

## EFFECTO DEL CLONIXINATO DE LISINA Y LA INDOMETACINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA LIPOOXIGENASA Y LA CICLOOXIGENASA DE COLON AISLADO DE PACIENTES CON NEOPLASIAS

ANA FRANCHI<sup>1</sup>, GUILLERMO DI GIROLAMO<sup>2</sup>, ANTONIO RAUL DE LOS SANTOS<sup>3</sup>, MANUEL LUIS MARTI<sup>3</sup>, MARTHA A.F. GIMENO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO); <sup>2</sup> Segunda Cátedra de Farmacología; <sup>3</sup> Primera Cátedra de Medicina, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

**Resumen** Las ulceraciones de la mucosa gástrica y colónica producida por los antiinflamatorios no esteroides (AINES) son producidas por la reducción de la síntesis de prostaglandinas (PGs) por inhibición de la ciclooxigenasa. Por otro lado se ha demostrado que los productos de la 5-lipooxigenasa (5-LO) son agentes ulcerogénicos. En algunos casos el uso de AINES se acompaña de una mayor producción de productos de la 5-LO debido a un exceso de sustrato (ácido araquidónico) al estar bloqueada la ciclooxigenasa. Cuando ocurre esto último aumentan los efectos lesivos de los AINES ya que no sólo disminuyen las PGS citoprotectoras, sino que también aumentan los productos de la 5-LO. El objeto de este trabajo, fue estudiar en segmentos de colon aislado de pacientes con neoplasias el efecto del Clonixinato de lisina (CL) y de la indometacina (INDO) sobre la síntesis de PGs e hidroxiácidos (HETEs). Las concentraciones de CL (4 y 6 µg/ml) y de indo (0,035 y 0,35 µg/ml) utilizadas, se corresponden con los valores plasmáticos alcanzados con dosis terapéuticas orales de ambas drogas. Se observó que el CL con ninguna de las dosis utilizadas modificó la producción basal de PGE<sub>2</sub>. Por el contrario la INDO inhibió significativamente la síntesis de PGE<sub>2</sub> con ambas dosis. Llamó la atención que el CL tanto a 4 µg/ml como a 6 µg/ml produjo una profunda disminución en la producción de 5-HETE, efecto sólo observado con la concentración más alta de INDO. Este resultado indicaría una probable acción inhibitoria sobre la 5-LO, primera enzima del camino metabólico del ácido araquidónico hacia la formación de HETEs y LTs. Concluimos que el CL en dosis terapéuticas tiene un mecanismo de acción diferente al de los AINES clásicos. Los datos obtenidos en este estudio explicarían la baja incidencia de efectos gastrointestinales lesivos observados con CL.

**Abstract** *Effect of lysine clonixinate and indomethacin on the lipooxygenase and cyclooxygenase activity of colon isolated from cancer patients.* The non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) induced ulcerations in the gastrointestinal tract are possibly associated with the reduction in prostaglandin (PGs) synthesis due to the inhibition of cyclooxygenase. On the other hand, it has been shown that 5-lipooxygenase products (5-LO) are ulcerogenic agents. In some cases, the utilization of NSAIDS stimulates 5-LO pathway to an excess of arachidonic acid because of cyclooxygenase inhibition. In these cases, the damage produced by NSAIDS is greater, since not only the cytoprotective PGs decrease but also the products of 5-LO are increased. The object of the present paper was to study the effects of lysine clonixinate (LC) and indomethacin (INDO) on PGs and 5-HETE synthesis. The concentrations used of LC (4 and 6 µg/ml) and INDO (0.035 µg/ml and 0.35 µg/ml) correspond to the plasmatic values reached with oral therapeutic doses for both drugs. The results show that in no case did LC reduce the production of PGE<sub>2</sub>. On the contrary INDO inhibited significantly the synthesis of PGE<sub>2</sub>. It is interesting to mention that LC 4 and 6 µg/ml inhibited drastically the production of 5-HETE. Only with the higher concentration of INDO did we observe a similar effect. These results may indicate an inhibitory action on 5-LO, the first enzyme in the metabolic pathway of arachidonic acid in the production of HETEs and LTS. We conclude that LC in therapeutic doses has a mechanism of action different from the classical NSAIDS. The data obtained in this study could explain the low incidence in gastrointestinal lesions with LC.

