

Departamento de Bioquímica. Facultad de Farmacia
Universidad de Navarra
Pamplona

Acción de un andrógeno (17 α -metil, 17 β -hidroxiandrosta-1,4-dien 3-ona) sobre la agregación plaquetar

por

R. Villanueva * y J. Aznar

(Recibido para publicar el 23 de junio de 1968)

Entre los factores desencadenantes de la trombosis sin duda alguna las plaquetas juegan un papel fundamental (3). De acuerdo con esto, es sabido cómo en los enfermos aterosclerosos es frecuente observar una notable hiperfunción trombocitaria (10). Pero no solamente dicha acción es detectable al establecer el diagnóstico de tendencia a la trombosis, sino que después de largos períodos de terapéutica anticoagulante, durante los cuales se han alcanzado niveles de hipocoagulabilidad eficaces, se mantiene la hiperagregación trombocitaria (1). Es decir que el peligro de trombosis plaquetar persiste a pesar del tratamiento anticoagulante. Por ello tiene gran interés combatir esta hiperactividad plaquetar, sobre todo sabiendo que durante los tratamientos anticoagulantes orales permanece inmodificada. De aquí la necesidad de buscar nuevas vías terapéuticas que permitan combatir, o por lo menos paliar, la excesiva capacidad de agregación que las plaquetas presentan en la mayoría de estos enfermos.

No hace mucho tiempo DUFALT y col. (5) indicaron que tras la administra-

ción intramuscular de androsterona, se producía una notable disminución de la adhesividad de las plaquetas, así como un retardo en la formación de agregados plaquetares. Esto mismo había sido hecho notar por MC DONALD (8), aunque este autor utilizaba vía oral para la administración de la droga.

Otro andrógeno, el atromid, también reduce la adhesividad de las plaquetas cuando se administra por vía oral (7, 4, 9, y 6).

Basándonos en los anteriores hechos experimentales, se ha estudiado un derivado androgénico, el 17 α -metil, 17 β -hidroxiandrosta 1,4-dien 3-ona (Dianabol), a fin de comprobar si el mismo muestra alguna acción sobre la capacidad de agregación de las plaquetas.

Material y métodos

Sangre bobina, obtenida con citrato sódico al 19 % según técnica descrita por MUSTARD (10).

* Becaria de Protección Escolar del Ministerio de Educación y Ciencia.

Sangre humana, obtenida con citrato sódico al 19 % (3/100). La toma de muestras se realiza con material de vidrio siliconado (Rhodorsil 240), y con tubos de plástico.

Plasma humano rico en plaquetas (PHRP). Para su obtención se deja la muestra reposar en los tubos de plástico durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo queda un sobrenadante rico en plaquetas, que contiene entre 2×10^5 y 4×10^5 por mm^3 , y casi carente de hemáties y leucocitos. Esta muestra es la que se utiliza para la realización de la prueba.

Plasma humano pobre en plaquetas (PHPP). Se obtiene centrifugando el PHRP durante 10 minutos a 3.000 r.p.m.

Plasma bobino rico en plaquetas (PBRP). Se obtiene centrifugando la sangre bobina a 1.500 r.p.m. durante 20 minutos.

Plasma bobino pobre en plaquetas (PBPP). Se obtiene centrifugando la sangre bobina a 3.000 r.p.m. durante 60 minutos.

Agregación de plaquetas, según técnica descrita por AZNAR (2).

Índice de agregación. Hace referencia al número de plaquetas que se agregan durante la realización de la prueba, expresado en % con respecto al número de plaquetas inicial.

Para su obtención se calcula la diferencia entre la densidad óptica (DO) inicial (tiempo 1 de la curva) y la densidad óptica mínima obtenida, y se expresa esta diferencia en % con respecto a la DO inicial, siendo ésta valorada como 100 %.

Las disminuciones de la DO, son directamente proporcionales al número de plaquetas agregadas (1, 2), ya que a medida que disminuyen las plaquetas en suspensión, disminuye proporcionalmente la DO, por lo que ambas cifras DO y número de plaquetas, pueden considerarse como sinónimas.

Resultados

VALORACIÓN DE LA TÉCNICA EN SANGRE BOBINA Y HUMANA. Siguiendo la técnica más arriba descrita, se estudiaron 100 plasmas de buey. En cada uno de ellos se valoró la capacidad de agregación de las plaquetas y se encontró (fig. 1) un índice medio de agregación de 50,4 %, siendo la desviación standard de 14,3, por lo que se puede considerar como límites normales los índices de agregación comprendidos entre 22 y 78 %.

