

ACCION DEL CLONIXINATO DE LISINA SOBRE LA FUNCION PLAQUETARIA COMPARACION CON OTRAS DROGAS ANTIINFLAMATORIAS NO ESTEROIDEAS

ESTELA H. KRAMER¹, BEATRIZ SASSETTI², ALFREDO J. KAMINKER¹, ANTONIO R. DE LOS SANTOS³,
MANUEL L. MARTÍ³, GUILLERMO DI GIROLAMO⁴

¹División Hematología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, ²Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, ³Departamento de Medicina, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, ⁴Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Resumen: El grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) posee como uno de sus mecanismos de acción la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Este efecto explica muchas de las acciones farmacológicas y de los eventos adversos observados en el uso clínico. La administración de AINEs a pacientes con trastornos de la hemostasia o en estados perioperatorios incrementan el riesgo de hemorragias por inhibición de las funciones plaquetarias. En este trabajo se estudian las modificaciones plaquetarias inducidas por el clonixinato de lisina comparadas con las del diclofenac, ibuprofeno y aspirina, mediante pruebas clásicas (recuento de plaquetas, producción de factor 3 plaquetario, agregación con diversos inductores) y procedimientos más recientes (medición de P-selectina por citometría de flujo). El clonixinato de lisina no produjo modificaciones en el número ni en la función plaquetaria cuando fue administrado a voluntarios sanos en las dosis terapéuticas usuales, cosa que sí ocurrió con las drogas control.

Palabras claves: antiinflamatorios, clonixinato de lisina, función plaquetaria, P-selectina, hemostasia perioperatoria

Abstract *Effects of lysine clonixinate on platelet function. Comparison with other non-steroid anti-inflammatory drugs.* One of the mechanisms of action of non steroid antiinflammatory drugs (NSAIDs) consists of inhibition of prostaglandin synthesis. This explains many of the pharmacological effects and adverse events observed in medical practice. Administration of NSAIDs to patients with hemostatic disorders or perioperative conditions entails the risk of bleeding due to inhibition of platelet function. This study deals with platelet changes induced by lysine clonixinate vs diclofenac, ibuprofen and aspirin in classical tests such as platelet count, platelet factor 3 (PF3) activity and platelet aggregation with various inductors and more recent procedures such as P-selectin measurement by flow cytometry. Unlike control drugs, lysine clonixinate did not induce changes in platelet count or function when administered to healthy volunteers at the commonly used therapeutic doses.

Key words: antiinflammatory agents, lysine clonixinate, platelet function, P-selectin

Los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) tienen numerosas indicaciones en la práctica clínica habitual. Además de controlar el dolor presentan otras propiedades farmacológicas que pueden configurar ventajas o inconvenientes según el fin buscado y la magnitud de la respuesta alcanzada.

Un claro ejemplo es el efecto inhibitorio sobre la función plaquetaria cuyo empleo en la prevención y tratamiento de los accidentes de placa ha modificado la evolución y el pronóstico de la enfermedad aterosclerótica^{1,2}; por el contrario esta propiedad puede ser

riesgosa en enfermedades congénitas o adquiridas de la coagulación, en los trastornos cualitativos o cuantitativos de las plaquetas, en los pacientes sometidos a tratamiento con heparina, con anticoagulación crónica o antiagregación plaquetaria intensa³ o en los estados perioperatorios. Precisamente en estos casos sería conveniente contar con un fármaco que no altere la hemostasia.

Los AINEs como grupo interfieren la función plaquetaria inhibiendo la agregación en grados diversos.

Los nuevos conocimientos sobre la farmacodinamia de los AINEs orientan a la búsqueda de fármacos con acción selectiva sobre la ciclooxigenasa 2 o inducida por mecanismos histolesivos, sin modificación de la ciclooxigenasa 1 o constitutiva, de la cual dependen funciones fisiológicas que es conveniente respetar.

Recibido: 22-IV-1999

Aceptado: 27-II-2001

Dirección Postal: Dr. Alfredo Kaminker, Paraguay 2302, 1121 Buenos Aires, Argentina.

FAX: (54-11) 4961-7778

e.mail: euroway@sinectis.com.ar

Dado que las plaquetas sólo poseen ciclooxigenasa 1, presuntamente poco influida por el clonixinato de lisina^{4,6} se ha llevado a cabo el presente estudio para evaluar su actividad inhibitoria sobre las plaquetas, y compararla con la de otros AINEs como el ácido acetil salicílico (AAS), ibuprofeno y diclofenac.

