/MEDICINA/- Volumen 60 - Nº 5/1, 2000

*MEDICINA (Buenos Aires) 2000; 60:**580-586*

/ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS Y VESICULA BILIAR/

ACCION DIFERENCIAL DE LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS SOBRE LA CICLOOXIGENASA Y LIPOOXIGENASA DE VESICULA BILIAR HUMANA

ANA FRANCHI1, GUILLERMO DI GIROLAMO2, MARIANA FARINA1,ANTONIO R. DE LOS SANTOS, MANUEL L. MARTI3, MARTHA A.F. GIMENO1

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO); 2 Segunda Cátedra de Farmacología y Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Key words: *: *lysine clonixinate, lipoxygenase, cyclooxygenase, gallbladder

Resumen

El clonixinato de lisina (CL) es un antiinflamatorio no esteroide (AINE) con pocos efectos adversos,por lo que se ha postulado que a concentraciones equivalentes a las encontradas en plasma humano después de dosis terapéuticas inhibiría en escaso grado la ciclooxigenasa I (COX-I). Se efectuaron 3 experimentos. Experimento 1: se estudió el efecto /in vitro/ de CL en concentraciones de 4 y 6 µg/ml, las que se corresponden con las alcanzadas en plasma con una dosis oral de 125 mg. Los segmentos de vesícula biliar (n = 6) se incubaron con 0.25 µCi de

ácido araquidónico 14C y se midió la producción de prostaglandina E2, prostaglandina F2a y prostaglandina 6 ceto F1a. El CL no modificó la producción basal de ninguna de las tres prostaglandinas pero con 6 µg/ml disminuyó significativamente la producción de ácido 5-hidroxieicosatetraenoico (5-HETE). Experimento 2: se administró una infusión continua de CL a 6 pacientes en el pre operatorio inmediato para lograr una concentración en estado estacionario entre 4 y 6 µg/ml. Se incubaron segmentos de vesícula biliar de estos 6 pacientes y de 6 pacientes control no tratados con ácido araquidónico 14C. Se observó que los segmentos de vesícula biliar tratados con CL no mostraron inhibición de la producción de ninguna de las tres PGs, mientras que el 5-HETE liberado al medio fue significativamente menor. Experimento 3: 18 pacientes recibieron bolos EV de: CL 100 mg (n1 = 6); CL 200 mg (n2 = 6) o indometacina (INDO) 50 mg (n3 = 6). Con ninguna de las dos dosis de CL se obtuvo inhibición de la síntesis de PGs, por el contrario el bolo de INDO inhibió su síntesis. Cuando se valoró la producción de 5-HETE, los dos AINES estudiados se comportaron en forma distinta. El tratamiento con INDO no modificó el 5-HETE producido, mientras que el tratamiento con CL lo inhibió significativamente. En los tres tipos de estudios realizados /in vitro /e /in vivo/: infusión continua y bolo IV, el CL no inhibió la síntesis de PGs y disminuyó significativamente el 5-HETE.

***Abstract ***

*AbstractDifferent effects of non-steroidal antiinflammatory drugs on human gallbladder cyclooxygenase and lipoxygenase. *Lysine clonixinate (LC) is a non-steroidal antiinflammatory agent (NSAID) with only few

adverse effects. This characteristic has prompted us to suggest that its administration, at levels equivalent to those found in human plasma following therapeutic doses, slightly inhibitis cyclooxygenase I (COX I). Three experiments were performed. Experiment 1: to study the in vitro effect of LC at concentrations of 4 and 6 µg/ml, comparable with those found in plasma following an oral therapeutic dose of 125 mg. Gallbladder tissue segments were incubated with 0.25 µCi of 14C-arachidonic acid and the production of prostaglandin E2 (PGE2), prostaglandin F2a (PGF2a) and 6-keto prostaglandin F1a (6-keto PGF1a) was measured. LC did not affect basal production of any of the 3 prostaglandins (PGs) but at 6 µg/ml slightly reduced the levels of 5-hidroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE). Experiment 2: LC was administered preoperatively to 6 patients by continuous perfusion, to achieve a steady-state concentration between 4 and 6 µg/ml. Gallbladder segments from the 6 treated and another 6 control patients were incubated in 14C-arachidonic acid. Gallbladder segments treated with LC did not show a decreased production of any of the three PGs whereas 5-HETE released to the medium was significantly lower. Experiment 3: 18 patients received an IV bolus of LC 100 mg (n1 = 6) or LC 200 mg (n2 = 6) or indomethacin (INDO) 50 mg (n3 = 6). Unlike the administration of INDO bolus, LC in the above doses did not inhibit PG synthesis. Both NSAIDs showed different effects when the production of 5-HETE synthesis was assessed. Treatment with INDO did not alter the production of 5-HETE while LC elicited significant inhibition. The three studies conducted, namely in vitro and in vivo continuous perfusion and IV bolus, revealed that LC had no effect on prostaglandin synthesis while reducing significantly the levels of 5-HETE.