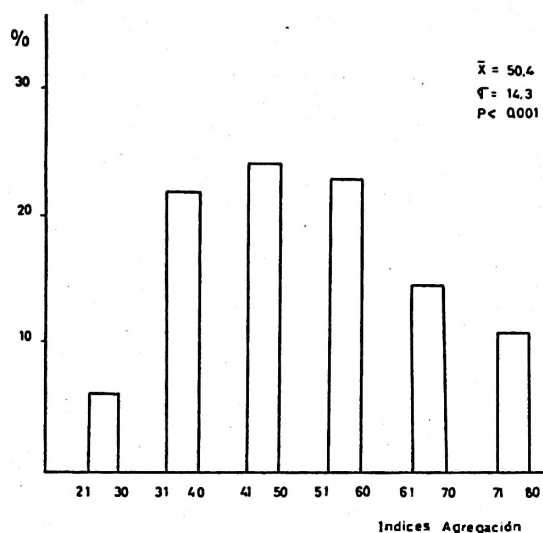


FIG. 1. Índices de agregación obtenidos en 100 plasmas de buey. En ordenadas se expresan los porcentajes. En abscisas los distintos índices de agregación

Siguiendo la misma metodología se estudiaron 75 plasmas humanos normales y se obtuvieron las siguientes constantes (fig. 2); $\bar{x} = 53,8$ $\sigma = 6,5$, límites de normalidad entre 66,8 y 40,8.

ACCIÓN DEL 17 α -METIL, 17 β -HIDROXIAN-DROSTA-1,4-DIEN 3-ONA, SOBRE PLAQUETAS BOBINAS. Se estudian 26 plasmas de buey. Cada uno de ellos se divide en dos lotes, uno que se incuba con 0,1 mg de hormona por ml de plasma, y el otro al que se

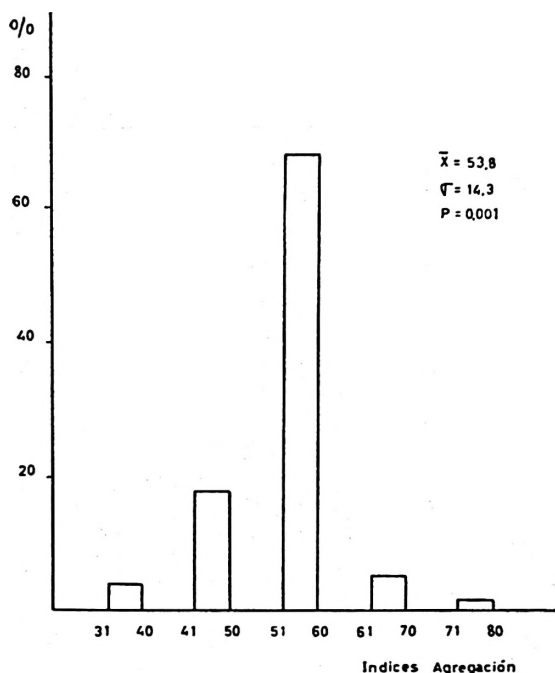


FIG. 2. Índices de agregación obtenidos en 75 plasmas humanos normales. En ordenadas se expresan los porcentajes. En abscisas los índices de agregación

añaden idéntica cantidad de suero fisiológico, siendo los tiempos de incubación de 15 minutos y la temperatura la del medio ambiente. Los resultados se indican en la tabla I. Se obtiene un índice de agre-

gación medio de 51,4 % en los plasmas sin hormona, y de 34,9 % en los que han sido incubados con ella, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$).

Visto desde otro ángulo, si se considera la agregación media como 100 % se encuentra que la disminución de la agregación ocasionada por la hormona es de 32,8 por ciento.

Asimismo se realizaron otro grupo de experiencias con 13 plasmas bobinos diferentes, en los que la concentración de hormonas empleada fue de 0,05 mg por mililitro de plasma, siendo el tiempo y temperaturas de incubación análogos a los de la experiencia anterior. Se observa (tabla I) que también disminuyen los índices de agregación desde 60,8 % que presenta el plasma sin hormonas, hasta un 49,3 % del plasma con hormona, lo que indica que tras la incubación se ha conseguido una disminución de la agregación de un 18,1 %, la cual es significativa ($P < 0,04$), aunque menor que la obtenida con 0,1 mg/ml. Las anteriores experiencias sugieren cierta relación entre la cantidad de hormona utilizada y la disminución de la agregación obtenida.

