

Actividad antiagregante plaquetaria de la furosemida

J. García-Conde,* J. Merino, J. A. Golpe e I. Benet

Departamento de Patología General
Facultad de Medicina
Santiago de Compostela

(Recibido el 22 de julio de 1975)

J. GARCIA-CONDE, J. MERINO, J. A. GOLPE and I. BENET. *Platelet Anti-aggregating Activity of Furosemide*. Rev. esp. Fisiol., 32, 269-274. 1976.

The effect of furosemide on platelet aggregation, factor 3 availability, and response to hypotonic stress has been studied.

Furosemide greatly inhibits platelet aggregation, with ADP, epinephrine, collagen, ristocetin, thrombin and serotonin. The use of heparin as anticoagulant does not alter this effect. Furosemide action is not conducted through calcium chelation

Platelet factor 3 availability is not modified by furosemide. There is a direct correlation between furosemide concentration and inhibition in the second phase of platelet response to hypotonic stress.

The possibility of a disorder furosemide induced on the platelet metabolism, is suggested.

Una de las terapéuticas de más interesante actualidad es aquella que trata de prevenir la aparición de accidentes tromboembólicos mediante fármacos que inhiben la formación del trombo blanco plaquetario (6, 11, 18).

Los primeros hallazgos que relacionan los trastornos de los mecanismos hemostáticos y ciertas drogas corresponden a BOUNAMEAUX (5), quien en 1954 observa que los sujetos que habían ingerido aspirina tenían alterada su hemostasia prima-

ria, responsabilizando a los trombocitos de esas alteraciones; ello condujo a BEAUMONT *et al.* (1) a la utilización de la aspirina en la prevención de las trombosis. Estudios posteriores han perfilado su mecanismo de acción como un inhibidor de *release* (10, 17, 18) y han precisado cómo su efecto se prolonga de cinco a diez días, coincidiendo este tiempo con el de la vida media de las plaquetas (23).

El desarrollo de la terapéutica antiagregante coincide con la aparición de nuevas técnicas (4) que permiten evaluar de forma objetiva las modificaciones que las drogas inducen sobre el funcionalismo plaquetario. Esto ha permitido seleccionar drogas eficaces, ampliar los conocimientos

* Dirección actual: Departamento de Medicina Interna. Facultad de Medicina Centro Médico Nacional «Marqués de Valdecilla». Santander.

sobre sus mecanismos de acción (15) y determinar las dosis que serían útiles en los estudios de aplicación clínica. Se ha demostrado así que numerosas drogas tienen un efecto *in vitro* sobre la agregación plaquetaria, pero son pocas las que conservan este efecto *in vivo* (fenil-butazonas, dipiridamol, aminoquinoleínas) y menos aún las que pueden utilizarse en protocolos prolongados para la profilaxis de la trombosis después de valorar sus efectos secundarios.

Rossi *et al.* (21) han sido los únicos hasta el momento en demostrar la acción de la furosemida (Fs) como inhibidor de la agregación plaquetaria. El presente estudio pretende perfilar el mecanismo de acción de esta droga y concretar algún aspecto nuevo sobre su acción inhibidora en la agregación plaquetaria.

Material y métodos

Se utilizó plasma — extraído con citrato trisódico 0,13 M (1/10), o heparina (50 U/ml) — obtenido de donantes voluntarios sanos, entre 20 y 30 años de edad, que se sabía no habían ingerido, en los siete días previos al estudio, drogas con actividad antiagregante.

Recuento de plaquetas según PIETTE (19). Estudios de agregación según el método de BORN (4), igualándose el número de plaquetas de las muestras a 300.000 mm^3 ; la velocidad del registro fue de 25 mm/min. Los estudios de agregación con ADP (Boehringer, Mannheim), adrenalina, serotonina (ambas de Sigma Chem., St. Louis), ristocetina (Lundbeck, Copenhagen) y trombina bovina (Parke Davis, Detroit, Michigan) se expresan en concentraciones finales en el sistema de agregación. Las diluciones han sido realizadas en suero fisiológico excepto las de furosemida (Hoechst Ibérica, Barcelona) que se han realizado con tampón de Michaelis.

Shock osmótico plaquetario, según técnica de HANDIN (13).

Disponibilidad de factor 3 plaquetario por el método de ZUCKER (24).

Resultados

En nueve casos estudiados, la Fs *in vitro* inhibe de forma inmediata la agregación plaquetaria inducida por ADP a concentraciones superiores a 10^{-7} M final.