**Key words:** prostaglandins, lysine clonixinate, indomethacin, human colon

Las drogas antiinflamatorias no esteroides (AINES) se utilizan en el tratamiento de desórdenes inflamatorios agudos y crónicos. El mecanismo antiinflamatorio de los

AINES se basa en la reducción de la síntesis de prostaglandinas (PGs) por la inhibición directa de la ciclooxigenasa, enzima encargada de la producción de PGs<sup>1</sup>. Pero la inhibición de la producción de PGs en órganos tales como el estómago, el riñón y las plaquetas puede resultar en lesiones gástricas, nefrotoxicidad y aumento en el sangrado.

Las ulceraciones de la mucosa gástrica y colónica, como así también las hemorragias por los AINES, han

Recibido: 31-X-1997

Aceptado: 15-IV-1998

Dirección postal: Dra. Martha F. Gimeno, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CEFYBO, Serrano 669, 1414 Buenos Aires, Argentina. Fax: 54-1-856-2751.

sido principalmente relacionadas a una disminución de la PGs citoprotectoras, especialmente la PGI<sub>2</sub> y la PGE<sub>2</sub>.<sup>2</sup>

Existe evidencia experimental que algunos leucotrienos (LTs) pueden afectar la mucosa gástrica. La infusión de LTD<sub>4</sub> a gatos anestesiados resulta en una disminución de la diferencia del electropotencial transmucosa, que se refleja a una caída de la barrera mucosa y un aumento de la secreción de pepsina<sup>3</sup>.

Cuando se inhibe la ciclooxigenasa, enzima involucrada en el camino biosintético de las PGs, se puede producir un aumento en los productos de la 5-lipooxigenasa, enzima que sintetiza 5-HPETE, 5-HETE y LTs, debido al exceso de ácido araquidónico, que es sustrato de ambas enzimas. Por lo tanto el efecto lesivo de los AINES sobre la mucosa gástrica y colónica se debería no sólo a la disminución de las PGs citoprotectoras sino también a un aumento de los productos de la vía de la 5-lipooxigenasa, que llevarían al daño en la misma. El clonixinato de lisina (CL) (Dorixina<sup>®</sup> - Laboratorios Roemmers, Buenos Aires) es un AINE con efecto analgésico y antiinflamatorio que ha probado tener excelente tolerabilidad y baja incidencia de efectos adversos<sup>4,5</sup>. Estas características sugerirían de un mecanismo de acción distinto al de los AINES clásicos como la indometacina (INDO) (SIGMA Chemical Company).

El objetivo de este trabajo fue estudiar, en segmentos colónicos humanos, el efecto del CL y de la INDO sobre la síntesis de PGs e hidroxiácidos (HETEs). Las concentraciones del CL (4 y 6 µg/ml equivalentes a  $4.1 \times 10^{-6}$ M y  $6.8 \times 10^{-6}$ M) e INDO (0.035 µg/ml y 0.35 µg/ml equivalentes a  $10^{-7}$ M y  $10^{-6}$ M) utilizadas en este experimento se corresponden con las alcanzadas por dosis terapéuticas orales de ambas drogas. En la figura 1 se grafican los perfiles plasmáticos luego de dosis orales de 125 mg de CL y 50 mg de INDO<sup>6,7</sup>.

Se trabajó con segmentos colónicos sanos pertenecientes a 30 pacientes que fueron sometidos a hemicolectomía por cáncer de colon n = (20) y poliposis colónica n = (10). En todos los casos se obtuvo el consentimiento por escrito de los pacientes.

Los segmentos colónicos de aproximadamente 5 x 5 mm fueron incubados durante 60 minutos en Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) y tratados al azar con CL ( $4.1 \times 10^{-6}$ M y  $6.8 \times 10^{-6}$ M) o indometacina ( $10^{-7}$  y  $10^{-6}$ M). Los controles se incubaron solamente en KRB. En todos los casos el KRB contenía 0.25 µCi de ácido araquidónico <sup>14</sup>C y fue gaseado con carbógeno. Para cada determinación se utilizaron aproximadamente 300 mg de tejido. Al finalizar el tiempo de incubación, los tejidos fueron removidos y el medio se utilizó para la medición de PGE<sub>2</sub> y 5-HETE, (productos metabólicos de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa) de acuerdo a la técnica descrita previamente<sup>8</sup>.