Materiales y métodos

Pacientes:

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas. Los participantes en el estudio dieron su conformidad por escrito, previa información sobre el desarrollo del mismo. Los voluntarios fueron controlados clínicamente a lo largo de todo el estudio.

Se estudiaron 18 voluntarios sanos, de sexo masculino y de edades entre 21 y 38 años.

La condición de sanos fue establecida por historia clínica, examen físico y estudios de laboratorio que comprendieron: hemograma, eritrosedimentación, urea, glucemia, uricemia, hepatograma, gamaglutamil transpeptidasa, proteinograma electroforético, tiempo de Quick, KPTT, recuento de plaquetas, tiempo de sangría, tiempo de coagulación, pruebas para hepatitis B y C, pruebas para HIV, ionograma sérico y examen físico - químico y sedimento de orina.

Se excluyeron los voluntarios con enfermedades crónicas, antecedentes de operaciones quirúrgicas dentro de los 2 meses previos, transfusiones, deportistas competitivos y fumadores.

Drogas en estudio

El clonixinato de lisina (sal de L-lisina del ácido 2-[(3-cloro-2-metilfenil)-amino]-3-piridinocarboxilato) es un analgésico antiinflamatorio no esteroide derivado del ácido antranílico cuyo mecanismo de acción fundamental sería la inhibición de la ciclooxigenasa 2^{4,5}, lipooxigenasa y óxido nítrico sintasa.

La administración de 1 comprimido de 125 mg cada 6 horas durante 4 días mostró (C_{máx} 5.6 ± 2.1 µg.h/ml, ABC 7.8 ± 2.2 µg.h/ml) que se conservan las características cinéticas de la administración de una dosis única (C_{máx} 5.8 ± 2.4 µg.h/ml, ABC 7.3 ± 2.3 µg.h/ml).

Se administraron 4 diferentes AINEs por vía oral a dosis terapéuticas. Un lapso de lavado de 7 a 10 días medió entre cada ciclo terapéutico. La secuencia de los mismos se realizó en forma aleatoria. Se eligió como último fármaco para todos los voluntarios al AAS. Esta decisión se tomó ya que debido al efecto más prolongado de la mencionada droga, el tiempo de lavado excedía los 15 días, lo que prolongaría en exceso la duración del estudio y el tiempo requerido a los voluntarios.

El plan de tratamiento para cada fármaco fue:

1. Clonixinato de lisina: 125 mg, 1 comprimido tres veces por día durante tres días y un comprimido una hora antes del estudio.
2. Ibuprofeno: 400 mg, 1 comprimido tres veces por día durante tres días y un comprimido una hora antes del estudio.
3. Diclofenac: 50 mg, 1 comprimido dos veces por día y un comprimido una hora antes del estudio.
4. Ácido acetil salicílico (AAS): 500 mg, 1 comprimido una vez por día durante tres días y un comprimido una hora antes del estudio.

La última dosis previa a la toma de la muestra de sangre fue administrada en el laboratorio para asegurar el cumplimiento de la indicación.

Muestras de sangre

Las muestras de sangre se extrajeron por punción venosa, con mínimo trauma.

Se recolectó la sangre en tubos plásticos conteniendo EDTA tripotásico al 15% p/v para los recuentos celulares y en tubos conteniendo citrato de sodio 3.13% para los estudios de agregación plaquetaria, citometría de flujo y expresión de PF3. Las muestras previas y posteriores a la administración de cada AINE se procesaron dentro de las 2-3 horas de obtenidas.

Recuento de plaquetas

Los recuentos plaquetarios se realizaron en forma manual y automatizada y control con extendidos de sangre periférica. Valor normal para adultos: 150 – 400 x 10⁹ / L.

Agregación plaquetaria

Se evaluó en plasma rico en plaquetas (PRP) empleando el método óptico de Born⁷. Se utilizó un agregómetro óptico de dos canales (Chrono-Log, modelo 490) con un registrador de dos plumas (Chrono-Log modelo 707) y con un software (Aggro-Link)

La sangre citratada fue centrifugada a 100 g durante 20 minutos para la obtención de PRP. Luego el resto de la muestra se centrifugó a 2000 r.p.m., para obtener plasma pobre en plaquetas (PPP). Se ajustó el número de plaquetas de los PRP con los PPP autólogos a 300 x 10⁹ / L.

