

## ACCION DE LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS SOBRE LA ACTIVIDAD LIPOOXIGENASA Y CICLOOXIGENASA COLONICA DE PACIENTES CON NEOPLASIA DE COLON

GUILLERMO DI GIROLAMO<sup>1</sup>, ANA FRANCHI<sup>2</sup>, ANTONIO R. DE LOS SANTOS<sup>3</sup>, MANUEL L. MARTÍ<sup>3</sup>,  
MARIANA FARINA<sup>2</sup>, MARTHA A. FERNANDEZ de GIMENO<sup>2</sup>=

<sup>1</sup>Segunda Cátedra de Farmacología, Departamento de Farmacología y <sup>2</sup>Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; <sup>3</sup>Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO – CONICET), Buenos Aires

**Resumen** El clonixinato de lisina (CL) es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) con buena tolerancia gastrointestinal que en estudios *in vitro* en tejidos humanos produce, a concentraciones equivalentes a las encontradas en plasma luego de una dosis terapéutica, una significativa inhibición de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y de la producción de 5 hidroxeicosatetraenoico (5-HETE), afectando en escaso grado la ciclooxigenasa 1 (COX-1). En este trabajo se estudió el efecto *in vivo* de la droga en segmentos colónicos. *Experimento 1*: se administró a 5 pacientes en el pre operatorio inmediato de hemicolectomía por neoplasia de colon una infusión continua de CL para lograr una concentración en estado estacionario entre 4 y 6 mg/ml. Se incubaron segmentos de colon de estos 5 pacientes y de 5 pacientes control no tratados con ácido araquidónico <sup>14</sup>C. Se observó que los segmentos de colon tratados con CL mostraron inhibición significativa en la producción de PGE<sub>2</sub>, única prostaglandina (PG) sintetizada por el tejido, y del 5-HETE. *Experimento 2*: 15 pacientes recibieron bolos endovenosos (EV) de: CL 100 mg (n<sub>1</sub> = 5); CL 200 mg (n<sub>2</sub> = 5) o indometacina (INDO) 50 mg (n<sub>3</sub> = 5). Con las dos dosis de CL se obtuvo inhibición de la síntesis de PGE<sub>2</sub>, que fue de mayor grado con el bolo de INDO. Los dos AINES estudiados se comportaron en forma distinta cuando se valoró la producción de 5-HETE, mientras que el tratamiento con CL lo inhibió significativamente, el tratamiento con INDO no lo modificó. Los estudios de Western Blotting arrojaron una expresión de ambas isoformas de la COX en segmentos de colon, siendo los niveles de COX-2 un 20% mayores. En los dos tipos de estudios realizados *in vivo*: infusión continua y bolo EV, el CL inhibió significativamente la síntesis basal de PGE<sub>2</sub> y 5-HETE.

**Palabras claves:** AINES, lipooxigenasa, ciclooxigenasa, colon humano

**Abstract** *Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on lipoxigenase and cyclooxygenase activities on human colon segments from patients with neoplasia.* Lysine clonixinate (LC) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) with good gastrointestinal tolerance. Treatment with LC at levels equivalent to those found in plasma following therapeutic doses resulted in significant inhibition of both cyclooxygenase 2 (COX-2) and production of 5 hydroxy-eicosatetraenoic acid (5-HETE) and slightly affected levels of cyclooxygenase 1 (COX-1) in *in vitro* studies carried out on human tissues. This study deals with the *in vivo* effect of the drug on human colon segments. Experiment 1: Five patients about to undergo hemicolectomy due to colon neoplasia were treated preoperatively with a continuous infusion of LC, to achieve a steady-state concentration between 4 and 6 mg/ml. Human colon segments from the five patients and from another five control patients receiving no treatment with [<sup>14</sup>C]-arachidonic acid were incubated. Human colon segments treated with LC showed significant inhibition of PGE<sub>2</sub>, the only prostaglandin (PG) synthesised by the tissue, as well as of 5-HETE. Experiment 2: Fifteen patients received an i.v. bolus of LC 100 mg (n<sub>1</sub>=5); LC 200mg (n<sub>2</sub>=5) or indomethacin (INDO) 50 mg (n<sub>3</sub>=5). Both doses of LC showed greater inhibition of PGE<sub>2</sub> synthesis than the INDO bolus. Both NSAIDs studied proved to have different effects on the production of 5-HETE; while treatment with LC elicited significant inhibition, levels with INDO remained unchanged. Western blotting analysis showed expression of both COX isoforms in colon segments, COX-2 levels being 20% higher. Both types of *in vivo* studies conducted continuous infusion and i.v. bolus, revealed that LC exerted significant inhibition of basal synthesis of PGE<sub>2</sub> and 5-HETE.

**Key words:** NSAID, lysine clonixinate, lipoxigenase, cyclooxygenase, human colon

Se han identificado dos isoformas de la ciclooxigenasa (COX) en la generación de prostaglandinas (PGs)<sup>1</sup>.