ACCIÓN DE LA HORMONA SOBRE LA DO EN PLASMA BOBINO RICO EN PLAQUETAS. Al añadir la hormona a un PBRP se observa una notable disminución de la DO

TABLA I

Resultados medios obtenidos en el estudio de la agregación plaquetaria sobre plasma bobino normal y previa incubación con 17 α -metil, 17 β -hidroxiandrosta-1,4-dien 3-ona (Diabanol) a diferentes concentraciones

Número de experimentos	I.A. $\bar{x}$	Dianabol mg	σ	P	Disminución % I.A.
26	51,4	—	12,02	$<0,01$	32,8
26	34,9	0,1	11,2	$<0,01$	
13	60,8	—	8,3	$<0,04$	18,1
13	49,3	0,05	15,6	$<0,04$	

TABLA II

Disminución de la densidad óptica en el tiempo 1 (antes de comenzar la agitación) como consecuencia de la adición de 17 α -metil, 17 β -hidroandrosta-1,4-dien 3-ona (Diabanol)

Número de experimentos	DOT-1 $\bar{x}$	Diabanol mg	σ	p	Disminución % I.A.
50	101,68	—	40,5	<0,01	20,5
50	81,11	0,1	34,8	<0,01	

en el tiempo 1, es decir, antes de iniciar la agitación (tabla II), ya que sin hormona se obtiene una DO media de 101,6, y con la hormona de 81,11 ($P < 0,01$), es decir, que se consigue una reducción de la DO del plasma de un 20,5 %.

ACCIÓN DEL EXCIPIENTE SOBRE LA AGREGACIÓN DE LAS PLAQUETAS BOBINAS. Finalmente, para descartar que el efecto antiagregante pueda ser debido a la acción del excipiente, se realizan un grupo de 25 experiencias, plasma con hormona y plasma normal con excipiente. Se observa que asimismo el excipiente produce una disminución de la agregación de las plaquetas, aunque es menor que la ocasionada por la hormona, siendo esta diferencia totalmente significativa ($P < 0,01$).

ACCIÓN DE LA HORMONA SOBRE LA CAPACIDAD DE AGREGACIÓN DE LAS PLAQUETAS HUMANAS. Se utilizan 50 plasmas normales ricos en plaqueta, divididos en dos lotes, uno que se incubaba con la hormona y otro con un volumen similar de solución salina. La concentración del fármaco es de 0,1 mg/ml de plasma. En el grupo de experiencias sin hormona (tabla III) el índice de agregación medio es de 53,8 %, y en el que se ha utilizado fármaco de 31,4 % ($P < 0,001$). Es decir, tras la incubación del plasma normal con hormonas se ha producido una disminución de la agregación de las plaquetas de un 41,7 %.

ACCIÓN DEL EXCIPIENTE SOBRE LA AGREGACIÓN DE LAS PLAQUETAS HUMANAS. Al igual que se hizo con el plasma bobino rico en plaquetas, para comprobar si este

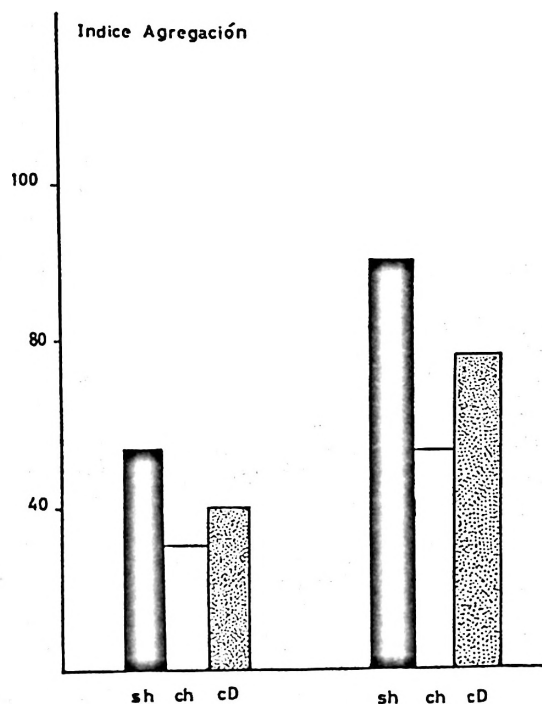


FIG. 3. Índices de agregación obtenidos con 25 plasmas humanos normales, incubados con la hormona (ch), con el excipiente (co), y con solución salina (sh). En abscisas se indican las sustancias con que han sido incubados los plasmas. En ordenadas los índices de agregación medias que han sido obtenidos en cada uno de estos grupos de experiencias

TABLA III

Relación de los índices de agregación plaquetar medios obtenidos con 50 plasmas humanos incubados y sin incubar con 17 α -metil, 17 β -hidroxiandrosta-1,4-dien 3-ona (Diabanol)

Número de experimentos	I.A. $\bar{x}$	Dianabol mg	σ	P	Disminución % I.A.
50	53,8	—	11,2	<0,001	41,7
50	31,4	0,1	15,5	<0,001	

efecto antiagregante puede ser debido al excipiente del fármaco, se realizan experiencias con otro grupo de pacientes. En este lote, cada muestra se divide en tres partes, una que se incuba con hormona, otra con el excipiente y la tercera con solución salina. Se comprueba (fig. 3), que asimismo el excipiente causa una disminución de la agregación de las plaquetas de un 27,5 %, aunque dicho efecto es inferior al conseguido con el excipiente más la hormona, ya que, como en la figura 4 se indica, éste es de un 46 %.