Con concentraciones límites de ADP, que dan lugar a una doble onda, o la transición de onda con desagregación a

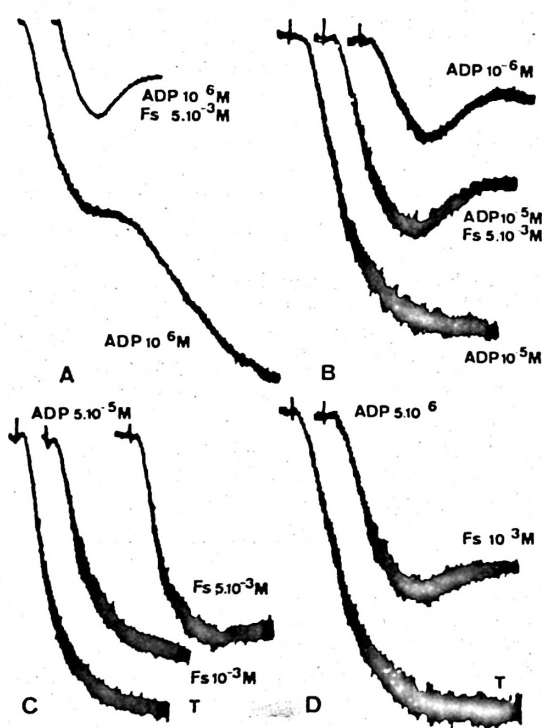


Fig. 1. Efecto de la furosemida sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP.

A. Efecto de la Fs sobre la agregación inducida por ADP al producir doble onda. B. Efecto comparativo entre las ondas de agregación obtenidas con concentraciones diferentes de ADP, con y sin Fs. C. Efecto de diferentes concentraciones de Fs sobre la inducción de agregación de ADP a altas concentraciones. D. Acción de la Fs a mínima concentración inhibidora sobre la agregación inducida por ADP a 5×10^{-6} M.

onda compuesta (ADP entre $2,5 \times 10^{-6}$ a 10^{-6} M), la Fs induce una discreta disminución de la velocidad de la primera onda y una ruptura a nivel de la segunda, es decir, inhibe completamente la liberación plaquetaria llegando incluso a producir desagregación (fig. 1A). Los registros obtenidos con concentraciones superiores de ADP (10^{-5} M) y Fs (5×10^{-3} M) son de morfología similar a los obtenidos utilizando ADP como inductor de agregación a una concentración diez veces inferior (ADP 10^{-6} M) (fig. 1B).

Se ha comprobado que existe una relación inversa entre la concentración de Fs y la intensidad de la agregación plaquetaria inducida por ADP.

A concentraciones elevadas de ADP (5×10^{-5} M) y de Fs, el efecto de ésta es más discreto, insinuándose una ligera desagregación (fig. 1C). Cuando la concentración de ADP utilizada en el sistema es de 5×10^{-6} M la Fs a su concentración efectiva más baja tiene un efecto muy marcado (fig. 1D).

Si se utiliza la adrenalina (10^{-5} M) como inductor de la agregación plaquetaria, la Fs a 5×10^{-3} M inhibe la segunda onda de agregación, es decir, la onda que expresa la reacción de liberación plaquetaria. En algún caso se observa además una discreta disminución de la velocidad de agregación de la primera onda (figura 2A).

La Fs altera igualmente la agregación plaquetaria inducida por el colágeno; los registros demuestran prolongación del tiempo de latencia y disminución de la velocidad de la onda que expresa la liberación. El efecto agregante del colágeno puede quedar totalmente inhibido al elevarse las concentraciones de Fs (5×10^{-3} M) (fig. 2B).

El efecto inductor de la agregación plaquetaria de la ristocetina (1,3 mg/ml) puede quedar totalmente inhibido por la adición previa en el sistema de Fs 5×10^{-3} M (fig. 2C).

La Fs 10^{-3} M disminuye notablemente

el efecto de agregación inducido por la trombina a concentración final de 0,2 U/ml (fig. 2D). Asimismo, a 5×10^{-5} M inhibe la agregación plaquetaria inducida por la serotonina 3×10^{-5} M (fig. 3). Los efectos inhibidores sobre la agregación plaquetaria son independientes del anticoagulante empleado en la obtención de los plasmas, habiéndose registrado resultados similares con citrato sódico y heparina (fig. 4A). Tampoco parecen estar me-

