

Efecto del losartán sobre la activación de plaquetas humanas por tromboxano A₂

José I. Guerra, Mercedes Montón, Juan A. Rodríguez-Feo, Jerónimo Farré, Ana M. Jiménez, Antonio Núñez, Juan Gómez, Luis Rico, Pedro Marcos, Carlos Castilla, Lourdes Sánchez de Miguel, Santos Casado y Antonio López-Farré

Laboratorio de Investigación Cardiovascular e Hipertensión. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Introducción y objetivo. Estudios previos han demostrado que el losartán, antagonista de los receptores de tipo AT-1 de la angiotensina II (Ang II) podría bloquear al receptor del tromboxano A₂ (TXA₂) en la pared vascular. El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto del losartán sobre la activación de plaquetas humanas.

Materiales y métodos. Las plaquetas fueron obtenidas de 15 voluntarios sanos con edades comprendidas entre los 26 y 40 años. La activación plaquetaria fue medida por cambios en la transmisión de luz del plasma rico en plaquetas estimuladas por un análogo sintético del TXA₂, el U46619 (5×10^{-6} mol/l).

Resultados. El U46619 estimuló la agregación de las plaquetas, siendo significativamente inhibida por el losartán de manera dosis dependiente. Sólo dosis altas del EXP 3174, el metabolito hepático principal del losartán, consiguieron inhibir la activación plaquetaria inducida por el U46619. Captopril, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, no fue efectivo en modificar la agregación plaquetaria inducida por el análogo del TXA₂. A pesar de que las plaquetas expresan receptores de tipo AT-1 de la Ang II, la Ang II exógena no modificó la agregación plaquetaria inducida por U46619. La unión del U46619 a las plaquetas fue competitivamente inhibida por el losartán en forma dependiente de la dosis. Sin embargo, sólo dosis altas de EXP 3174 redujeron la unión del U46619. Captopril no modificó la unión del U46619 a las plaquetas.

Conclusiones. Losartán disminuyó la agregación plaquetaria por un mecanismo dependiente de TXA₂. El EXP 3174 demostró una menor potencia que losartán en reducir la activación plaquetaria por TXA₂. El captopril y la Ang II exógena no tuvieron efecto sobre la activación de plaquetas humanas. Estos resultados sugieren que el losartán redujo la activación plaquetaria inducida por el TXA₂ por un mecanismo independiente del bloqueo de los receptores de tipo AT-1.

Palabras clave: Angiotensina. Plaquetas. Trombosis. Tromboxano.

(*Rev Esp Cardiol* 2000; 53: 525-530)

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

Recibido el 8 de julio de 1999.
Aceptado para su publicación el 23 de septiembre de 1999.

Effect of Losartan on Human Platelets Activation by Thromboxane A₂

Background and aim. Previous studies have demonstrated that losartan, an AT-1 receptor antagonist of angiotensin II (Ang II) could block the receptor of thromboxane A₂ (TXA₂) in the vascular wall. The aim of the present study was to assess the effect of losartan on human platelet activation.

Material and methods. Platelets were obtained from 15 healthy men between the age 26 and 40. Platelet activation was measured by changes in the light transmission of platelet-rich plasma stimulated by a synthetic TXA₂ analogue, U46619 (5×10^{-6} mol/l).

Results. The U46619-stimulated platelet aggregation was significantly inhibited by losartan in a dose-response manner. Only a high dose of EXP 3174 (5×10^{-5} mol/l), the in vivo active metabolite of losartan, was able to attenuate U46619-induced platelet activation. Captopril, an angiotensin I-converting inhibitor failed to modify U46619-induced platelet aggregation. Despite the platelets expressing AT-1 type receptors, of Ang II exogenous Ang II did not modify platelet aggregation induced by U46619. The binding of U46619 to platelets was competitively inhibited by losartan in dose-dependent manner. However, only a high dose of EXP 3174 reduced the binding of U46619. Captopril failed to modify the binding of U46619 to platelets.

Conclusions. Losartan decreased platelet aggregation by a TXA₂-dependent mechanism. EXP 3174 showed a lesser potency than losartan to reduce TXA₂-platelet activation. Captopril and exogenous angiotensin II had no effect on human platelet activation. These results suggest that losartan reduced TXA₂-dependent platelet activation independently of the blockade of AT-1 receptors.