El papel de las prostaglandinas (PGs) en la fisiopatología de la colecistitis y colelitiasis ha sido estudiado en una variedad de especies1-3. En estudios experimentales se ha demostrado que las prostaglandinas aumentan el flujo biliar y la producción de mucina por parte de la vesícula biliar y favorecen la absorción intraluminal de fluido promoviendo la formación de cálculos4-6. Pocos estudios se han realizado sobre la acción de los inhibidores de síntesis de prostaglandinas. Los resultados muestran que drogas como la aspirina y otros antiinflamatorios no esteroides (AINES) podrían prevenir la formación de cálculos y aliviar el dolor7-10.

El clonixinato de lisina (CL) es un AINE con efecto analgésico y antiinflamatorio que ha probado tener excelente tolerabilidad y baja incidencia de efectos adversos11, 12.

Es conocido que los AINES ejercen la mayor parte de sus efectos farmacológicos y adversos por inhibir la ciclooxigenasa (COX), enzima involucrada en la síntesis de PGs a partir del ácido araquidónico. Actualmente se han descripto dos formas de COX13, la denominada constitutiva o COX-1 y la forma inducible o COX-2, que se expresa después de la estimulación con lipopolisacárido (LPS), citocinas y agentes mitógenos entre otros14. La COX-1 es la enzima encontrada principalmente en tejidos sanos desempeñando roles fisiológicos en la agregación plaquetaria, hemostasia, citoprotección del tracto gastrointestinal y en la función renal. Las prostaglandinas del aparato digestivo se sintetizan principalmente con intervención de la COX-1.

Estas PGs cumplen un papel citoprotector de la mucosa gástrica, estimulando la secreción de mucus e inhibiendo la secreción ácida15. Por esta razón es tan importante encontrar AINES que no inhiban a dosis terapéuticas la COX-1. Por otro lado cuando se inhibe la COX, se puede producir un aumento en los productos de la 5-lipooxigenasa, enzima que sintetiza el ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HEPTE), ácido 5-hidroxieicosatetraenoico (5-HETE) y leucotrienos (LTs) debido al exceso de ácido araquidónico que queda disponible al inhibir la COX. Es de interés recordar que se han descripto a los leucotrienos como mediadores de la úlcera gástrica16.

En trabajos previos hemos observado que en segmentos colónicos humanos estudiados /in vitro,/ el CL en concentraciones de 4 y 6 µg/ml no modificó la prostaglandina E2 (PGE2) producida por tejidos no tratados, pero produjo una profunda inhibición en la producción de 5-HETE. Por el contrario, la indometacina (INDO) en una concentración de 0.035 µg/ml inhibió la síntesis de prostaglandinas y no modificó los valores de 5-HETE17.

De esta manera demostramos que el CL inhibe preferentemente la 5-lipooxigenasa, mientras que la INDO, inhibe preferentemente la COX.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar si el CL y la INDO se comportaban en las vesículas biliares humanas aisladas de igual manera que en el colon humano.

Para ello se estudió el efecto del CL en la síntesis de PGs y producción

de 5-HETE en los distintos grupos experimentales realizados en segmentos de vesículas biliares humanas aisladas.

Materiales y métodos

Se utilizaron 36 vesículas biliares obtenidas de pacientes sometidos a cirugía laparoscópica con diagnóstico ecográfico de litiasis vesicular que dieron su consentimiento por escrito para recibir una dosis analgésica por vía endovenosa de clonixinato de lisina (Dorixinaâ) durante el acto quirúrgico y para que el tejido fuera utilizado en este estudio.