Como agregantes se utilizaron los siguientes agonistas: a) ADP (Sigma) 8 µM, 4 µM, 2 µM y 1 µM; b) AA (ácido araquidónico) (Sigma) 1.2 mM; c) Colágeno de tendón (Mediatech) 2 µg/ml.

Se evaluaron cambios de forma, período de latencia y amplitud máxima de cada curva de agregación (Expresada en % de la escala de graficación).

El porcentaje de inhibición de los AINEs sobre la agregación plaquetaria se calculó midiendo la amplitud máxima de la curva de agregación en el estado basal y se la comparó con la obtenida post-tratamiento.

Determinación de factor 3 plaquetario (PF3)

Se midió la disponibilidad de PF3 en PRP ajustado a 200 x 10⁹ / L plaquetas, según la técnica de Hardisty RM et al.⁸. El rango normal se calculó con el PRP obtenido de 62 controles sanos tomados al azar de los donantes de un banco de sangre. (X ± DS= 33 ± 4 segundos).

Determinación de la expresión de CD 62P.

Se midió la expresión de P-selectina plaquetaria en PRP de los 18 voluntarios en estado basal y post-tratamiento con cada uno de los AINEs. Se estimuló con colágeno de tendón 2 µg/ml. Las plaquetas en reposo y post-estimulación con colágeno se marcaron utilizando un método directo con el anticuerpo monoclonal CD 62P-FITC (Immunotech International). Se fijaron con paraformaldehído 2% en PBS y se conservaron a 4°C hasta el momento de la lectura (período ≤ una semana).

Control negativo: Anti-IgG1-ratón-FITC (Immunotech International).

Se cuantificó con citómetro de flujo ORTHO Cytotron Absolute (argón-laser) de 15 nW de potencia. Se analizaron los resultados con el software WinMDI 2.5⁹⁻¹¹. Las plaquetas marcadas se observaron también por microscopía de fluorescencia. Se compararon los resultados basales con los obtenidos post-tratamiento calculándose el porcentaje de inhibición de la

activación plaquetaria¹²⁻¹⁵. El estudio de agregación plaquetaria por el método óptico de Born, la expresión de P-selectina por citometría de flujo como CD 62P, la expresión de PF3 y los recuentos plaquetarios, fueron realizados en los 18 voluntarios en forma basal (como uno de los criterios de inclusión en el protocolo de trabajo) y después de haber sido medicados con los distintos antiinflamatorios (según el esquema terapéutico mencionado anteriormente).

Estadística

Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA no paramétrico de Friedman y posterior test de Dunn, ya que no se pudo demostrar la normalidad de los datos grupales. La significación fue considerada cuando la probabilidad (p) fue menor de 0.05.

Resultados

Recuento de plaquetas y disponibilidad de PF3

No se observaron modificaciones entre los recuentos de plaquetas ni en las determinaciones de PF3 basales y las posteriores a la administración de AINEs (Tabla 1).

Efecto inhibitorio de los AINEs sobre la agregación plaquetaria

El AAS mostró un efecto inhibitorio altamente significativo con todos los agonistas utilizados, en especial con el

TABLA 1.- Recuento de plaquetas y disponibilidad de PF3

	Recuento de Plaquetas (valores x 10 ⁹ / L)				
	Basal	Post Clonixinato de lisina	Post Diclofenac	Post Ibuprofeno	Post AAS
Media	220	225	229	232	230
DS	30	40	38	34	38
N	18	18	18	18	18
Normal: 150 – 400 x 10 ⁹ /L					
	Disponibilidad de PF3 en segundos				
	Basal	Post Clonixinato de lisina	Post Diclofenac	Post Ibuprofeno	Post AAS
	33 ± 3	34 ± 3	34 ± 2	34 ± 3	35 ± 3
VN: 33 ± 4 segundos					

VN = Valor Normal; PF3 = Factor 3 plaquetario

TABLA 2.- Comparación de los efectos inhibitorios sobre la agregación plaquetaria y en la expresión de CD 62P, inducidos por los diferentes AINEs (Significaciones estadísticas).