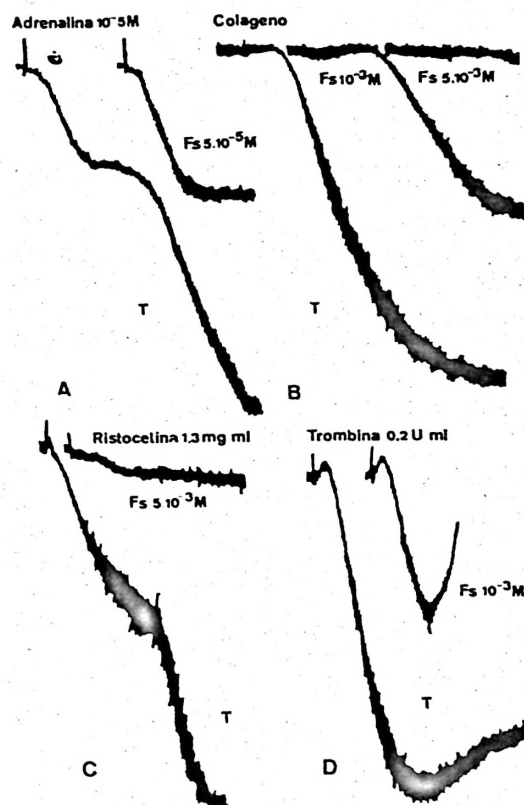


Fig. 2. Efecto de la furosemida sobre la agregación plaquetaria inducida por adrenalina, colágeno, ristocetina y trombina.

A. Efecto de la Fs sobre la agregación inducida por adrenalina. B. Efecto de las diversas concentraciones de Fs sobre la agregación inducida por colágeno. C. Efecto de la Fs sobre la agregación inducida por la ristocetina. D. Efecto de la Fs sobre la agregación inducida por la trombina.

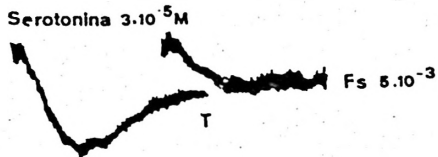


Fig. 3. Efecto de la furosemida sobre la agregación inducida por serotonina.

diados por la tasa plasmática de calcio, ya que la adición de calcio 20 mM al sistema no corrige este efecto al haber sido extraído el plasma con citrato (fig. 4B).

En cuatro casos se estudió la disponibilidad de factor 3 plaquetario inducido por ADP y no se observaron modificaciones significativas en su determinación a los cinco minutos, cuando en el sistema se introdujo $Fs\ 2 \times 10^{-3}\ M$.

Se estudiaron los efectos de la Fs sobre el shock osmótico plaquetario. La recuperación de la densidad óptica de los plasmas ricos en plaquetas, tras ser sometidos a las soluciones hipotónicas, resultó parcialmente inhibida por la Fs . Este efecto está en relación directa con la concentración final de Fs en el sistema (fig. 5).

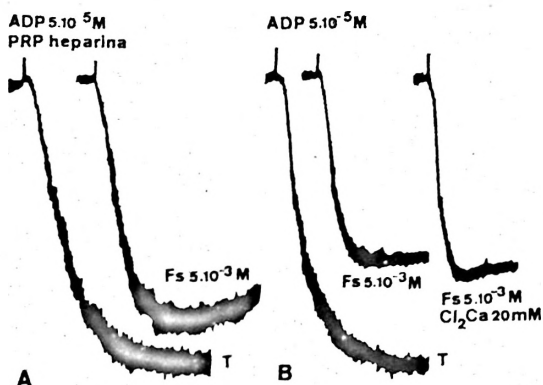


Fig. 4. Efecto de la heparina y del Cl_2Ca sobre la acción inhibidora de la agregación por ADP inducida por la furosemida.

A. Efecto de la Fs sobre la agregación inducida por ADP en plasma extraído con heparina. B. Efecto de la adición de Cl_2Ca sobre la acción inhibidora de la Fs en la agregación inducida por ADP.

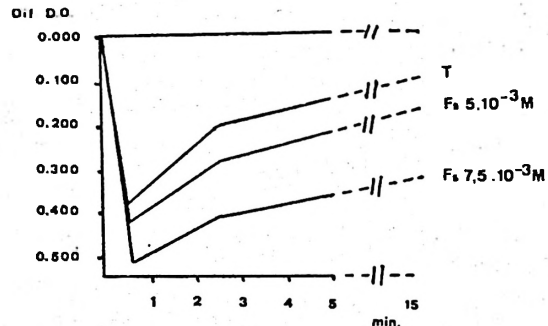


Fig. 5. Efecto de la furosemida sobre la recuperación del shock osmótico.

Discusión

La furosemida tiene *in vitro* un efecto inhibidor de la agregación plaquetaria que se expresa de forma inmediata y es proporcional a su concentración. Es intenso y afecta a la velocidad de agregación expresada en la primera onda, cuando se induce por ADP o adrenalina. Esta acción se diferencia de la de otros inhibidores de la agregación que actúan de forma similar al ácido acetilsalicílico, y que alteran únicamente la fase de liberación (segunda onda) pero dejan invariable la primera onda de inducción. Afecta asimismo a la segunda onda de agregación pudiendo llegar, como en el caso del colágeno o la adrenalina, a un bloqueo total de la misma, consiguiendo incluso una discreta desagregación. La Fs se comporta en cierto modo como la VK 744, modelo segundo de inhibidores de la agregación (20).