La COX-1 se expresa en forma constitutiva en casi todas las células y está involucrada en diferentes procesos fisiológicos. La COX-2 no se encuentra normalmente pero puede ser inducida por citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento hormonal, lipopolisacárido (LPS) y mitógenos<sup>2</sup>. Esta isoforma se ha asociado específicamente con células y tejidos involucrados en procesos inflamatorios<sup>3</sup>, en el dolor y la fiebre<sup>4</sup>.

Mediante técnicas de inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos anti-COX-1 y anti-COX-2, Masferrer y col. han determinado una expresión diferencial de ambas isoformas. Mientras que la COX-1 se expresa en el estómago de la rata normal a nivel de la superficie del epitelio y de las células musculares lisas en la capa externa; la COX-2 lo hace predominantemente en células epiteliales en proliferación, displásicas o neoplásicas y a nivel de vasos de neovascularización, dentro o adyacentes a lesiones hiperplásicas-neoplásicas<sup>5, 6</sup>.

Las ulceraciones de la mucosa gástrica y colónica, como así también las hemorragias inducidas por AINES, han sido principalmente relacionadas a una disminución de PGs, especialmente PGI<sub>2</sub> y la PGE<sub>2</sub><sup>7</sup>. Sin embargo existe evidencia experimental que algunos leucotrienos (LTs) pueden lesionar la mucosa gastrointestinal y han sido asociados a la enfermedad ulcerosa<sup>8</sup>.

Al respecto, se ha demostrado que los productos de la 5-lipooxigenasa estarían involucrados en la patogénesis de lesiones hemorrágicas en mucosa gástrica de rata, en modelos de daño agudo por AINES y daño crónico inducido por iodoacetamida<sup>9</sup>. A su vez se evidenció en pacientes con artritis tratada crónicamente con AINES una correlación significativa entre el incremento de la síntesis de LTB<sub>4</sub> y la presencia de gastritis química tipo C<sup>10</sup>.

La participación de los LTs en la fisiopatología de estas lesiones se explicaría por el aumento de la disponibilidad de ácido araquidónico (AA), secundario a la inhibición de la ciclooxigenasa, que llevaría a un incremento de los productos de la 5-lipooxigenasa, enzima involucrada en la síntesis de 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE), 5 hidroxieicosatetraenoico (5-HETE) y LTs.

El clonixinato de lisina (CL) (sal de l-lisina del ácido 2-[(3-cloro-2-metilfenil)-amino]-3-piridinocarboxilato) es un antiinflamatorio no esteroide (AINE) que ha probado ser rápido y efectivo en numerosos ensayos clínicos controlados tanto en modelos de dolor crónico<sup>11</sup> como agudo<sup>12, 13</sup>; con una muy baja incidencia de efectos adversos menores a nivel gastrointestinal<sup>14</sup>.

En ensayos previos *in vitro*, en segmentos colónicos humanos<sup>15</sup> histológicamente normales, y en vesículas biliares humanas<sup>16</sup> estudiamos el efecto del CL y de la INDO sobre la síntesis de PGs e hidroxiácidos. Los resul-

tados que reiteraron los hallazgos previos *in vitro* en rata<sup>17, 18</sup> mostraron que el CL en ninguna de las dos concentraciones inhibió la síntesis basal de PGE<sub>2</sub> pero sí produjeron una profunda y significativa disminución de la producción de 5-HETE.

Las inferencias a partir de estudios *in vitro* y su aplicación terapéutica deben ser hechas con cautela, dada la multiplicidad de factores que diferencian ambos tipos de experiencias (aspectos farmacodinámicos y farmacocinéticos, participación de otros sistemas que aumentan o disminuyen los efectos, fisiológicamente o por acción de los mismos fármacos en estudio)<sup>19</sup>.

Con el objeto de verificar los resultados obtenidos en colon aislado *in vitro*<sup>15</sup> estudiamos el efecto de concentraciones terapéuticas de CL e INDO sobre la actividad ciclo y lipooxigenasa en segmentos de colon, de pacientes tratados con estas drogas poco antes de la intervención resectiva por neoplasias de colon, en los que la expresión de COX-2 estaría aumentada<sup>20, 21</sup>.

## Materiales y métodos

Se utilizaron 30 segmentos colónicos histológicamente normales pertenecientes a pacientes que fueron sometidos a hemicolectomía por cáncer de colon.

Todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito para que el tejido resecado fuera utilizado en el estudio. Además, aquellos en los que se debía evaluar la acción *in vivo* del clonixinato de lisina (Dorixina<sup>®</sup>) o de la indometacina, dieron también su consentimiento por escrito para recibir según el caso, una dosis única en bolo endovenoso o una infusión continua del AINE que le correspondiera por sorteo.

Fueron excluidos aquellos que estuvieran bajo tratamiento con cualquier medicación que pudiera afectar la producción de eicosanoides como glucocorticoides y AINES.

Los pacientes fueron premedicados con diazepam y los fármacos administrados durante la anestesia fueron: fentanilo, propofol, vencuronio, óxido nitroso y procaína.