	Clonixinato de lisina				Diclofenac				Ibuprofeno			
	Agregación Plaquetaria			CD 62P	Agregación Plaquetaria			CD 62P	Agregación Plaquetaria			CD 62P
	ADP	AA	COL		ADP	AA	COL		ADP	AA	COL	
Diclofenac	NS	<0.001	<0.05	<0.05	---	---	---	---	---	---	---	---
Ibuprofeno	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	NS	NS	NS	NS	---	---	---	---
AAS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

P ≤ 0.05

ADP = Adenosin difosfato; AA = Acido araquidónico; COL = Colágeno de tendón; NS = No significativo

ADP y el ácido araquidónico. Las curvas de agregación plaquetaria de los 18 voluntarios sanos fueron reversibles; aún a concentraciones elevadas de ADP (8 µM) todos los trazados carecieron de segunda ola de agregación.

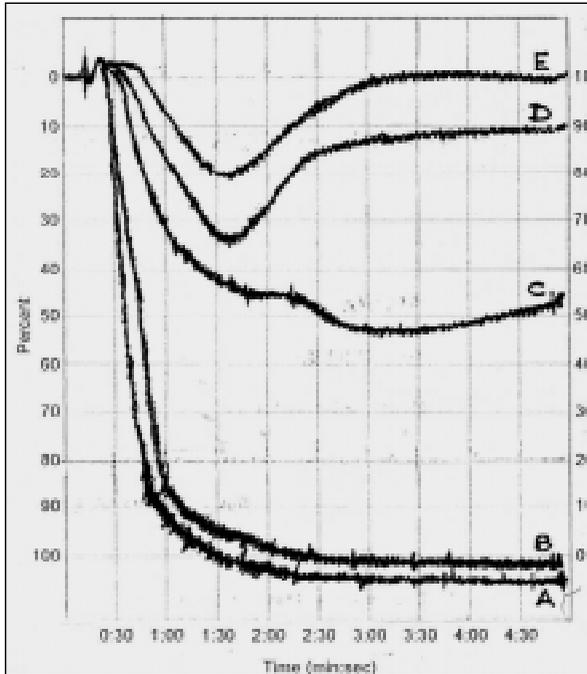


Fig. 1.- Agregación inducida por ADP 4 µM. A) basal; B) post clonixinato de lisina, C) post diclofenac sódico, D) post ibuprofeno, E) post AAS. ADP = Adenosin difosfato

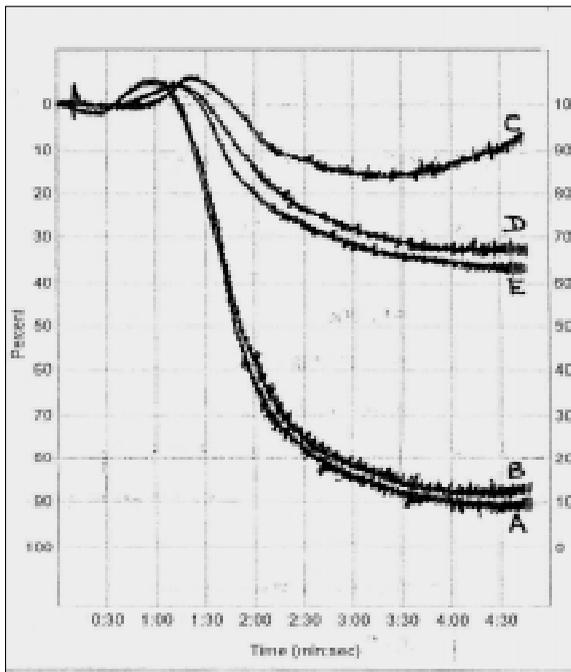


Fig. 2.- Agregación inducida por colágeno 2 µg/ml. A) basal, B) post clonixinato de lisina, C) post diclofenac sódico, D) post ibuprofeno, E) post AAS

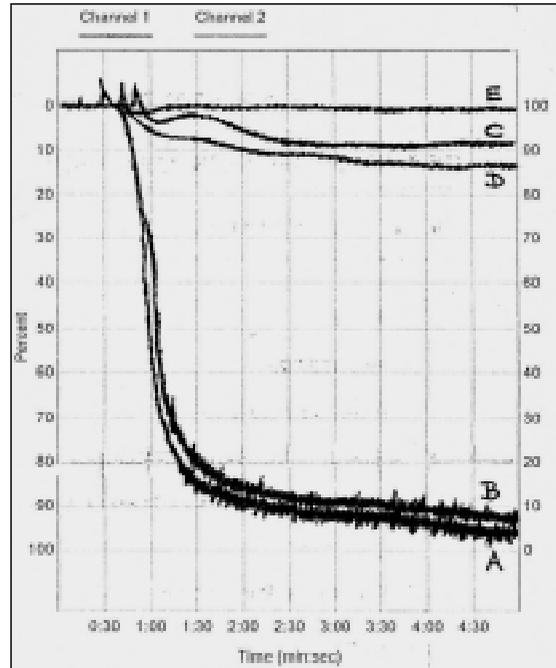


Fig. 3.- AA 1,2 mM. A) basal, B) post clonixinato de lisina, C) post diclofenac sódico, D) post ibuprofeno, E) post AAS