Key words: Angiotensin. Platelets. Thrombosis. Thromboxane.

(*Rev Esp Cardiol* 2000; 53: 525-530)

INTRODUCCIÓN

El péptido angiotensina II (Ang II) desempeña un importante papel en alteraciones cardíacas y vasculares. La estimulación del receptor AT-1 ha sido asociado con muchas de las acciones biológicas conocidas de la

ABREVIATURAS

AngII: angiotensina II.
 TXA₂: tromboxano A₂.
 U46619: análogo sintético del tromboxano A₂.
 PRP: plasma rico en plaquetas.
 PPP: plasma pobre en plaquetas.
 PLT: plaquetas.
 PGH₂: prostaglandina H₂.

Ang II. El losartán es un potente antagonista de los receptores AT-1 no peptídico que produce una inhibición de la vasoconstricción inducida por la Ang II¹. El losartán disminuye la presión arterial en sujetos hipertensos, así como en modelos animales de hipertensión^{2,3}. El EXP 3174, el principal metabolito hepático del losartán, es aproximadamente de 10 a 15 veces más potente que el losartán en antagonizar el receptor AT-1¹.

La evaluación del losartán en el estudio ELITE ha demostrado que el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca con losartán causó una aparente mejoría en el índice de supervivencia, comparado con los tratados con captopril, un inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina I⁴. Esta mejoría en la mortalidad en los pacientes tratados con losartán fue debida a una reducción en la muerte súbita cardíaca. Tanto la activación y la agregación plaquetaria, seguidas de trombosis, parecen contribuir al mecanismo de muerte súbita cardíaca⁵.

El TXA₂ es un amplificador en la señal de la activación plaquetaria, siendo sintetizado y liberado en respuesta a una gran variedad de agonistas, como por ejemplo el adenosín difosfato^{6,8}. Li et al han demostrado recientemente que el losartán puede antagonizar el receptor de tromboxano A₂ (TXA₂)/prostanglandina H₂ en arteria coronaria de perro⁹. Además, el losartán redujo de forma dosis-dependiente la hipertensión pulmonar inducida por una agonista del receptor de TXA₂ *in vivo*¹⁰.

Por tanto, basándonos en todos estos hallazgos, el objetivo del presente estudio fue analizar el efecto del losartán sobre la activación de plaquetas humanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El [³H]-U46619 fue obtenido de Dupont NEN, Boston, MA. El losartán y EXP 3174 (metabolito hepático activo del losartán) fueron obtenidos por Meck, Sharp and Dohme, S.A. El resto de compuestos químicos, incluido el captopril, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EE.UU.).

Preparación del plasma rico en plaquetas y agregación plaquetaria

El plasma rico en plaquetas (PRP) fue aislado de sangre periférica de 15 voluntarios sanos, recogido en 5% (v/v) de citrato-dextrosa y centrifugado a 1.000 rpm durante 10 min. Los voluntarios no habían recibido ningún fármaco en los 20 días antes de realizar los experimentos. El PRP fue recogido y el número de plaquetas fue ajustado con plasma pobre en plaquetas (PPP), obteniendo del mismo donante hasta 14×10^7 células/ml de plasma. La activación plaquetaria fue evaluada en un lumiagregómetro (Aggrecorder de dos canales, Chrono-log Corporation Hovertown, Pennsylvania, EE.UU.) por cambios en la transmisión de luz^{11,12}. El PPP fue usado como control del 100% de transmisión de luz.

El PRP (500 µl) fue preincubado a 37 °C durante 3 min en el agregómetro con continuo movimiento (600 g) y posteriormente las plaquetas se estimularon con un agonista del TXA₂, el U46619 (5×10^{-6} mol/l).

Para estandarizar las medidas, sólo se usaron los valores de turbidez a los 6 min para los cálculos. Este período de tiempo corresponde al máximo valor de la primera onda de la agregación plaquetaria. Esta primera onda representa mejor la activación que la agregación plaquetaria y es parcialmente reversible. Losartán, EXP 3174 o captopril fueron añadidos a las plaquetas 5 min antes de que fueran estimuladas con el U46619. Se realizaron curvas dosis-respuesta de losartán y EXP3174, siendo la dosis mínima utilizada 5×10^{-9} mol/l y la máxima 5×10^{-5} mol/l. En el caso del captopril se utilizó una dosis de 5×10^{-5} mol/l.