Los tejidos fueron trasladados desde el quirófano hasta el laboratorio en solución de Krebs a 4°C dentro de las 2 horas de su extracción para su procesamiento.

Todos los segmentos colónicos fueron inspeccionados macroscópicamente tomándose muestras para su estudio histopatológico de rutina y para excluir del estudio aquellos con infiltración neoplásica.

### Medicación

#### 1. Administración del CL en infusión continua

Para lograr una concentración en estado estacionario (Css) de 4 a 6 µg/ml de CL se administraron a 5 pacientes que iban a ser sometidos a hemicolectomía, un bolo EV de 40 mg de CL seguido de una infusión de 70 mg/h, inmediatamente antes de la intervención. Como control se obtuvieron 5 segmentos colónicos sin tratamiento. Las resecciones colónicas se realizaron entre los 30 y 45 minutos de iniciado el goteo.

#### 2. Administración del CL e INDO en bolo

Al inicio de la intervención se administró un bolo EV de CL 100 mg, CL 200 mg o INDO 50 mg según sorteo al azar, a 15 pacientes sometidos a hemicolectomía (5 por cada tratamiento).

Como control se emplearon 5 segmentos colónicos de pacientes sin tratamiento.

Las resecciones colónicas se realizaron entre 30 a 45 minutos después de administrada la medicación.

Las dosis utilizadas corresponden con las terapéuticas de ambas drogas. El comportamiento cinético de la INDO fue tomado de la bibliografía<sup>22</sup> y el del CL de un estudio previo con el mismo modelo en vesícula biliar humana<sup>16</sup>.

#### *Determinación de las concentraciones plasmáticas de CL en los pacientes tratados con una infusión continua o un bolo endovenoso*

Luego de transcurridos 30 a 45 minutos de administrado el bolo o de iniciada la infusión de CL y simultáneamente con la resección del tejido se extrajeron 5 ml de sangre del brazo contralateral.

Las muestras plasmáticas fueron purificadas empleando una técnica de extracción en fase sólida (cartuchos Sep Pak C18 de Waters) que permite extraer y concentrar la droga presente en el plasma.

Los extractivos fueron analizados por HPLC (Sistema *Spectra Physics*) con detección UV a 287 nm, empleando una columna de fase reversa (RPC-18, *Spherisorb* ODS2, 30 cm x 4 mm, P5) y una fase móvil de composición 55% metanol y 45% buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 4.48) con un flujo de 0.8 ml/min.

Las concentraciones de CL corresponden a la droga plasmática total, unida y libre.

#### *Medición de eicosanoides*

La síntesis de los metabolitos del AA se determinó por la técnica de radioconversión que permite estudiar la capacidad de síntesis de PGs de tejidos aislados.

Los tejidos fueron incubados dentro de un vial que contiene 2 ml de solución, en un baño Dubnoff a 37°C con agitación y en atmósfera de carbógeno (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>). La actividad de la COX se determinó como la conversión de AA-C<sup>14</sup> en sus derivados. Para esto se adicionó a cada uno de los viales 0.25: µCi de AA-C<sup>14</sup> y se incubó durante una hora. La determinación de los eicosanoides se realizó en dos pasos sucesivos.

##### 1. Extracción y separación de los hidroxiácidos

Para medir el 5-HETE, los productos de la lipooxigenasa se extrajeron 3 veces con 2 ml de acetato de etilo a pH 7, se reunieron los extractos orgánicos y los tubos se secaron con una corriente de nitrógeno. El residuo se suspendió en 0.2 ml de cloroformo/etanol (2:1 vol/vol) y se aplicó en una placa de cromatografía delgada. Las placas utilizadas fueron de TLC de aluminio sílica gel.

El estándar de 5-HETE se aplicó y corrió en la placa. Las placas se revelaron en un sistema de solvente consistente en acetato de etilo/isooctano/ácido acético/agua (76: 67: 20: 100, vol/vol). Las manchas se visualizaron con vapores de yodo. Los RF para el ácido araquidónico y 5-HETE fueron 0.85 y 0.70 respectivamente. Los resultados de cada compuesto se expresaron como porcentaje total de radioactividad de la placa y se contaron en contador de centelleo beta.

##### 2. Extracción y separación de las prostaglandinas

Después de la extracción de los productos de la lipooxigenasa, el medio de incubación se llevó a pH 3-3.5 mediante el agregado de HCl 1N. Luego se adicionaron a cada muestra 2 ml de acetato de etilo, en tres ocasiones, para extraer las PGs del solvente. Los extractos secos se resuspendieron en 100 µl de

metanol y se realizó una cromatografía en placa delgada, corriéndose en paralelo los siguientes testigos: PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>. La placa se corrió dentro de cubas saturadas con 200 ml de solvente compuesto por benceno:dioxano:ácido acético en una proporción de 60: 30: 3 (v:v).

Se determinó la radioactividad en un contador de centelleo líquido Bechman y los resultados se expresaron como porcentaje de cpm/100 mg de peso húmedo sobre total de placa.

