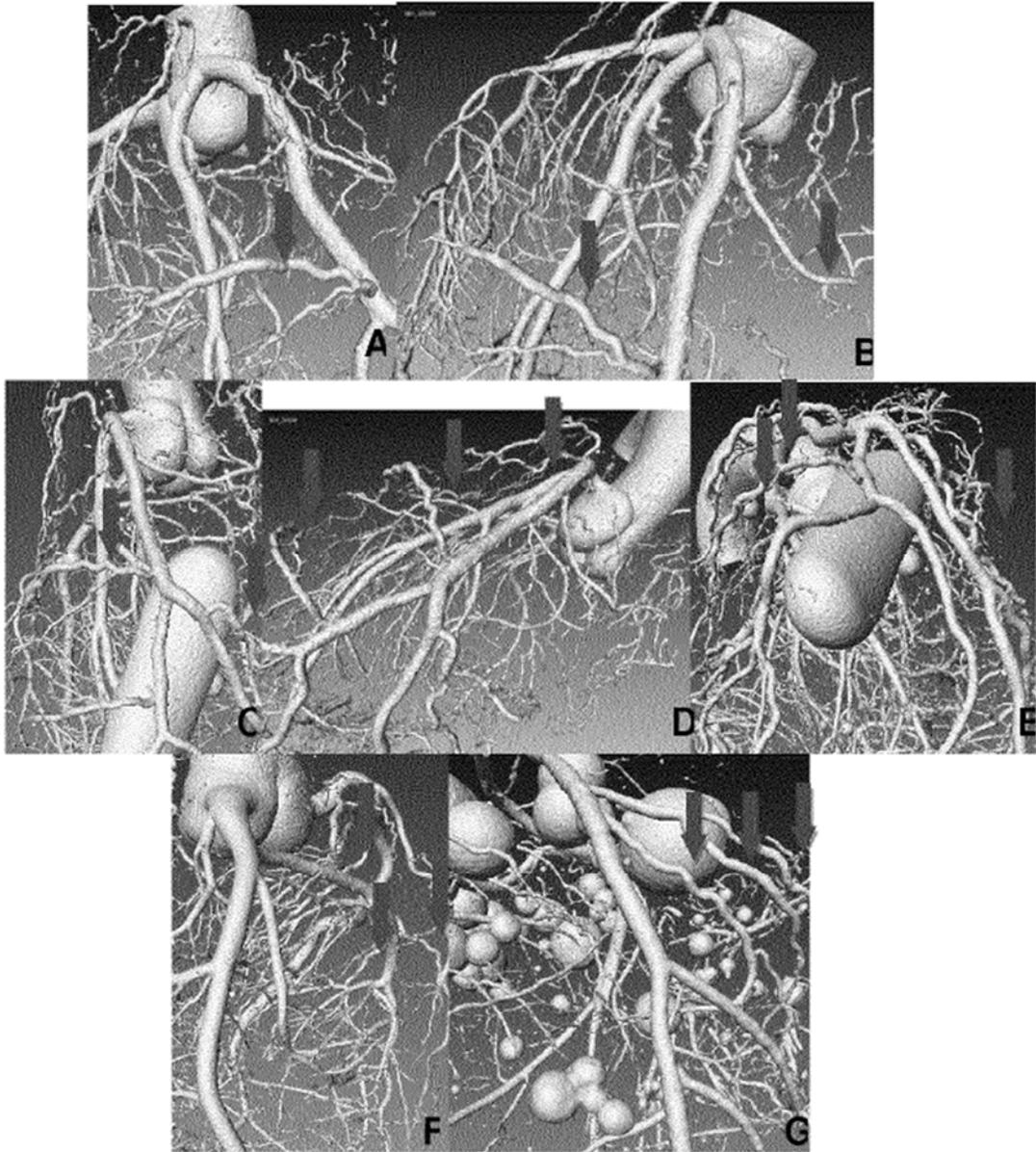


Figura 27