Fueron excluidos aquellos que presentaron un cuadro de colecistitis aguda, litiasis que comprometió otro segmento de la vía biliar o neoplasia y aquellos que hubieran recibido en las 12 horas previas, cualquier medicación con acciones conocidas sobre el músculo liso (anticolinérgicos, bloqueantes alfa, agonistas y antagonista b, nitritos, bloqueantes cálcicos, opiáceos, antiarrítmicos y alcaloides del ergot).

El diazepam fue utilizado como premedicación, mientras que los fármacos administrados durante la anestesia fueron: fentanilo, propofol, vencuronio, óxido nitroso y procaína.

Las vesículas biliares fueron trasladadas desde el quirófano hasta el laboratorio en solución de Krebs a 4 °C dentro de las 2 horas de su extracción, para su procesamiento.

Todas las piezas obtenidas fueron inspeccionadas macroscópicamente tomándose muestras para su estudio histopatológico de rutina. El porcentaje de tejido conectivo fue evaluado mediante un retículo de Weibel tipo A /multipurpose test system/18.

a) /Experimentos/ in vitro

Las vesículas biliares de 6 pacientes se cortaron en 3 segmentos de 1 x 3 cm (peso aproximado 300 mg) y se preincubaron durante 30 min. en un incubador Dubnoff en 2 ml de Solución Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) conteniendo 11.0 mM de glucosa, pH 7.4 y bajo una atmósfera de 95% O_2 y 5% CO_2. La composición de la Solución Krebs Ringer Bicarbonato fue la siguiente: Na^+: 145 mM; K^+: 6 mM, Ca^{+2}: 2 mM; Mg^{+2}: 1.33 mM; CL^-: 126 mM; HCO_3^-: 25.3 mM; $SO_4^=$: 1.33 mM; PO_4^{-2}: 1.20 mM; Glucosa: 11 mM. En el grupo tratado se adicionó CL al medio de incubación obteniéndose una concentración final de 4 y 6 µg/ml. Terminado el período de preincubación se agregaron a cada preparado 0.25 µCi de ácido araquidónico 14C y se incubaron por 60 minutos. Al finalizar el período de incubación se removió el tejido y el medio se utilizó para medir PGs y 5-HETE.

b) /Experimentos/ in vivo

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 6 pacientes un bolo EV de 40 mg de CL seguido de una

infusión de 70 mg/h. Como control se obtuvieron 6 vesículas biliares de pacientes colecistectomizados sin tratamiento.

La colecistectomía se realizó a los 30 minutos de iniciado el goteo. Los tejidos se incubaron con 0.25 µCi de ácido araquidónico 14C durante 60 minutos. Al finalizar el período de incubación se removió el tejido y en el medio se midieron PGs y el 5-HETE.

2. Administración del CL e INDO en bolo: Al inicio de la intervención se administraron, a 18 pacientes según sorteo al azar, (6 por grupo de tratamiento), un bolo EV de CL 100 mg y CL 200 mg o INDO 50 mg. Las vesículas biliares se extrajeron a los 30 minutos de aplicado el bolo. Luego de disecadas y lavadas se incubaron los segmentos con ácido araquidónico 14C como se indica en el punto 1), midiéndose las PGs y el 5-HETE en el líquido de incubación.

Medición de eicosanoides

Para medir el 5-HETE, los productos de la lipooxigenasa se extrajeron 3 veces con 2 ml de acetato de etilo 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. 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 líquido. Después de la extracción de los productos de la lipooxigenasa el medio de incubación remanente se acidificó a pH 3.0 con ClH 1.0 mM en 1 volumen de acetato de etilo extrayéndose 2 veces para la medición de PGs según se describe en un trabajo previo19.

Medición de las concentraciones plasmáticas de CL

a) Construcción de la curva concentración-tiempo luego de un bolo endovenoso de 100 mg de CL: Se administraron CL 100 mg por vía IV a 15 voluntarios sanos de sexo masculino y se extrajeron muestras de sangre en los siguientes tiempos: 0, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos.

La determinación de las concentraciones en cada tiempo se realizó según se describe en el punto b).

b) Determinación de las concentraciones plasmáticas de CL en pacientes colecistectomizados: Luego de transcurridos 30 minutos de administrado el bolo o de iniciada la infusión de CL y simultáneamente con colecistectomía 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_2PO_4 50 mM, pH 4.48) con un flujo de 0.8 ml/min.