#### *Medición de la COX-1 y COX-2 por Western Blotting*

Los segmentos colónicos (n = 5) tomados al azar de un pool de controles no tratados, fueron homogeneizados por sonicación en un buffer Tris 20 mM (pH 7.4) conteniendo inhibidores de proteasas y centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos. Las proteínas fueron separadas electroforéticamente en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE según el método de Laemmli<sup>23</sup>. Las proteínas fraccionadas (50 µg/calle) fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en TTBS (Tris – Tween) e incubada con el primer anticuerpo (anti-COX-1 o anti-COX-2) por dos horas a temperatura ambiente. Luego de los lavados con TTBS, la membrana fue incubada con el segundo anticuerpo (anti-IgG monoclonal de conejo conjugado con fosfatasa alcalina) por una hora, también a temperatura ambiente. La membrana fue revelada con una mezcla de NBT (Nitro blue tetrazolium) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) bajo condiciones alcalinas por media hora.

#### *Drogas*

El ácido araquidónico <sup>14</sup>C fue adquirido en New England Nuclear (actividad específica 56 µCi/mmol).

Los estándares de PGs y 5-HETE y la Indometacina en Sigma Chemical Company.

El Clonixinato de lisina (Dorixina<sup>®</sup>) es marca registrada de Laboratorio Roemmers, Argentina.

Los anticuerpos anti-COX-1 y anti-COX-2 fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc. y el segundo anticuerpo (anti-IgG monoclonal) de Sigma Chemical Company.

El resto de los reactivos de Western Blot fueron de Sigma Chemical Company.

#### *Estadística*

Todos los valores se presentan como media y ES. Las comparaciones entre los grupos se realizaron empleando un Análisis de Varianza (ANOVA) paramétrico de una vía. Cuando el número de grupos fue mayor de dos se efectuó como prueba post-hoc el test de comparaciones múltiples de Student Newman Keuls.

Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue igual o menor del 5%.

## **Resultados**

### *Efecto de una infusión continua de CL en la síntesis de PGs y 5-HETE*

Los valores plasmáticos de CL obtenidos 30 minutos después de comenzada la infusión, coincidentes con la resección del colon, oscilaron entre 3.6 y 7.1 µg/ml con un valor medio de 5.7±1.1 µg/ml.

Se estudiaron los segmentos colónicos provenientes de 5 pacientes controles y de 5 pacientes tratados con una infusión continua de CL.

En las muestras de colon de pacientes control el AA generó únicamente  $PGE_2$ , no detectándose otros metabolitos de la COX.

En las muestras tratadas con CL se observó una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) en la producción de  $PGE_2$  de  $12.5 \pm 0.9$  en la condición control a  $8.7 \pm 0.8$  (Figura 1.a) y de 5-HETE de  $5.8 \pm 0.8$  a  $3.5 \pm 0.8$  ( $p < 0.001$ ) (Figura 1.b).

#### Efecto de un bolo endovenoso de CL e INDO sobre la síntesis de PGs y 5-HETE

Se observó que las dos dosis de CL administradas en bolo endovenoso, de 100 mg (5 pacientes) y 200 mg (5 pacientes), inhibieron significativamente ( $p < 0.001$ ) la producción de  $PGE_2$  (Figura 2.a) en los segmentos colónicos, reduciendo los valores control de  $15.9 \pm 0.9$  a  $10.7 \pm 0.8$  y  $10.8 \pm 0.8$  respectivamente.

El bolo de 50 mg de INDO (5 pacientes) inhibió significativamente y en mayor grado, respecto del CL, la producción de  $PGE_2$  que alcanzó un valor de  $4.8 \pm 1.2$  (Figura 2.a).

En cuanto a la acción sobre la 5-lipooxigenasa, se aprecia que ambas dosis del CL (100 y 200 mg), redujeron significativamente ( $p < 0.001$ ) la producción de 5-HETE, de  $5.8 \pm 0.8$  en la condición control a  $4 \pm 0.9$  y  $3.6 \pm 0.8$  respectivamente, mientras que la dosis de 50 mg de INDO no la modificó ( $5.2 \pm 1.2$ ) (Figura 2.b).

#### Medición de la expresión de las enzimas COX-1 y COX-2

Los estudios de Western Blotting permitieron determinar la expresión de las dos ciclooxigenasas en los segmentos colónicos estudiados.