Respuestas similares pero con menor intensidad se hallaron con ibuprofeno y diclofenac (Fig. 1, 2 y 3). El clonixinato de lisina no produjo efecto inhibitorio con ninguno de los agentes agregantes al nivel de significación $p < 0.05$ (Tabla 2).

Expresión de P-Selectina plaquetaria. Análisis por citometría de flujo (Figuras 4 a 9)

En los histogramas se representa sobre el eje de las abscisas la intensidad de fluorescencia y sobre el de las ordenadas, el recuento de plaquetas.

La Fig. 4 compara el área debajo de los histogramas correspondientes a: a) Expresión de CD 62P en plaquetas estimuladas y b) Control negativo, indicador de la marcación inespecífica de las plaquetas.

Nótese la coincidencia entre a) y b) en cada una de las experiencias; esto nos muestra que ninguno de los voluntarios participantes presentó activación de sus plaquetas en estado basal (criterio de inclusión en el protocolo de estudio realizado). También nos sirve como control de calidad del método empleado, ya que ni en la extracción de sangre, ni en la obtención del plasma rico en plaquetas se produjo activación plaquetaria con la consiguiente expresión en la membrana celular de la GMP-140 (PADGEM P-Selectina), identificados como CD 62P.

Las Fig. 5, 6, 7, 8, 9 comparan el área debajo de los histogramas correspondientes a: b) Control negativo c)

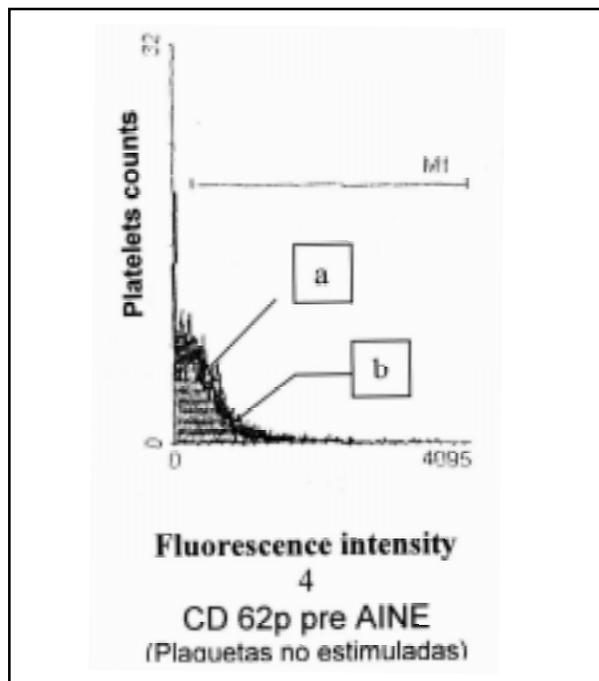


Fig. 4.- HISTOGRAMAS. a- Expresión CD 62p en plaquetas no estimuladas; b- Control negativo

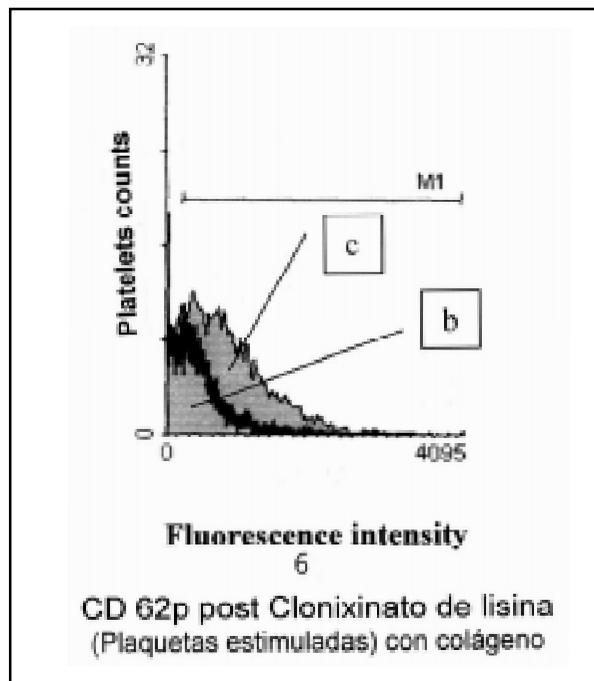


Fig. 6.- HISTOGRAMAS. b- Control negativo; c- Expresión CD 62p plaquetas estimuladas con colágeno