En todos los casos, la medida basal comparativa fue realizada en presencia del disolvente de los fármacos, 0,8% de NaHCO₃ (bicarbonato sódico).

Ensayo de unión del receptor del TXA₂

La unión del [³H]-U46619 (Dupont NEN, Boston, MA) a las plaquetas se realizó como describieron Kattelman et al¹³. El PRP fue incubado con 1 mmol/l de ácido acetilsalicílico durante 30 min a 37 °C con el fin de inhibir la formación de TXA₂ endógeno. Entonces, las plaquetas fueron centrifugadas a $1.100 \times g$ durante 10 min y resuspendidas en tampón HEPES/Tyrode's (134 mmol/l de NaCl; 12 mmol/L NaHCO₃, 2,9 mmol/L KCl, 0,34 mmol/l de NaHPO₄; 1 mmol/l de MgCl₂; 10 mmol/l HEPES; 5 mmol/l de dextrosa; un 0,3% de BSA y un pH de 7,4) hasta una concentración final de 3×10^8 plaquetas/ml. La suspensión de plaquetas se incubó con 4 nmol/l de [³H]-U46619 en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de losartán y EXP 3174 durante 30 min a 37 °C.

La unión específica se determinó utilizando un exceso de 1.000 veces de U46619 no marcado. La reacción se paró mediante centrifugación a $7.000 \times g$ du-

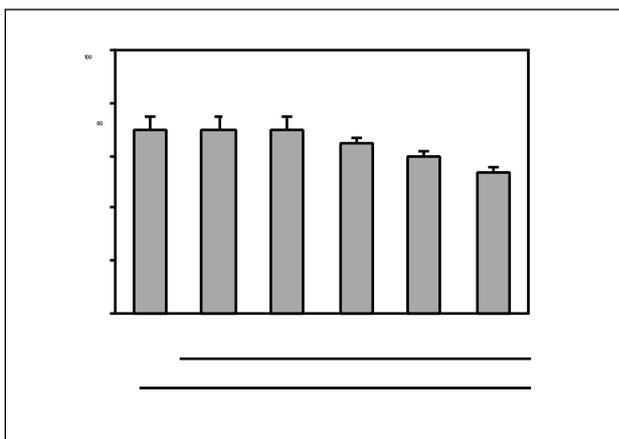


Fig. 1. En la gráfica de barras se observa el efecto de concentraciones crecientes de losartán sobre la activación plaquetaria inducida por un análogo del TXA₂, el U46619 (5 × 10⁻⁶ mol/l). La activación plaquetaria se representa como el porcentaje de transmisión de luz 6 min después de la adición de U46619. Los resultados se representan como la media ± error estándar de la media de 5 experimentos diferentes. * p < 0,05 con respecto al porcentaje de la transmisión de luz en ausencia de losartán.

rante 10 min a 4 °C. El pellet fue lavado dos veces con tampón frío y transferido a un vial de centelleo para su recuento en contador de centelleo líquido (Beckman Instrument Inc., Fullerton, CA).

Método estadístico

Los resultados fueron expresados como la media ± error estándar de la media (EEM). Para determinar la significación estadística se realizó un test de ANOVA y corrección de Bonferroni de comparación múltiple o el test de la t de Student (apareado o no apareado). Un valor de p < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Efecto del losartán sobre la activación plaquetaria

El porcentaje de transmisión de luz observado en las plaquetas humanas activadas con el agonista del TXA₂, el U46619 (5 × 10⁻⁶ mol/l) fue de 72 ± 4 (n = 5). El losartán redujo de forma significativa la activación plaquetaria inducida por el U46619 de forma dependiente de la dosis (fig. 1). Se observó una inhibición significativa de la activación de las plaquetas con una concentración de losartán de 5 × 10⁻⁷ mol/l (fig. 1). El máximo efecto del losartán se obtuvo a 5 × 10⁻⁵ mol/l, que fue la dosis máxima utilizada en estos estudios. Esta concentración fue usada para los siguientes experimentos.