En la figura 3.a y 3.b se comparan las enzimas COX-1 y COX-2 de colon humano, empleando como contro-

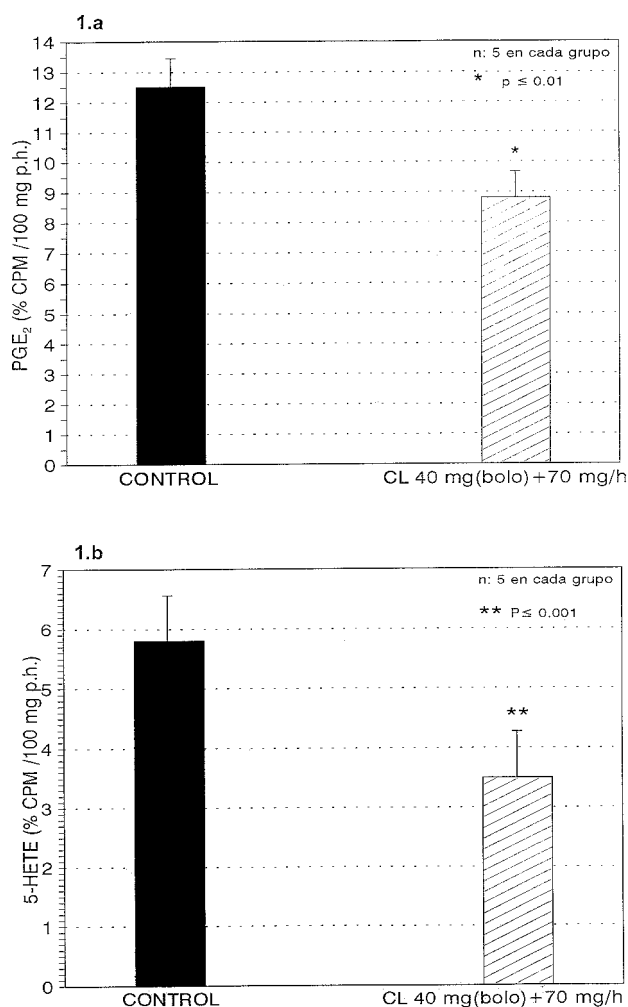


Fig. 1.— Efecto de una infusión continua de Clonixinato de lisina *in vivo* sobre la síntesis de PGs (1.a) y 5-HETE (1.b).

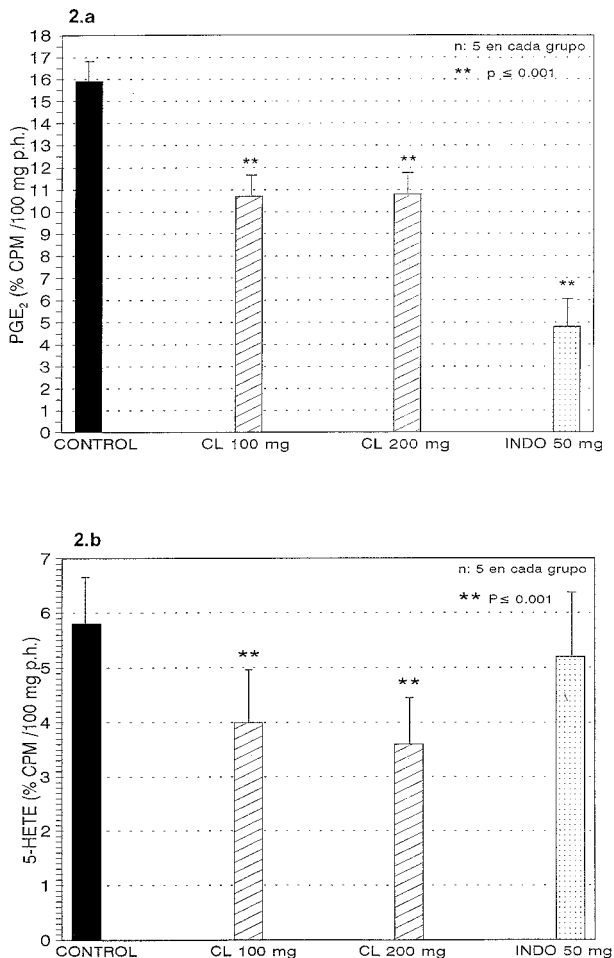


Fig. 2.— Efecto de un bolo endovenoso de Clonixinato de lisina (100 y 200 mg) e Indometacina (50 mg) *in vivo* sobre la síntesis de PGs (2.a) y 5-HETE (2.b).