/Medición de las proteínas por /Western Blot

Las vesículas biliares fueron homogeneizadas por sonicación en un buffer Tris 20 mM (pH = 7.4) conteniendo inhibidores de proteasas y centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos. Las proteínas fueron separadas electroforéticamente en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE según el método de Laemmli20. Las proteínas fraccionadas (50 µg/calle) fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en TTBS 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 (buffer triofosfato tween), 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 y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato nitrobene tetrazolium) bajo condiciones alcalinas por media hora.

Drogas

El ácido araquidónico 14C 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 y el Clonixinato de lisina

(Dorixinaâ) es marca registrada de Roemmers (Argentina).

Los anticuerpos anti-COX-1 y anti-COX-2 son de Santa cruz Biotechnology, Inc., el segundo anticuerpo es de Sigma Chemical Company. El resto de los reactivos de Western Blot son de Sigma Chemical Company.

Estadística

Todos los valores presentados representan la media ± ES. Las comparaciones entre los grupos se realizaron empleando la prueba de comparaciones múltiples Student Newman Keuls y las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue igual o menor del 5%.

Resultados

/Efecto /in vitro /del CL en la síntesis de PGs y 5-HETE/

Las preparaciones de vesículas biliares humanas correspondientes a 6 pacientes fueron incubadas con ácido araquidónico 14C. Estas sintetizaron principalmente PGE2, PGF2a y PGI2 (valorada por la producción de 6-ceto PGF1a). La síntesis de PGE2 y PGF2a fueron de igual magnitud siendo significativamente menor ($p < 0.01$) la de PGI2. El CL en concentraciones de 4 y 6 µg/ml no modificó la producción basal de ninguna de las tres PGs (Fig. 1-a).

La Fig. 1-b muestra claramente la disminución del 5-HETE con CL. Los valores obtenidos con 4 µg/ml no fueron significativamente distintos de

los del control, pero con 6 µg/ml hubo una disminución significativa ($p < 0.01$).

Efectoin vivo con infusión continua de CL en la síntesis de PGs y 5-HETE

Se estudiaron las vesículas de 6 pacientes tratados con infusión continua de CL y las provenientes de 6 pacientes control no tratados. Los valores plasmáticos de CL obtenidos simultáneamente con la colecistectomía, oscilaron entre 3.6 y 7.1 µg/ml con un valor medio de 5.7 ± 1.1 µg/ml.

Las preparaciones se incubaron con ácido araqui-dónico 14C obteniéndose en el líquido de incubación cantidades equivalentes de PGE2 y PGF2a. Al igual que en la preparación de la Fig. 1-a la PGI2 sintetizada fue menor. El tratamiento con infusión de CL no inhibió la producción de ninguna de las PGs medidas (Fig. 2-a).

Por el contrario, el 5-HETE sintetizado y liberado al medio por las vesículas fue significativamente menor ($p < 0.001$) en los pacientes tratados (Fig. 2-b).

Efecto in vivo del CL e INDO inyectada en bolo, sobre la síntesis de PGs y 5-HETE

En la Fig. 3-a se observa el efecto de un bolo EV de CL 100 mg (6 pacientes) y de 200 mg (6 pacientes) sobre la síntesis de PGs vesiculares.

Nuevamente observamos que con ninguna de las dos dosis se obtuvo inhibición en la síntesis de PGs (Fig. 3-a). La Fig. 4 corresponde a la curva obtenida en 15 voluntarios sanos inyectados con un bolo de CL 100 mg de acuerdo a la técnica descripta en Métodos. Como podemos observar, a los 30 minutos después de la inyección del bolo, que fue cuando se extirparon las vesículas biliares, las concentraciones plasmáticas obtenidas fueron menores de 10 µg/ml.

Por el contrario el bolo de INDO de 50 mg (6 pacientes) inhibió significativamente ($p < 0.001$) la síntesis de PGI2, PGE2 y PGF2a (Fig. 3-a).

Cuando se valoró la producción de 5-HETE, los 2 AINES estudiados se comportaron en forma distinta. La Fig. 3-b muestra que el tratamiento con INDO no modificó el 5-HETE producido, mientras que el tratamiento con CL (200 mg) lo inhibió significativamente ($p < 0.05$).

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 las vesículas estudiadas.