El dato representado en la figura 1 fue obtenido 6 min después del estímulo y corresponde a la máxima

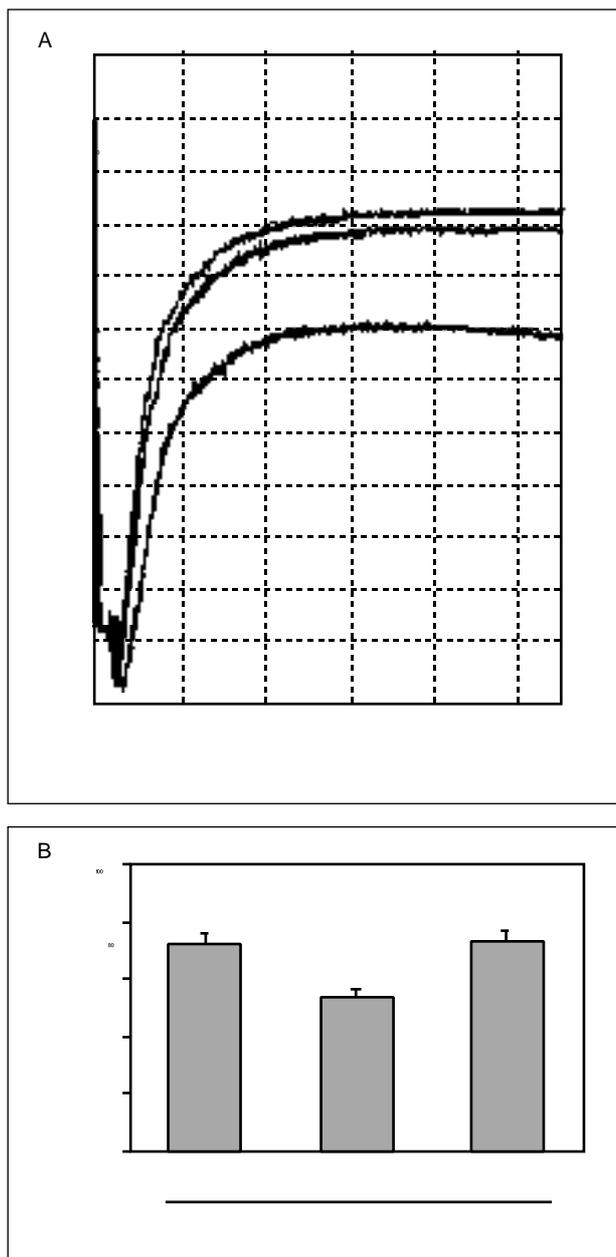


Fig. 2. A: la gráfica es un trazado real de la agregación plaquetaria en respuesta al U46619 (5 × 10⁻⁶ mol/l). Se representa también un experimento en presencia de un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, el captopril (5 × 10⁻⁵ mol/l), y del antagonista de los receptores AT-1 de angiotensina II, el losartán (5 × 10⁻⁵ mol/l). B: en la gráfica de barras se exponen los resultados de 15 experimentos diferentes similares a los de la gráfica A. Los resultados están representados como la media ± error estándar de la media. * p < 0,005 con respecto al U46619 solo.

activación plaquetaria (fig. 2A). Sin embargo, las curvas de turbidimetría en presencia o ausencia del losartán fueron ya diferentes cuando fueron medidas 1 min después de comenzar los experimentos (fig. 2A). La adición de un inhibidor de la enzima de conversión, captopril (5 × 10⁻⁵ mol/l) no modificó la activación plaquetaria inducida por el U46619 (figs. 2A y B).