Discusión

Es bien conocido que no siempre las pruebas experimentales realizadas *in vitro* tienen una adecuada traducción *in vivo*. Pero es asimismo indudable que si *in vitro* se obtienen resultados positivos, la posibilidad de obtenerlos *in vivo* es más verosímil.

Del conjunto de pruebas experimentales descritas anteriormente se deduce un claro efecto del 17 α -metil 17 β -hidroxiandrosta-1,4-dien 3-ona sobre las plaquetas, en el sentido de disminuir su capacidad de agregación. También parece existir una cierta proporcionalidad entre la alteración plaquetar conseguida y la dosis del fármaco utilizada, ya que cuando ésta se reduce a la mitad el efecto antiagregante conseguido queda asimismo reducido en una proporción similar. Como

por otro lado la concentración del fármaco, cuando éste se emplea en la proporción de 0,05 mg/ml, es muy parecida a la que se utiliza habitualmente en la clínica humana, en principio no parece existir inconveniente para que dicho efecto pueda también desarrollarse *in vivo* al no requerir dosis tóxicas para conseguir el efecto antiagregante.

En cuanto a la acción mostrada por el excipiente por ser sinérgica con la del fármaco no muestra mayor inconveniente.

Es indudable que el efecto antiagregante 17 α -metil 17 β -hidroxiandrosta-1,4-dien 3-ona, por no tener que ser utilizado a dosis tóxicas para desarrollar su efecto, puede ser de interés en la práctica médica como terapéutica antiagregante en los casos de hiperfunción trombocitaria tan frecuente dentro de los síndromes trombofílicos, aunque este último punto deberá ser comprobado con experiencias similares, pero realizadas *in vivo*.

Resumen

Se ha estudiado *in vitro* la acción antiagregante del 17 α -metil -17 β -hidroxiandrosta-1,4-dien-3-ona. Se demuestra que posee un claro efecto antiagregante de las plaquetas cuando se utiliza a una dosis similar a la que se emplea en clínica humana.

También se valora la técnica de agregación en 75 plasmas normales y se establecen sus límites de normalidad a fin de poder utilizarla en la práctica diaria.

Summary

Action of an Androgen (17 α -methyl, 17 β -hydroxy-androsta-1,4-dien 3-one) on platelet aggregation

Studies undertaken on the platelet aggregation in calf and human normal plasma, have allowed to establish some limities of normality, to which reference can be made.

The Androgen 17- α -methyl-17- β -hydroxy-androsta-1,4-dien 3-one shows *in vitro* an anti-aggregation effect, both on calf and human plasma, which seems to be directly related to the drug concentration.

Bibliografía

1. AZNAR, J.: *Hemostase*, 6, 351, 1966.
2. AZNAR, J., G. FORTEZA-VILA y F. PRIETO: *Med. Esp.*, 57, 111, 1967.
3. BRINKHOUS, C. M., I. S. WRIGHT, J. P. SOULIER, H. R. ROBERTS and S. HINNON. *En Platelets: Their role in hemostasis and Trombosis*. F. K. Schattauer, Stuttgart, 1967.
4. CARSON, P., L. MC DONALD, S. PICKARD, T. PILKINGTON, B. DAVIES and F. LOVE: *J. Atheroscler. Res.*, 3, 619, 1963.
5. DUFAULT, C., G. TREMBLAY, W. NOWACZYNSKI and J. GENEST: *Canad. Med. Assoc. J.*, 85, 1025, 1961.
6. GIBELLI, A., G. FRANDOLLI, P. GIAROLA and P. DENICOLS: *Hemostase*, 6, 285, 1966.
7. GILBERT, J. B. and J. F. MUSTARD: *J. Atheroscler. Res.*, 3, 619, 1963.
8. MC DONALD (citado por M. F. Oliver en *Lancet*), 1, 1321, 1962.
9. MILLAC, P., E. A. CASPARI and J. PRIENEAS: *J. Atheroscler. Res.*, 7, 395, 1967.
10. MUSTARD, J. F., M. A. PACKHAM, H. C. ROWSELL and L. JØRGENSEN: *Thromb. Diath. Haem. Suppl.*, 26, 261, 1967.