Como se observa en la Fig. 5A y 5B, la enzima, la enzima COX-1 se encuentra presente en la vesícula humana, mientras que la isoforma COX-2 se encuentra ausente en estos tejidos. En la Fig. 6 se puede observar la densidad de las bandas de las dos isoformas de un promedio de seis vesículas medidas por el programa Sigma Gel. En la misma observamos que la isoforma COX-1 se encuentra expresada entre seis y siete veces más

que la isoforma inducible, y además que los valores para esta última se consideran dentro del error del método, es decir que esto indicaría que en nuestras condiciones experimentales la isoforma COX-2 está ausente.

Discusión

Se ha descripto que las vesículas biliares de distintas especies sintetizan PGs3, 21, 22. Por otro lado se ha demostrado que microsomas de vesículas humanas normales incubados con ácido araquidónico 14C, producen PGs después de 30 minutos de incubación. Cuando los microsomas son obtenidos de vesículas con colecistitis, los valores obtenidos son 2 a 3 veces mayores y domina la producción de PGE2 y PGI26. En el presente estudio se encontró que segmentos de vesículas humanas producen después de incubarlas con ácido araquidónico 14C, PGE2, PGF2a y PGI2, esta última en una concentración menor.

En un trabajo previo hemos encontrado que el CL en concentraciones de 4 y 6 µg/ml, que son las concentraciones usualmente halladas en el plasma de pacientes tratados por una dosis oral de 125 mg, no inhiben la producción basal de PGs en estómago o pulmón de animales controles. Concentraciones de 10 µg/ml de CL o INDO inhiben la producción basal de PGs, probablemente producida por actividad de la COX-119. La indometacina ha sido utilizada como droga control que inhibe especialmente la COX-1 aunque también lo hace con COX-223. En ratas tratadas con LPS se ha detectado un aumento en la expresión de COX-2 en el estómago y en el pulmón24. En el trabajo comentado en párrafos anteriores nosotros observamos que 4 y 6 µg/ml de CL lleva la producción

de PGs a valores basales después del aumento observado con el tratamiento con LPS, lo que indicaría que en estas concentraciones inhibe las PGs sintetizadas por COX-2.

En el presente estudio en vesículas biliares humanas, concentraciones de 4 y 6 µg/ml de CL, en estudios /in vitro/, tampoco modificaron la producción basal de PGs, lo que indicaría que en estos pacientes, donde no hay señales de colecistitis, las vesículas tienen preferentemente COX-1. Este hecho se corrobora con los estudios de /Western Blot /donde no se observa la expresión de la isoforma COX-2.

En otro trabajo publicado recientemente17 y realizado en segmentos sanos de colon humano hemos estudiado el efecto /in vitro/ de CL de 4 y 6 µg/ml e INDO 0.03 y 0.3 µg/ml sobre la producción de PGE2 liberada al medio de incubación. Los resultados mostraron claramente que el CL en ninguna de las 2 concentraciones usadas inhibió la síntesis de PGE2 a diferencia de la INDO, que lo hizo a concentraciones baja y alta. Por el contrario el CL a 4 y 6 µg/ml inhibe claramente la producción de 5-HETE, mostrando así una mayor acción inhibidora sobre la lipooxigenasa que sobre la ciclooxigenasa. El efecto opuesto se observó con INDO, que a dosis baja no modificó la lipooxigenasa e inhibió más de un 50% la actividad de la ciclooxigenasa.

En vesículas biliares humanas los resultados obtenidos son coincidentes con los de colon humano. Esto es, el CL /in vitro/ inhibe significativamente la síntesis de 5-HETE a una concentración que no modifica los productos de la ciclooxigenasa. Es conocido que los

resultados /in vitro/ con los AINES deben tomarse con cuidado dado que la unión a proteínas es muy alta y esto puede modificar la cantidad de droga libre que tiene acceso al receptor. Los estudios que utilizan soluciones libres de proteínas para nutrir los tejidos, suelen dar valores de IC50 mucho más bajos que los encontrados en estudios /in vivo /25. Por esta razón decidimos estudiar la actividad de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa de vesículas biliares en estudios /in vivo/.

En un primer grupo se realizó una infusión continua de CL ajustando un ritmo de infusión que garantizara concentraciones plasmáticas entre 4 y 6 µg/ml. En estas condiciones el CL tampoco inhibió la síntesis de PGs y sí disminuyó significativamente la producción de 5-HETE.