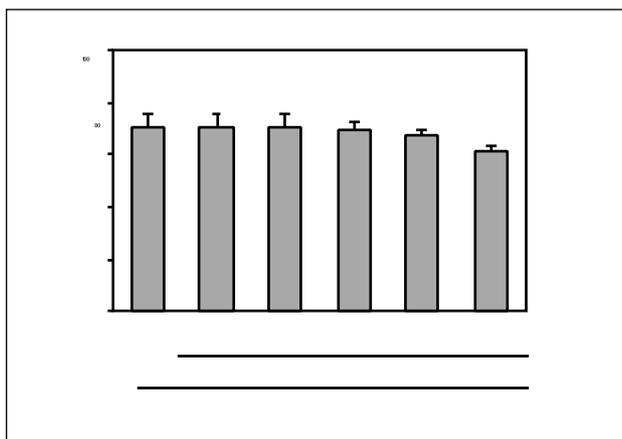


Fig. 3. En la gráfica de barras se observa el efecto de concentraciones crecientes del metabolito hepático activo del losartán, el EXP 3174, sobre la activación plaquetaria inducida por el U46619 (5×10^{-6} mol/l). La activación plaquetaria fue representada como el porcentaje de transmisión de luz 6 minutos después de la adición de U46619. Los resultados están representados como la media \pm error estándar de la media de 5 experimentos diferentes. * $p < 0,05$ con respecto al porcentaje de transmisión de luz en ausencia del EXP 3174.

El metabolito hepático principal del losartán, EXP 3174, también disminuyó la activación de las plaquetas inducida por U46619 (fig. 3). Sin embargo, sólo la máxima dosis del EXP 3174 (5×10^{-5} mol/l) indujo una inhibición que alcanzó significación estadística (fig. 3). Ninguna otra dosis de EXP 3174 modificó de forma significativa la activación de las plaquetas inducida por U46619 (fig. 3).

La preincubación de las plaquetas con EXP 3174 (5×10^{-6} mol/l) no cambió el efecto de 5×10^{-6} mol/l de losartán sobre la estimulación de las plaquetas con el U46619 (porcentaje de transmisión de luz: losartán = 60 ± 1 ; EXP 3174 + losartán = 57 ± 2 ; $n = 5$; $p = \text{NS}$).

La activación espontánea de las plaquetas (porcentaje de transmisión de luz $< 5\%$) no fue modificada por la incubación de PRP con 5×10^{-5} mol/l de losartán, 5×10^{-5} mol/l de EXP 3174 o 5×10^{-5} mol/l de captopril (porcentaje de transmisión de luz: losartán = 4 ± 2 ; EXP 3174 = 4 ± 1 ; captopril: 5 ± 1 ; $n = 5$; $p = \text{NS}$).

Efecto de la angiotensina II sobre la activación plaquetaria

No se observó ningún efecto de la Ang II (10^{-7} mol/l) sobre la activación plaquetaria inducida por 5×10^{-5} mol/l de U46619 (porcentaje de transmisión de luz: 5×10^{-5} mol/l del U46619 = 85 ± 3 ; 5×10^{-5} mol/l de U46619 + 10^{-7} mol/l de Ang II = 88 ± 2 ; $n = 6$; $p = \text{NS}$). Se realizaron también experimentos en presencia de dosis menores de U46619 (5×10^{-6} mol/l) con el fin de asegurarnos de que la falta de respuesta de las plaquetas a la Ang II exógena no fuera debida a que estuviéramos obteniendo una respuesta máxima con $5 \times$

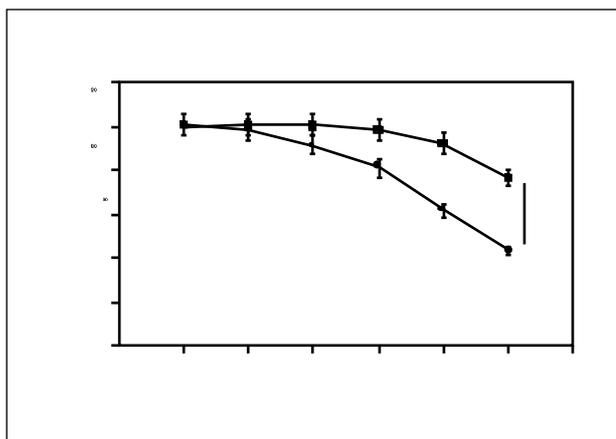


Fig. 4. Esta gráfica representa los experimentos de unión del [^3H]-U46619 y su desplazamiento por concentraciones crecientes de losartán y EXP 3174 no marcados. La suspensión de plaquetas fue incubada con 4 nmol/l [^3H]-U46619 en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de losartán y EXP 3174. La unión específica se calculó usando concentraciones 1.000 veces superiores del U46619 no marcado. La figura representa la media \pm error estándar de la media de 5 diferentes experimentos. * $p < 0,05$ con respecto al EXP 3174. * $p < 0,05$ con respecto a la ausencia del fármaco correspondiente.