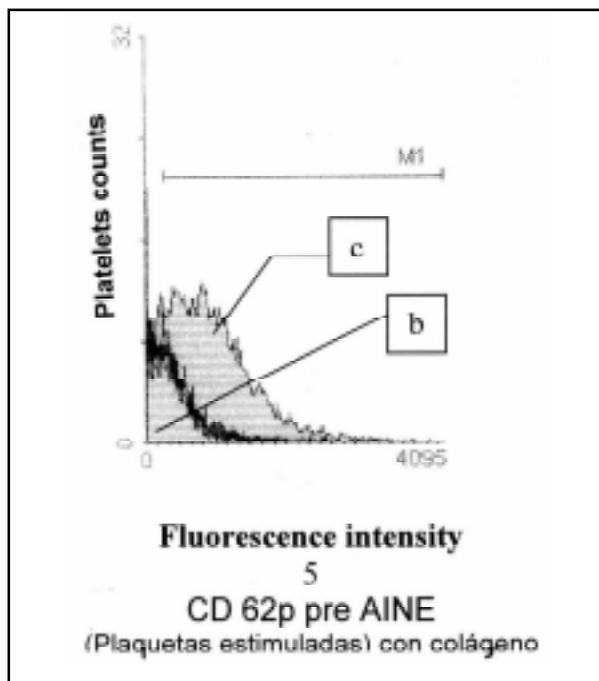


Fig. 5.- HISTOGRAMAS. b- Control negativo; c- Expresión CD 62p plaquetas estimuladas con colágeno

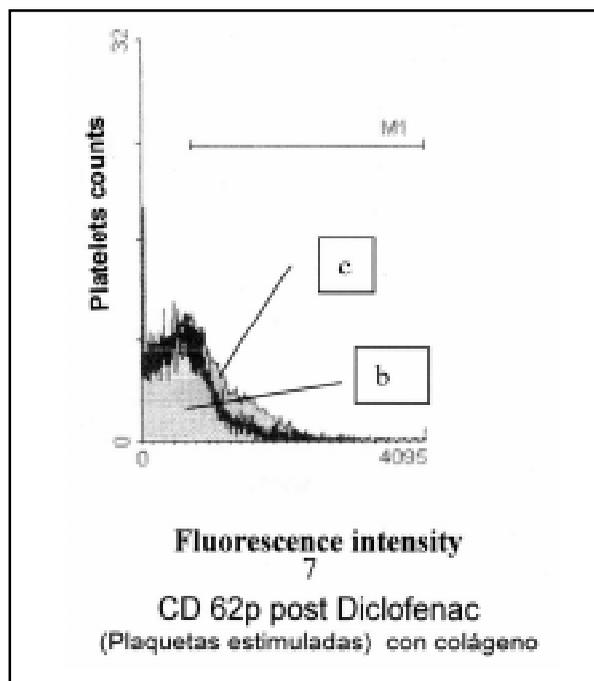


Fig. 7.- HISTOGRAMAS. b- Control negativo; c- Expresión CD 62p plaquetas estimuladas con colágeno