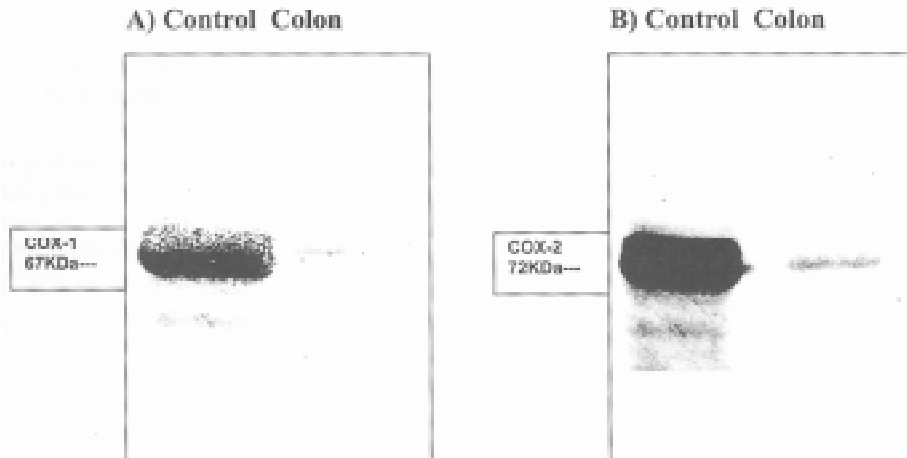


Fig. 3.— Western Blotting para isoformas de la COX en el colon humano. A: Membrana de nitrocelulosa revelada con un anticuerpo monoclonal contra la enzima COX-1. El control positivo corresponde a un homogenato de estómago de rata control. B: Membrana de nitrocelulosa revelada con un anticuerpo monoclonal contra COX-2. El control positivo corresponde a un lisado de macrófagos.

les homogenatos de estómago de rata y lisado de macrófagos respectivamente.

En la Figura 4 se muestran las densidades de ambas isoformas, obtenidas de 5 segmentos colónicos control no tratados y analizados con el programa Sigma Gel.

En este gráfico podemos observar que en el colon, a diferencia de la vesícula biliar, no sólo están presentes ambas isoformas de la enzima, sino también que los niveles de COX-2, son alrededor de un 20% mayores que los de COX-1.

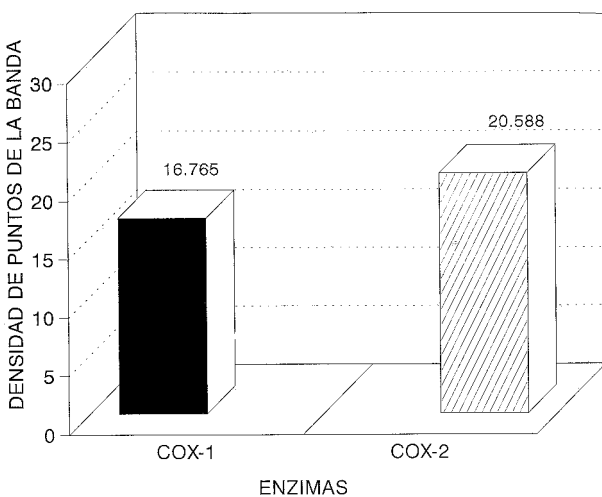


Fig. 4.- Densidad de las bandas correspondientes a homogenatos de colon humano, determinadas mediante el programa Sigma Gel. La posición relativa de la banda fue calculada a partir de los RF obtenidos usando marcadores de peso molecular marca Bio Rad

## Discusión

Es reconocida la acción citoprotectora y antisecretoria de las PGs<sup>24</sup>. La mucosa gástrica e intestinal humana producen preferentemente PGE<sub>2</sub> y la PGF<sub>2α</sub> y en menor cantidad PGD<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub><sup>25,26</sup>.

Por otro lado se han descrito a los LTs como mediadores en la enfermedad ulcerosa<sup>9</sup>. Al respecto, la infusión de LTD<sub>4</sub> a gatos anestesiados resulta en una disminución de la diferencia del potencial transmembrana, que se refleja en una caída de la barrera mucosa y un aumento de la secreción de pepsina<sup>27</sup>.

Los AINES clásicos inhiben la ciclooxigenasa sin afectar la vía de las lipooxigenasas. Por lo tanto el efecto lesivo de los AINES, sobre la mucosa gástrica y colónica, podría deberse no sólo a la disminución de la PGs citoprotectoras sino también a un aumento de los productos de la vía de la 5-lipooxigenasa, que llevarían de manera sinérgica al daño de la misma.

En trabajos previos *in vitro* efectuados en pulmón y estómago de rata<sup>17</sup> y en colon<sup>15</sup> y vesícula humana<sup>16</sup>, hemos observado que concentraciones de CL de 2.5 y 4.1 x 10<sup>-5</sup> M no modificaron la producción basal de PGs, dependiente de la COX-1, que sí fue inhibida por 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-6</sup> M de INDO. Así mismo evidenciamos que ambas concentraciones de CL e INDO restablecen los niveles basales de PGs, luego de haberse inducido su aumento con LPS, lo que indicaría que en estas concentraciones inhiben las PGs sintetizadas por la COX-2.

En relación con la vía de la lipooxigenasa observamos una acción diferencial, en razón que ambas concentraciones de CL inhibieron significativamente la pro-

ducción de 5-HETE, mientras que la INDO no la modificó.

Los experimentos *in vitro* con AINES, suelen dar valores de  $IC_{50}$  mucho más bajos que los encontrados en estudios *in vivo*, en razón que no tienen en cuenta factores farmacodinámicos y fundamentalmente farmacocinéticos, como la elevada unión a proteínas, que reduce la cantidad de droga libre que tiene acceso al receptor<sup>28</sup>.

Por tal razón decidimos estudiar *in vivo* las modificaciones inducidas por el CL y la INDO, en la actividad de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa, a concentraciones plasmáticas alcanzadas por dosis terapéuticas, en segmentos colónicos de pacientes sometidos a colectomía por neoplasia de colon.