10^{-5} mol/l de U46619 y, por tanto, no observaríamos potenciación de esa respuesta. La Ang II tampoco modificó la activación plaquetaria inducida por una dosis menor de U46619 (5×10^{-6} mol/l). En ausencia del agonista de TXA_2 , la adición de Ang II a las plaquetas no indujo ningún tipo de modificación de la agregación espontánea (porcentaje de transmisión de luz $< 5\%$).

Finalmente, analizamos si la falta de respuesta a la Ang II por las plaquetas se debía a una rápida degradación del péptido por la angiotensinasa. Para ello utilizamos un inhibidor de la angiotensinasa, el 1,10-0 fenantrolina. En presencia del inhibidor de la angiotensinasa, el 1,10-0 fenantrolina (5×10^{-6} mol/l), la Ang II (10^{-7} mol/l) tampoco modificó la activación plaquetaria inducida por el U46619 (porcentaje de transmisión de luz: U46619 = 72 ± 4 , U46619 + Ang II + 1,10-0 fenantrolina = 76 ± 3 ; $n = 6$; $p = \text{NS}$).

Interacción del losartán con el receptor del TXA_2

El desplazamiento de la unión del [^3H]-U46619 a las plaquetas humanas por el losartán se expone en la figura 4. El losartán compitió de forma dosis-dependiente con el radioligando U46619, obteniéndose un 50% de inhibición de la unión (IC₅₀) con 8×10^{-7} mol/l de losartán. El metabolito del losartán, EXP 3174, redujo de forma significativa la unión del [^3H]-U46619 sólo al testar una dosis máxima de 5×10^{-5} mol/l (fig. 4). Por otro lado, el captopril (5×10^{-5} mol/l) no modificó la unión del [^3H]-U46619 a las plaquetas (porcentaje de unión específica del [^3H]-U46619 en presencia de 5×10^{-5} mol/l de captopril = 98 ± 1 ; $n = 5$; $p = \text{NS}$).

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo aportan nuevas evidencias que demuestran efectos antiagregantes del antagonista de los receptores AT-1 de la Ang II, el losartán. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el losartán actúa como un agente inactivador plaquetario independientemente de sus efectos sobre los receptores de tipo AT-1 de la Ang II.

Losartán redujo de forma dosis dependiente la activación de las plaquetas humanas inducida por el análogo del TXA₂, U46619, disminuyendo además la unión del TXA₂ sobre su receptor plaquetario. Con el inhibidor de la enzima de conversión de la Ang I, captopril, no se observaron estos efectos.

Estudios previos han sugerido que el losartán podría interferir sobre el receptor del TXA₂/PGH₂ en la pared vascular. Li et al habrían demostrado que el losartán inhibe la constricción inducida por TXA₂ de las arterias coronarias de perro⁹. Además, el losartán reduce la hipertensión pulmonar inducida por un agonista de TXA₂, el U46619¹⁰. Más recientemente, Corriu et al demostraron que el losartán puede actuar como un antagonista competitivo del receptor del TXA₂ en aortas de rata desnuda de endotelio¹⁴.

La capacidad del losartán para inhibir el receptor del TXA₂/PGH₂ no fue compartida por el EXP 3174, el metabolito activo *in vivo* del losartán. El EXP 3174 tiene una vida media en el plasma mayor que el losartán y es aproximadamente 10-15 veces más potente en bloquear el receptor AT-1¹. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que no ocurre lo mismo para el caso del bloqueo del receptor de TXA₂ plaquetario. Otros efectos diferentes entre el losartán y el EXP 3174 han sido previamente publicados. En este sentido, los efectos uricosúricos del losartán en pacientes hipertensos esenciales e hipertensos con alteraciones renales han sido también atribuidos al losartán y no al EXP 3174, aunque los mecanismos por los que esto ocurre no están aún aclarados^{15,16}. Ambos, losartán y EXP 3174, contienen en su molécula un grupo imidazol, siendo la única diferencia estructural entre el metabolito y el losartán un grupo hidroxilo existente en el losartán que, por un mecanismo de oxidación, se convierte en un grupo carboxilo¹. Serían, por tanto, necesarios estudios con otros antagonistas AT-1 que contengan o no este tipo de radicales para poder dilucidar su importancia en la interacción con el receptor del TXA₂/PGH₂.