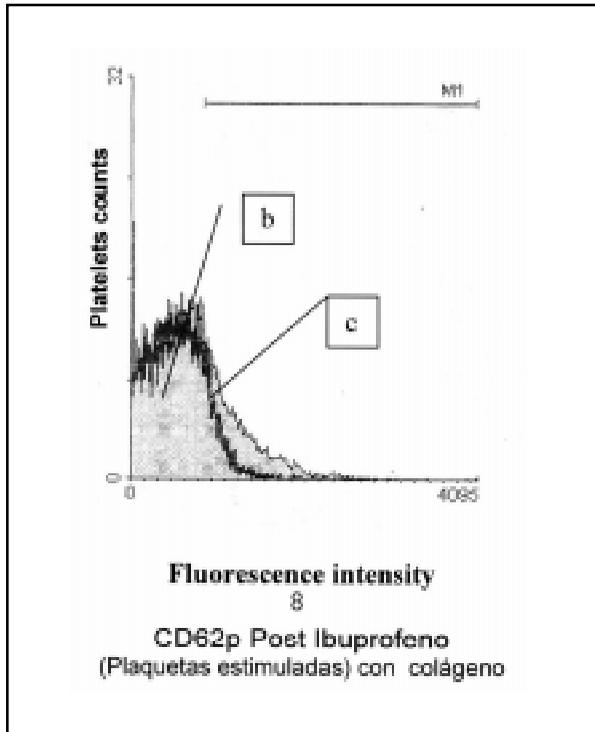


Fig. 8.- HISTOGRAMAS. b- Control negativo; c- Expresión CD 62p plaquetas estimuladas con colágeno

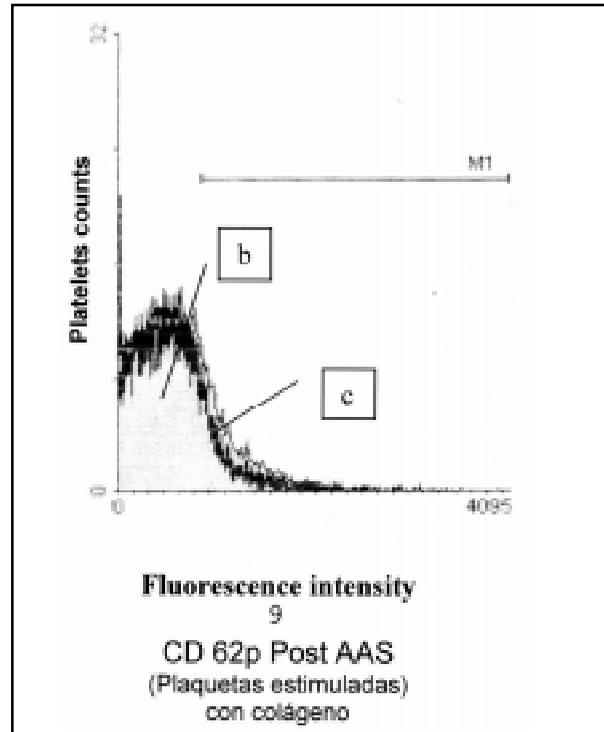


Fig. 9.- HISTOGRAMAS. b- Control negativo; c- Expresión CD 62p plaquetas estimuladas con colágeno

Expresión de CD 62P en plaquetas estimuladas con colágeno.

El área debajo del trazado c) de la Fig. 5 representa la expresión de CD 62P en las plaquetas estimuladas con colágeno, previo a recibir alguno de los diferentes AINEs (basal), en la Fig. 6, después de clonixinato de lisina, en la 7 posterior a diclofenac sódico, en la 8 post ibuprofeno y en la 9 post AAS. Nótese que el área debajo del trazado c) y el de b) es mayor en la Fig. 5 y disminuye en los siguientes indicando una reducción de la expresión de CD 62P plaquetario. Cuanto menor es el área mayor es el efecto inhibitorio del AINE. No existieron diferencias significativas entre los valores basales y

los obtenidos post - administración de clonixinato de lisina.

Discusión

La utilización de analgésicos con efecto inhibitorio plaquetario como los AINEs convencionales en tratamientos anticoagulantes, en pacientes con defectos hemostáticos o incluso en aquellos que requerirían un sistema hemostático indemne, como los recientemente operados, constituye un problema aún no resuelto. Usualmente se recurre a drogas antitérmicas pero con débil

TABLA 3 .- Efecto inhibitorio de los AINEs en la agregación plaquetaria y en la expresión de CD 62P en la membrana plaquetaria (Expresado en porcentajes de inhibición)

	clonixinato de lisina				diclofenac				ibuprofeno				AAS			
	Col	AA	ADP	CD62P	Col	AA	ADP	CD62P	Col	AA	ADP	CD62P	Col	AA	ADP	CD62P
N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Mediana	0	0	3.5	2	59.5	100	47	52.5	69	100	55.5	56	65	100	65	61.5
Rango	0-19	0-23	0-22	0-25	0-100	0-100	0-67	0-95	44-100	69-100	41-65	49-73	50-100	87-100	50-86	46-71

ADP = Adenosin difosfato; AA = Acido araquidónico; COL = Colágeno de tendón; AAS = Acido acetil salicílico

actividad analgésica o a otras de mayor eficacia analgésica pero serios efectos colaterales, como los opiáceos.