A los efectos de determinar la curva de concentración plasmática tiempo de CL se administraron a 15 voluntarios sanos 100 mg de la droga en bolo.

Como puede verse en la Fig. 4, después de 30 minutos de aplicado el bolo, las concentraciones plasmáticas resultan menores de 10 µg/ml.

Basados en este parámetro farmacocinético se estudió el efecto de CL inyectado en bolo en dosis de 100 y 200 mg y se lo comparó con la acción de INDO, en un bolo de 50 mg, (dosis terapéuticas de ambas drogas). Nuevamente el CL no inhibió síntesis de PGs y disminuyó significativamente la producción de 5-HETE.

También observamos que la INDO se comporta de manera opuesta, esto es, inhibiendo la actividad de la ciclooxigenasa y no modificando la

actividad de la lipooxigenasa.

En los modelos /in vivo/ (infusión y bolo) las concentraciones plasmáticas del CL al momento de la coleciste ctomía fueron menores de 10 µg/ml. Probablemente los efectos antiinflamatorios del CL, en dosis baja se deban a la disminución de la actividad de la lipooxigenasa y consecuentemente de los leucotrienos, y el efecto analgésico a acciones centrales relacionadas con la liberación de endorfinas26, 27.

Bibliografía

1. Myers SI, Haley-Russell D, Bartula L, Nabzdyk W. Long-term cholesterol feeding stimulates increased bile phospholipids and gallbladder prostanoid synthesis. /Surgery/ 1991; 109: 656-62.

2. Myers SI, Haley-Russell S, Bartula L, Nabzdyk W. Common bile ligation in the rabbit: an appropriate model for investigating the relationship of endogenous gallbladder prostanoid synthesis with evolving acute inflammation. /Prostaglandins/ 1990; 40: 165-85.

3. Hidaka T, Nakano M, Shingu M, Sugiyama M, Inokuchi T, Ogura R. Stimulation of prostaglandin synthesis by cholecystokinin in primary culture cells of bovine gallbladder muscle. /Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids/ 1989; 38: 113-7.

4. German D, Barcia J, Brems J, Merenda G, Kaminski DL. Effect of bradykinin on feline gallbladder water transport and prostanoid

formation./Dig Dis Sci/ 1989; 34: 1770-6.

5. Kaminski DL, Deshpanda YG, Thomas LA. The role of prostaglandins E and F in a calculous gallbladder disease. /Hepatogastroenterology/ 1987; 34: 70-3.

6. Myers SI, Bartula L. Human cholecystitis is associated with increased gallbladder prostaglandin I2 and prostaglandin E2 synthesis. /Hepatology/ 1992; 16: 1176-9.

7. Babb RR. Managing gallbladder disease with prostaglandin inhibitors. /Prostgrad Med/ 1993; 94: 127-30.

8. Sterling RK, Shiffman ML, Sugerman HJ, Moore EW. Effect of NSAIDs on gallbladder bile composition. /Dig Dis Sci/ 1995; 40: 2220-26.

9. Minocha A, Greenbaum DS, Gardiner J. Effect of non-steroidal antiinflammatory drugs on formation of gallbladder stones. Vet /Hum Toxicol/ 1994; 36: 514-6.

10. Wilson YG, Rhodes M, Ahmed R, Daugherty M, Cawthorn SJ, Armstrong CP. Intramuscular diclofenac sodium for postoperative analgesic after laparoscopic cholecystec-tomy: a randomised, controlled trial. /Surg Laparosc Endosc/ 1994; 4: 340-4.

11. Cayetti LM, de los Santos AR, Martí ML, Di Girolamo G, Niselman V. Lysine clonixinate versus aspirin in the treat-ment of gonarthrosis.

/Curr Ther Res/ 1995; 56: 894-905.

12. Bidlingmaier A, Hammermaier A, Nagyiványi P, Pabst G, Waitzinger J. Gastrointestinal blood loss induced by three different non-steroidal anti-inflammatory drugs. /Azneim Forsch Drug Res/ 1995; 45: 491-3.

13. Feng L, Sun W, Xia Y, et al. Cloning two isoforms of rat cyclooxigenase: differential regulations of their expression. /Arch Biochem Biophys/ 1993; 307: 361-8.

14. Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase 2 and its regulation in inflammation mediators. /Inflammation/ 1996, 5: 305-23.