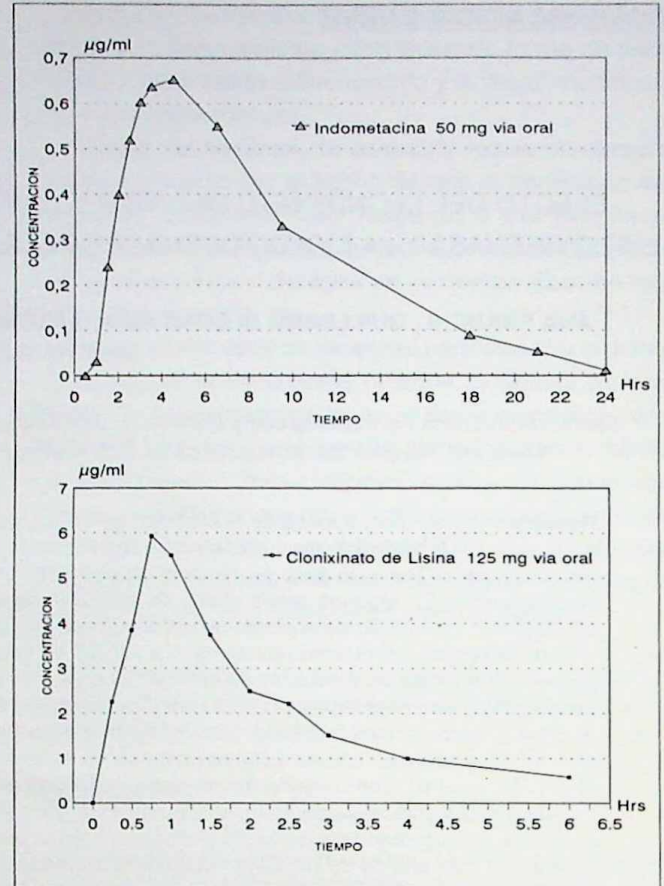


Fig. 1.— Perfiles plasmáticos luego de dosis orales de 125 mg de CL (tomado de referencia 6 con autorización del autor) y 50 mg de INDO (curva construida con los datos publicados en referencia 7) CL: clonixinato de lisina INDO: indometacina.

Los datos obtenidos fueron analizados por el Test de comparaciones múltiples Student Newmann Keuls y las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue igual o menor del 5%.

Como puede observarse en la figura 2A el CL agregado al medio de incubación ( $4.1 \times 10^{-6}$ M y  $6.8 \times 10^{-6}$ M) no modificó la PGE<sub>2</sub> producida por los controles. Por el contrario, INDO en concentraciones de  $10^{-7}$ M y  $10^{-6}$ M inhibió significativamente ( $p \leq 0.001$ ) la producción de PGE<sub>2</sub>, la que se redujo aproximadamente en un 50%.

La figura 2B muestra claramente una profunda inhibición en la producción de 5-HETE cuando los tejidos fueron incubados con las dos concentraciones de CL ( $4.1 \times 10^{-6}$ M y  $6.8 \times 10^{-6}$ M). Por otro lado cuando se agregó al medio INDO en una concentración de  $10^{-7}$ M la producción de 5-HETE no se modificó. Solamente utilizando una concentración de INDO 10 veces mayor se observó una inhibición en la formación del hidroperóxido.