Dado que en el contexto quirúrgico no era factible la vía peroral, administramos a cinco pacientes dosis de carga seguida de una infusión continua de CL, logrando concentraciones plasmáticas de  $5.7 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ , que son habituales luego de una dosis oral de 125 mg.

Otro grupo de pacientes recibieron en bolo endovenoso único de 100 (n:5) o 200 mg (n:5) de CL o 50 mg (n:5) de INDO (dosis terapéuticas de ambas drogas). Las dosis de CL inducen a tiempo cero concentraciones aproximadas de 30 a 60  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

En ambas condiciones experimentales el CL disminuyó significativamente la producción de  $PGE_2$ , única PG sintetizada por el colon y el 5-HETE. Este último hecho avararía una acción inhibitoria sobre la 5-lipooxigenasa, primera enzima del camino metabólico de los HETEs y LTs.

Por su parte la INDO redujo significativamente y en mayor grado que el CL la  $PGE_2$  pero no modificó la actividad lipooxigenasa.

El análisis de la densidad de las bandas de Western Blotting arrojó que ambas isoformas se expresan en segmentos de colon sin infiltración neoplásica, y que los niveles de COX-2 son un 20% mayores.

Al respecto, Eberhart y col han observado que la COX-2 se expresa en altos niveles en cáncer de colon<sup>29</sup>. Estudios clínicos con AINES han demostrado menor incidencia, un entecimiento en la progresión y regresión de poliposis y cáncer de colon<sup>20, 21</sup>.

A pesar que poco se conoce acerca del rol de la COX-2 en la carcinogénesis, se han descrito mecanismos en los que participan tales cambios en ese sentido como el incremento de la angiogénesis, la adhesión celular y la resistencia a la apoptosis<sup>6, 30</sup>.

Teniendo en cuenta que en un estudio previo *in vivo*, con la misma metodología en vesícula biliar humana<sup>16</sup>, que sólo expresa COX-1, el CL no redujo los niveles basales de  $PGE_2$ ,  $PGI_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  y que en un experimento *in vivo* en rata hemos evidenciado el efecto inhibitorio selectivo del CL sobre la síntesis de PGs inducida por LPS<sup>18</sup>, puede inferirse que la reducción en los niveles de

PGs en el colon debería atribuirse a una acción inhibitoria del CL sobre la COX-2.

La farmacodinamia del CL presentaría entonces ciertas características diferenciales respecto de los AINES clásicos. Sus efectos antiinflamatorios podrían deberse a la inhibición de dos enzimas: la ciclooxigenasa 2 y la 5-lipooxigenasa, involucradas en la producción de prostaglandinas y leucotrienos.

Así mismo, la menor afectación de la COX-1 podría explicar la muy buena tolerancia por vía oral, la escasa incidencia de efectos adversos a nivel del aparato gastrointestinal y la no interferencia con la actividad hemostática<sup>31</sup>.

La importancia de estos resultados reside en que los fármacos en estudio, administrados a pacientes poco antes de la resección del colon, en dosis semejantes a las habituales de uso clínico, muestran coincidencia con los efectos sobre ciclooxigenasa y 5-lipooxigenasa observados en estudios previos *in vitro*<sup>15</sup>, provenientes de igual tipo de pacientes.

## Bibliografía

- Feng L, Sun W, Xia Y, et al. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys* 1993; 307: 361-8.
- Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase 2 and its regulation in inflammation mediators. *Inflammation* 1996; 5: 305-23.
- Masferrer JL, Zweifel BS, Seibert K, et al. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J Clin Invest* 1990; 86: 1375-9.
- Vane JR, Botting RM: New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res* 1995; 44: 1-10.
- Masferrer JL, Zweifel B, Hauser SD, et al. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase-2 in vivo is anti-inflammatory and non ulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3228-32.
- Woerner BM, Masferrer JL, Zweifel B, et al. Characterization of cyclooxygenase-2 during tumorigenesis in human epithelial cancers. Presentado en el 11<sup>th</sup>. *International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research: Basic Science and New Clinical Applications-Florence (Italy)*, Jun 4-8, 2000.
- Rainsford KD: Side - effects of anti-inflammatory drugs. In: *Rainsford KD, Velo G, (eds), Lancaster: MTP Press, 1987, p. 3-26.*
- Whittle BJ, Oren-Wolman N, Guth PH. Gastric vaso-constrictor action of leukotriene  $C_4$   $PGF_{2\alpha}$  and thromboxane mimetic U-466 19 on rat submucosal microcirculation in vivo. *Am J Physiol* 1985; 248: G580-6.
- Gyomber E, Vattay P, Szabo S, Rainsford KD. Effect of lipoxygenase inhibitors and leukotriene antagonists on acute and chronic gastric haemorrhagic mucosal lesions in ulcer models in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11(10): 922-7.
- Hudson N, Balsitis M, Everitt S, Hawkey CJ. Enhanced gastric mucosal leukotriene B4 synthesis in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut* 1993; 34: 742-7.
- Cayetti LM, de los Santos AR, Martí ML, Di Girolamo G,