El estudio ELITE ha demostrado recientemente que el losartán redujo la muerte súbita cardíaca de una manera más efectiva que el captopril⁴ y parece importante la contribución de las plaquetas activadas en la génesis de la muerte súbita cardíaca⁵. En el presente estudio, el captopril no tuvo efecto sobre la activación plaquetaria, no así el losartán, que redujo la activación de las plaquetas abriendo una nueva hipótesis para poder explicar la aparente mejoría en la mortalidad de los pa-

cientes tratados con losartán con respecto a los de captopril del estudio ELITE.

Sobre la base de los hallazgos presentados en este trabajo, la concentración de losartán requerida para inhibir la agregación plaquetaria (5×10^{-7} mol/l) fue muy alta comparada con la encontrada en el plasma humano tras la administración del fármaco (aproximadamente 5×10^{-9} mol/l), lo que sugeriría que con las dosis clínicas habituales del losartán no se alcanzaría un efecto relevante sobre las plaquetas. En nuestro estudio sólo se determinó el efecto directo del losartán sobre las plaquetas. Sin embargo, la trombosis es un evento multicelular en donde otras células, como los neutrófilos y el endotelio, regulan también la reactividad plaquetaria^{17,18}. En este sentido, se ha demostrado que la administración aguda de losartán incrementa el óxido nítrico que es, a su vez, un potente agente antiplaquetario^{17,19}. Por tanto, aunque sea de forma especulativa, la concentración de losartán que hipotéticamente inhibiría *in vivo* la activación plaquetaria podría ser significativamente más baja que en el estudio *in vitro* aquí presentado. En este sentido, a pesar de la aparente ausencia de un efecto directo del EXP 3174 y del captopril sobre el receptor de TXA₂ plaquetario, deberíamos tener en cuenta que la activación del receptor AT-1 expresado en la pared vascular por la Ang II podría favorecer la acumulación plaquetaria por un efecto vasoconstrictor independientemente de un efecto sobre el receptor de TXA₂. Futuros estudios realizados *in vivo* son necesarios para evaluar la relevancia práctica de estos hallazgos.

La adición de Ang II exógena no afectó significativamente a la activación plaquetaria. Además, la combinación de EXP 3174, que es un potente antagonista AT-1, con el losartán no modificó el efecto del losartán por sí mismo sobre la agregación de las plaquetas. Estos resultados sugieren que los efectos anteriormente mencionados sobre la activación plaquetaria fueron mediados por una acción no dependiente del receptor de tipo AT-1.

Los estudios de unión han demostrado previamente la presencia de receptores de tipo AT-1 en las plaquetas humanas^{20,21}. El efecto de la Ang II sobre la agregación plaquetaria continúa siendo controvertido. La potenciación de la activación plaquetaria por la Ang II fue publicado por Ding et al, pero como ocurre en este estudio, no fue confirmado por otros autores^{22,23}. De acuerdo con nuestros resultados, Burnier et al, usando el método de Fura-2, pudieron demostrar que no había ningún cambio significativo en el calcio citosólico después de la estimulación de plaquetas con Ang II, mientras que había un marcado incremento en el calcio citoplasmático después de la estimulación del receptor AT-1 por la Ang II en células del músculo liso vascular²³.