Es conocido que las PGs se sintetizan en todo el tracto gastrointestinal. En la mucosa gástrica humana las PGs

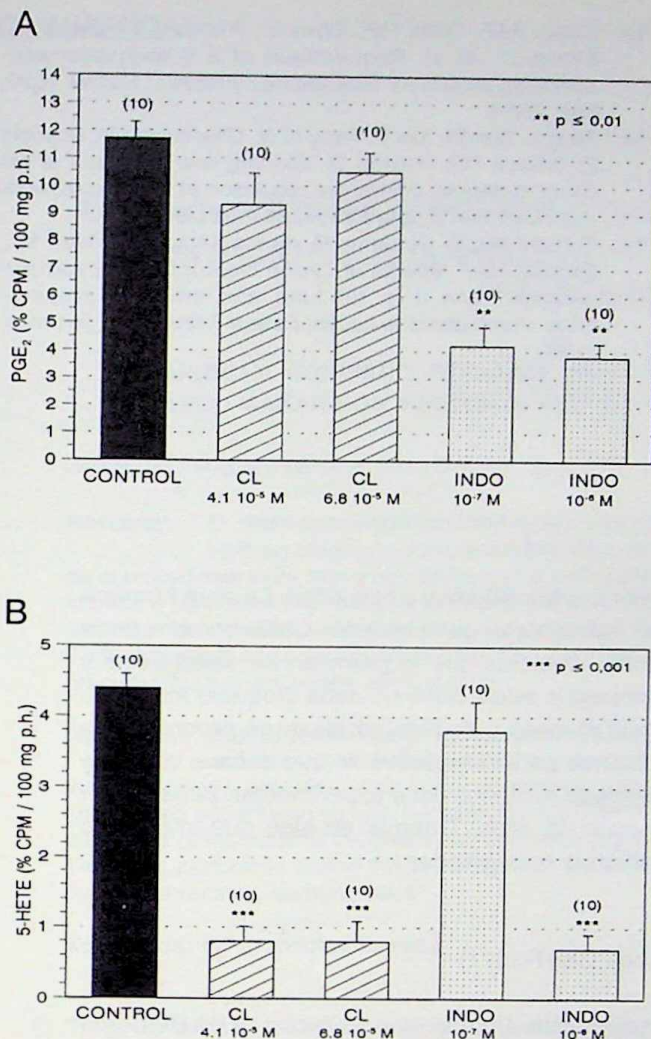


Fig. 2.— a) Producción de PGE<sub>2</sub> por segmentos de colon humano a partir de ácido araquidónico marcado. b) Producción de 5-HETE por segmentos de colon humano a partir de ácido araquidónico marcado. CL: clonixinato de lisina, INDO: indometacina. Cada barra representa la media ± SEM de 10 experimentos independientes. Número entre paréntesis = número de casos.

más abundantes son las PGE<sub>2</sub> y la PGF<sub>2α</sub>, en menor cantidad se producen PGD<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub><sup>9</sup>. En el intestino también predominan la PGE<sub>2</sub> y la PGF<sub>2α</sub> que son producidas por las células epiteliales, subepiteliales y las células inmunológicas infiltradas en la lámina propia<sup>10</sup>. Es ampliamente reconocida la acción citoprotectora y antisecretoria de las PGs<sup>11</sup>. Por otro lado se ha descrito a los LTS como mediadores de la úlcera gástrica<sup>12</sup>. Las concentraciones utilizadas de CL como muestra la figura 1 son las que se alcanzan en plasma a dosis terapéuticas, en este trabajo a estas concentraciones inhibieron la conversión del ácido araquidónico a 5-HETE, hecho que muestra una probable acción inhibitoria sobre la 5-lipooxigenasa, primera enzima del camino metabólico de

los HETES y LTS. No podemos descartar que la inhibición se deba a una acción a nivel de una proteína fijadora recientemente descubierta que transporta el ácido araquidónico a las lipooxigenasas<sup>13</sup>.

Existen marcadas diferencias entre varios AINES con respecto a los efectos secundarios en el pulmón, riñón y aparato gastrointestinal. La ciclooxigenasa es la enzima que convierte el ácido araquidónico en PGs y LTs. El descubrimiento de 2 tipos diferentes de ciclooxigenasa (COX I y COX II) permitió interpretar estas diferencias<sup>14</sup>. La COX I es constitutiva y sintetiza las PGs basales que cumplen por lo general funciones fisiológicas en todos los tejidos. Por el contrario, la COX II es inducida por diversos agentes y es la que sintetiza las PGs responsables de muchos estados patológicos. Se ha demostrado una estrecha relación entre la inducción de COX II y la respuesta inflamatoria. En estudios previos hemos demostrado que el CL inhibe la producción de PGs en animales tratados con LPS (lipopolisacárido) conocido inductor de la COX II, sin modificar la producción basal de PGs (COX I)<sup>15</sup>. En el presente estudio hemos encontrado que el CL en dosis terapéuticas tiene un mecanismo de acción diferente al de los AINES clásicos, pues no inhibe la formación de PGE<sub>2</sub>, probablemente porque no afecta la COX I<sup>15</sup> e inhibe en forma potente la 5-lipooxigenasa y por consiguiente la síntesis de LTs. Dichas acciones explicarían la baja incidencia de efectos lesivos gastrointestinales.