- Niselman V. Lysine clonixinate versus aspirin in the treatment of gonarthrosis. *Curr Ther Res* 1995; 56: 894-905.
12. Martí ML, de los Santos AR, Di Girolamo G, Gil M, Manero EO, Fraga C. Lysine clonixinate in minor dental surgery: double-blind randomized parallel study versus paracetamol. *Int J Tissue React* 1993; 15: 207-13.
  13. Di Girolamo G, Gimeno MAF, Faletti A, de los Santos AR, Martí ML, Zmijanovich R: Prostaglandinas menstruales y dismenorrea. Su modulación por antiinflamatorios no esteroideos. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59: 259-64.
  14. Bidlingmaiers A, Hammermaier A, Nagyványi P, Pabst G, Waitzinger J. Gastrointestinal blood loss induced by three different non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Arzneim-Forsch Drug Res* 1995; 45: 491-3.
  15. Franchi A, Di Girolamo G, de los Santos AR, Martí ML, Gimeno MAF. Efecto del clonixinato de lisina y la indometacina sobre la actividad de la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa de colon aislado de pacientes con neoplasias. *Medicina (Buenos Aires)* 1998; 58: 291-4.
  16. Franchi A, Di Girolamo G, Farina M, de los Santos AR, Martí ML, Gimeno MAF. Acción diferencial de los antiinflamatorios no esteroideos sobre la ciclooxigenasa y lipooxigenasa de vesícula biliar humana. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60: 580-6.
  17. Franchi AM, Di Girolamo G, de los Santos AR, Martí ML, Gimeno MAF. Effects of lysine clonixinate on cyclooxygenase I and II in rat lung and stomach preparations. *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids* 1998; 58: 421-4.
  18. Franchi AM, Di Girolamo G, de los Santos AR, Martí ML, Gimeno MAF. Ex vivo effects of lysine clonixinate on cyclooxygenases in rat lung and stomach preparations. *Inflammopharmacology* 1999; 7: 401-11.
  19. Meade EA, Smith WL, De Witt DL. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroid anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1993; 268: 6610-4.
  20. Yang VW, Geiman DE, Hubbard WC, et al. Tissue prostanoids as biomarkers for chemoprevention of colorectal neoplasia: correlation between prostanoid synthesis and clinical response in familial adenomatous polyposis. *Prost and Other Lipid Mediators* 2000; 60: 83-96.
  21. Watson AJM, Dubois RN. Lipid metabolism and APC: implications for colorectal cancer prevention. *The Lancet* 1997; 399: 444-5.
  22. Alvan G, Orme M, Bertilsson L, Ekstrand R, Palmer L. Pharmacokinetics of indomethacin. *Clin Pharmac Ther* 1975; 18: 364-73.
  23. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
  24. Robert A, Schultz JR, Nezamis JE, Lancaster C. Gastric antisecretory and antiulcer properties of PGE<sub>2</sub>, 15 methyl PGE<sub>2</sub> and 16,16 dimethyl PGE<sub>2</sub>": intravenous, oral and intrayeyunal administration. *Gastroenterology* 1976; 70: 359-70.
  25. Redfern JS, Lee E, Feldman M. Effect of indomethacin on gastric mucosal prostaglandins in humans correlation with mucosal damage. *Gastroenterology* 1987; 92: 969-77.
  26. Craven PA, De Roberti FR. Patterns of prostaglandin synthesis and degradation in isolated and proliferative colonic epithelial cells compared to residual colon. *Prostaglandins* 1983; 26: 583-604.
  27. Pendleton RG, Stavorsky JR. Evidence for differing leukotriene receptors in gastric mucosa. *Eur J Pharmacol* 1986; 125: 297-9.
  28. Grossman CJ, Wiseman J, Lucas FS, et al. Inhibition of constitutive and inducible cyclooxygenase activity in human platelet and mononuclear cells by NSAIDs and COX-2 inhibitors. *Inflamm Res* 1995; 44: 253-7.
  29. Eberhart CE, Coffy RS, Radhika A, Giardiell FM, Ferrenbach S, Dubois RN. Up regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183-8.
  30. Watson AJM. Chemopreventive effects of NSAIDs against colorectal cancer: regulation of apoptosis and mitosis by COX-1 and COX-2. *Histol Histopathol* 1998; 13: 591-7.
  31. Pallapies D, Musks A, Bertram L, Rohleder G, Nagyványi P, Peskar BA. Effects of single doses of lysine clonixinate and acetylsalicylic acid on platelet functions in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 49: 351-4.

-----

*O health! health! the blessing of the rich! the riches of the poor! who can buy thee at too dear a rate, since there is no enjoying this world without thee?*

¡Oh, salud, bendición del rico y riqueza del pobre! ¿Qué precio habrá demasiado caro para comprarla, ya que sin ella no es posible ningún goce en este mundo?

Ben Jonson (1573-1637)