15. Wallace JL. The 1994 Merck Frost Award. Mechanisms of nonsteroidal antiinflammatory (NSAID) induced gastroin-testinal damage, potential for development of gastroin-testinal tract safe NASAIDS. /Can J Pharmacol/ 1994; 72: 1493-8.

16. Whittle BJ, Oren-Wolman N, Guth PH. Gastric vasoconstrictor action of leukotriene C4, PGF2a and thramboscane mimetic U-46619 on rat submucosal microcirculation /in vivo/. /Am J Physiol/ 1985; 248: 580-6.

17. 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.

18. Weibel ER. Practical methods for biological Morphology. Stereological Methods. London: Academic Press, 1979, p 145.

19. Franchi AM, Di Girolamo G, de los Santos AR, Martí ML, Gimeno MAF. Effects of lysine clonixinate on cyclooxy-genase I and II in rat lung and stomach preparations. /Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids/ 1998; 58: 421-4.

20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. /Nature/ 1970; 227: 680-5.

21. England DW, Jaffe BM, Webb H, Hoover EL. Synthesis of prostaglandins I2 and E2 by the canine gallbladder in vitro: studies using a new incubation chamber. /Br J Surg /1990; 77: 173-8.

22. Myers SI, Bartula L. Sex differences in gallbladder pros-taglandin synthesis mediated by acute inflammation. /Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids/ 1990; 41: 259-64.

23. Kawai S. Cyclooxygenase selectively and the risk of gastrointestinal complications of various non-steroidal antiinflammatory drugs a clinical consideration. /Inflam Res /1998; 47: 5102-6.

24. Goppelt-Strube M. Regulation of prostaglandin endope- roxide synthase (cyclooxygenase) isozyme expression. /Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids/ 1995; 52: 213-22.

25. 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. /Inflammation Res/ 1995; 44: 253-7.

26. Ortí E. Radiopharmacology and mechanism of action of lysine clonixinate. A study on the interaction of non steroidal analgesics with opiate receptors in the central nervous system. 1st International Conference on pain. Buenos Aires, April 1994.

27. Rubio MC. Pharmacokinetic of lysine clonixinate. 1st International Conference on pain. Buenos Aires, April 1994.

Fig. 2.– Efecto de una infusión continua de clonixinato de lisina /in vivo/ sobre la síntesis de PGs (2.a) y 5-HETE (2.b). % CPM/100 mg p.h. = porcentaje de cuentas por minuto por 100 mg de peso húmedo. 6 ceto PGF1a = 6 ceto prostaglandina F1a. PGE2 = prostaglandina E2. PGF2a = prostaglandina F2a. LC = clonixinato de lisina. 5-HETE = ácido 5-hidroxieicosatetraenoico

Fig. 1.– Efecto del clonixinato de lisina /in vitro/ sobre la síntesis de PGs (1.a) y 5-HETE (1.b). % CPM/100 mg p.h. = porcentaje de cuentas por minuto por 100 mg de peso húmedo. 6 ceto PGF1a = 6 ceto prostaglandina F1a. PGE2 = prostaglandina E2. PGF2a = prostaglandina F2a. LC = clonixinato de lisina. 5-HETE = ácido 5-hidroxieico-satetraenoico

Fig. 3.– Efecto de un bolo de indometacina y clonixinato de lisina /in vivo/ sobre la síntesis de PGs (3.a) y 5-HETE (3.b). % CPM/100 mg p.h. = porcentaje de cuentas por minuto por 100 mg de peso húmedo. 6 ceto PGF1a = 6 ceto prostaglandina F1a. PGE2 = prostaglandina E2. PGF2a = prostaglandina F2a. LC = clonixinato de lisina. 5-HETE = ácido 5-hidroxieicosatetraenoico

Fig. 4.– Curva concentración plasmática - tiempo después de una dosis endovenosa de 100 mg de clonixinato de lisina en 15 voluntarios sanos. CL = clonixinato de lisina

Fig. 5.– /Western blotting/ para isoformas de COX en vesícula biliar humana. 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.

Fig. 6.– Densidad de las bandas correspondientes a homogenatos de vesículas, 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 (Bio Rad).

Recibido: 7-IX-1999

Aceptado: 2-VI-2000

*Dirección postal:*Dra. Martha F. Gimeno, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CEFYBO, Serrano 669, 1414 Buenos Aires, Argentina

Fax: (54-11) 4856-2751