## Bibliografía

- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* 1971; 231: 232-5.
- Rainsford KD. Side-effects of anti-inflammatory drugs. In: Rainsford KD, Velo G, (eds), Lancaster; MTP Press; 1987. p. 3-26.
- Pendleton RG, Stavroski JR. Evidence for differing leukotriene receptors in gastric mucosa. *Eur J Pharmacol* 1986; 125: 297-9.
- 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: 894-5.
- Bidlingmayer A, Hammermaier A, Nagyiványi P, Pabst G, Waitzinger J. Gastrointestinal blood loss induced by three different non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Arzneim Forsch Drug Res* 1995; 45 (Suppl 1): 491-3.
- Rubio MC. Pharmacokinetic of Lysine clonixinate. 1st. International Conference on Pain. Buenos Aires, April 1994.
- Alvan G, Orme M, Bertilsson L, Ekstrand R, Palmer L. Pharmacokinetic of indomethacin. *Clin Pharmacol Ther* 1975; 18: 364-73.
- Franchi AM, Chaud M, Rettori V, Suburo A, Mc Cann S, Gimeno MAF. Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1994; 91: 539-43.
- Redfern JS, Lee E, Feldman M. Effect of indomethacin on gastric mucosal prostaglandins in humans correlation with mucosal damage. *Gastroenterology* 1987; 92: 969-77.

10. Craven PA, De Roberti FR. Patterns of prostaglandin synthesis and degradation in isolated superficial and proliferative colonic epithelial cells compared to residual colon. *Prostaglandins* 1983; 26: 583-604.
11. 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>2α</sub>; intravenous oral and intrayeyunal administration. *Gastroenterology* 1976; 70: 359-70.
12. Whittle BJ, Oren-Wolman N, Guth PH. Gastric vasoconstrictor action of leukotriene C<sub>4</sub>, PGF<sub>2α</sub> and thromboxane mimetic U-46619 on rat submucosal microcirculation in vivo. *Am J Physiol* 1985; 248: G580-6.
13. Dixon RAF, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, et al. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* 1990; 343: 282-4.
14. Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmigan P, Soyoola E, Wilson CB, Hwang D. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys* 1993; 307: 361-8.
15. Franchi AM, Di Girolamo G, de los Santos AR, Marí ML, Gimeno MAF. Effects of Lysine clonixinate on cyclooxygenase I and II in rat lung and stomach preparations. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. (in press, 1998).

-----

No apruebo que se realice un acto de homenaje por cumplir 80 años u otra edad. La obra humana debe ser ininterrumpida durante toda la vida, hasta que la detenga la muerte. Cada hombre debe trabajar continuamente para sí y para sus semejantes, mientras que lo permitan su salud física y mental. Cambiará en parte sus tareas cuando lo aconseje la edad, pues no debe bloquear los puestos y promoverá la llegada continua de hombres más jóvenes y de nuevas ideas de progreso. No considero un ideal humano aconsejable el querer jubilarse para ser inactivo, lo que daña el cuerpo y el alma y a la sociedad. Siempre he creído que un fisiólogo auténtico debe experimentar, pensar, leer e intercambiar ideas todos los días sin excluir ninguno de ellos. Trabajar en algo que interesa o apasiona es un placer, es una de las felicidades humanas más grandes.

Bernardo A. Houssay (1887-1971)

*Discurso en el homenaje al 80° aniversario de su nacimiento. En: Escritos y Discursos de Bernardo Houssay. A. Barrios Medina, A. Paladini (compiladores), Buenos Aires: Eudeba, 1989, p 595*