Los efectos inhibitorios de los diferentes AINEs pueden verse con claridad tanto en las curvas de agregación plaquetaria como en la expresión de CD 62P en la membrana plaquetaria post estimulación con colágeno (Tabla 3). En aquellos casos en los que se evidenció inhibición de la agregación también se observó disminución de la expresión de CD 62P. Existió una buena correlación entre ambos métodos de evaluación de la función plaquetaria (Tabla 3). Los voluntarios 5,10 y 11 mostraron un ligero efecto inhibitorio con clonixinato de lisina. Los voluntarios 6, 8 y 10 no lo presentaron con diclofenac.

El clonixinato de lisina no produjo modificación de la función plaquetaria en las dosis terapéuticas utilizadas y en las condiciones del estudio realizado. Así mismo se halló una diferencia significativa en el efecto producido entre el clonixinato de lisina y los otros AINEs. Esta diferencia fue muy notable con el ácido araquidónico como agente agregante.

No se encontraron diferencias en la evaluación comparativa de los otros AINEs entre sí.

Si bien la utilización de esta droga en situaciones en las que es preferente evitar la alteración de la hemostasia, está ya relativamente difundida en algunos países de Latinoamérica y España, no existían datos actualizados que avalaran dicha estrategia como los obtenidos en el presente estudio.

En el mismo se comparan los efectos sobre distintos parámetros de la función plaquetaria, del clonixinato de lisina, respecto de otros fármacos de potencia analgésica parecida y efectos colaterales comparables utilizados en situaciones similares.

Para ello se emplearon técnicas que miden diferentes funciones plaquetarias y que en reportes anteriores no habían sido comparadas^{16,17} tales como el ya tradicional método óptico turbidimétrico de Born⁷, y la medición de la P-selectina plaquetaria por citometría de flujo⁹⁻¹¹, más recientemente incorporada en la práctica clínica como en experimentación.

Por lo tanto el clonixinato de lisina dentro del grupo de los AINEs, puede ser de utilidad clínica en aquellos pacientes en los cuales es necesario evitar el efecto antihemostático y el sangrado.

Agradecimientos: Los autores agradecen la excelente asistencia técnica para la realización del presente trabajo de la Sra. Gabriela Naón. (Técnica hematóloga División Hematología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires)

Bibliografía

1. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy. I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994; 308: 81-106.
2. Cairns JA, Thérout P, Lewis D, et al. Antithrombotic agents in coronary artery disease. In fifth ACCP Consensus Conference on Antithrombotic. *Therapy. Chest* 1998; 114: 634S-58S.
3. Chant TY. Adverse interactions between warfarin and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Ann Pharmacother* 1995; 29: 1274-83.
4. 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, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1990; 58: 421-4.
5. 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.
6. Franchi AM, 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.
7. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963; 16: 1978.
8. Hardisty RM, Hutton RA. The kaolin time of platelet rich plasma: a test of platelet factor 3 availability. *B J Haematol* 1965; 11: 258.
9. Schmitz G, Rothe G, Ruf A et al. European working group on clinical cell analysis. Consensus protocol for the flow cytometric characterization of platelet function. *Thromb Haemost* 1998; 79: 885-96.
10. Michelson AD, Shattil DJ: The use of flow cytometry to study platelet activation. In: *Watson SP, Authi KS (Eds.). Platelets. A practical approach. Oxford: University Press Oxford* 1996, 11-29.
11. Michelson AD. Flow cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87: 4925-36.
12. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost* 1991; 65: 467.
13. Hamborger SA, McEver RP. GMP-140 mediated adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 1990; 75: 550.
14. Shattil SI, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987; 70: 307-15.
15. Stemberg PE, McEver RP, Shuman MA, et al. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985; 101: 880-6.
16. Escobar G, White JG. Review Article: Changes in glycoprotein expression after platelet activation: Differences between in vitro and in vivo studies. *Thromb Haemost* 2000; 83: 371-86.
17. Matzdorff AC, Kemkesmatthes B, Voss R, Pralle H. Comparison of beta thromboglobulin, flow cytometry and platelet aggregation to study platelet activation. *Haemostasis* 1996; 26: 98-106.