En resumen, los resultados del presente estudio sugieren que el losartán redujo la activación plaquetaria

por un mecanismo dependiente de TXA₂. El metabolito *in vivo* del losartán, EXP 3174, demostró una menor potencia en inhibir el receptor del TXA₂ plaquetario. Este efecto no fue observado por el captopril. Desde un punto de vista clínico, no pensamos que el losartán pueda ser usado exclusivamente como un agente anti-TXA₂ ya que esta actividad no está presente en su metabolito, que tiene una vida media en plasma más larga. No obstante, esta actividad directa del losartán bloqueando el receptor de TXA₂ abre una nueva vía de investigación sobre los posibles mecanismos de actuación de estos fármacos.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Begoña Ibarra su labor secretarial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Timmermans PBWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 205-251.
2. Johnston CI. Angiotensin receptor antagonists: focus on losartan. *Lancet* 1995; 346: 1403-1407.
3. Wong PC, Price WA, Chiu AT, Duncia JV, Carini DJ, Wexler RR et al. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. VIII. Characterization of functional antagonist displayed by DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252: 719-725.
4. Pitt B, Segal R, Martínez FA, Meurers G, Cowley AJ, Thomas I et al. Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). *Lancet* 1997; 349: 747-752.
5. Hammon JW, Oates JA. Interaction of platelets with the vessel wall in the pathophysiology of sudden cardiac death. *Circulation* 1986; 73: 224-226.
6. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci* 1975; 72: 2294-2298.
7. Patrono C, Renda G. Platelet activation and inhibition in unstable coronary syndromes. *Am J Cardiol* 1997; 80: 17E-20E.
8. López-Farré A, Farré J, Sánchez de Miguel L, Romero J, Gómez J, Rico L et al. Trombosis y enfermedad coronaria: neutrófilos, óxido nítrico y aspirina. *Rev Esp Cardiol* 1998; 51: 171-177.
9. Li P, Ferrario CM, Brosnihan KB. Nonpeptide angiotensin II antagonist losartan inhibits thromboxane A₂-induced contractions in canine coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281: 1065-1070.
10. Bertolino F, Valentín JP, Maffre M, Jover B, Bessac AM, John GW. Prevention of thromboxane A₂ receptor-mediated pulmonary hypertension by a nonpeptide angiotensin II type 1 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268: 747-752.
11. Sánchez de Miguel L, Casado S, Farré J, García-Durán M, Rico L, Montón M et al. Comparison of *in vitro* effects of trifusal and acetylsalicylic acid on nitric oxide synthesis by human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 1998; 343: 57-65.
12. López-Farré A, Riesco A, Digiuni E, Mosquera JR, Caramelo C, Sánchez de Miguel L et al. Aspirin-stimulated nitric oxide production by neutrophils after acute myocardial ischemia in rabbits. *Circulation* 1996; 94: 83-87.
13. Kattelman EJ, Venton DL, Le Breton GC. Characterization of U46619 binding in unactivated intact human platelets and determinations of binding site affinities of four TXA₂/PGH₂ receptor antagonists. *Thromb Res* 1986; 41: 471-481.
14. Corriu C, Bernard S, Schott C, Stoclet JC. Effects of losartan on contractile responses of conductance and resistance arteries from rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26: 688-692.
15. Sweet DS, Bradstreet DC, Berman RS, Jallard N, Saenz A, Weidler DJ. Pharmacodynamic activity of intravenous E-3174, an angiotensin II antagonist, in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 1994; 7: 1035-1040.
16. Burrell LM, Johnston CI. Angiotensin II receptor antagonists. Potential in elderly patients with cardiovascular disease. *Drugs Aging* 1997; 10: 421-434.
17. López-Farré A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millás I, Montón M et al. Effects of aspirin on platelets-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995; 91: 2080-2088.
18. Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 1993; 7: 516-522.
19. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-141.
20. Crabos M, Bertschin S, Bühler FR, Rogg H, Evéquo D, Eberhard M et al. Identification of AT-1 receptors on human platelets and decreased angiotensin II binding in hypertension. *J Hypertension* 1993; 11: 5230-5231.
21. Moore TJ, Williams GH. Angiotensin II receptors on human platelets. *Circ Res* 1981; 51: 314-320.
22. Ding YA, MacIntyre DE, Kenyon CJ, Semple PF. Angiotensin II effects on platelet function. *J Hypertension* 1985; 3: S251-S253.
23. Burnier M, Centeno G, Grouzmann E, Walker P, Waeber B, Brunner HR. *In vitro* effects of DuP 753, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on human platelets and rats vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertension* 1991; 4: 438-443.