Su efecto es extenso, expresándose sobre la actividad de todos los inductores de la agregación y/o liberación estudiados: ADP, adrenalina, colágeno, trombina, serotonina y ristocetina y es independiente del anticoagulante utilizado, inhibiendo de forma similar la agregación inducida por ADP, tanto sobre plasmas obtenidos con citrato como con heparina. Es asimismo independiente del calcio plasmático, no realizándose su acción como determinados inhibidores (EDTA, oxalato) por la quelación del calcio plasmático (11).

CASTALDI *et al.* (8) y HARDISTY y HUTTON (14) han demostrado que el factor 3 plaquetario es liberado tras la agregación de plaquetas por ADP, adrenalina, serotonina y colágeno. Algunos agentes, como la adenosina (14), son capaces de inhibir la agregación plaquetaria y al mismo tiempo bloquear la liberación del factor 3 plaquetario. No parece ser éste el mecanismo de acción de la Fs en que la inhibición conseguida sobre la agregación no parece alterar la posibilidad de una liberación correcta de factor 3 plaquetario. Se ha señalado que ambos hechos, agregación plaquetaria y liberación de este factor, pueden ir disociados (12). ROSSI y LEVIN (21), por otra parte, comprueban que al inhibirse la agregación al colágeno de forma gradual con cantidades crecientes de Fs la liberación de ADP se produce y es constante.

La Fs produce un efecto inhibitorio de la agregación por la ristocetina similar al que presentan ciertos enfermos de Willebrand, y los enfermos con distrofia trombocitaria hemorrágica (enfermedad de Bernard-Soulier) (3). En la enfermedad de Willebrand la falta de respuesta a la ristocetina se debe a la ausencia de un cofactor plasmático de agregación (16) y en la enfermedad de Bernard-Soulier (2, 9) a una alteración de los receptores de la membrana plaquetaria a ese cofactor. Es difícil precisar si el mecanismo de acción de la Fs se realiza a través de un efecto competitivo con el cofactor plasmático o bloqueando los receptores de membrana. Sin embargo, parece lógico pensar que un efecto tan intenso y extenso como el que produce la Fs, inhibiendo el efecto de otros inductores de agregación, sea más fácil explicarlo por una alteración energética de los sistemas metabólicos de la plaqueta.

Las alteraciones observadas en la recuperación del shock osmótico plaquetario tras la adición de Fs ponen de manifiesto un trastorno metabólico trombocitario y apuntaría a que uno de los mecanismos

patogénicos implicados en su acción se situaría en los sistemas de producción de energía. SENFT (22) señala, sin embargo, que el fármaco actuaría aumentando la tasa de AMP cíclico por bloqueo de la fosfodiesterasa, provocando un trastorno en la transmisión de la acción inductora de los diferentes agentes al interior de la plaqueta. Este bloqueo de la fosfodiesterasa sería similar al inducido por la cafeína (17, 18) y teofilina (7). Sin embargo, los trabajos de ROSSI y LEVIN (21) con furosemida y PGE₁ (que sobre la plaqueta aumenta el AMP cíclico al estimular la adenil-ciclasa), demuestra efectos inhibidores de sumación sobre la agregación plaquetaria y no de potenciación, poniéndose por ello en duda su efecto sobre las fosfodiesterasas.

Valorando conjuntamente las concentraciones de Fs que tienen acción inhibitoria *in vitro*, la capacidad de distribución y de difusión de este fármaco, conseguir efectos significativos en su utilización clínica, requeriría administrar dosis muy elevadas con efectos tóxicos importantes. Esta droga no tendría aplicación terapéutica como antiagregante, pero su estructura, diferente a la de otros fármacos con esta actividad, abre la posibilidad de incorporar drogas de estructuras químicas similares en el estudio de la inhibición de la agregación plaquetaria, con posible proyección en la prevención de la trombosis.

Resumen

Se estudia el efecto de la furosemida sobre la agregación de las plaquetas, disponibilidad de factor 3 plaquetario y shock osmótico. Su efecto inhibitorio se expresa de forma extensa sobre la agregación con ADP, adrenalina, colágeno, ristocetina, trombina y serotonina. Este efecto no es influido por la heparina. La acción de la furosemida no se realiza a través de la quelación del calcio. La disponibilidad del factor 3 plaquetario se realiza de forma normal. La fase de recuperación del shock osmótico plaquetario se inhibe por la furosemida en razón directa a su concentración.

Bibliografía

1. BEAUMONT, J. L., CAEN, J. y BERNARD, J.: *Le Sang*, 27, 243-248, 1956.
2. BERNARD, J., CAEN, J., BEANNEAU, C., TICHET, M. y TOBELEM, G.: En «Actualités Hématologiques» (8^e Série). Masson y Cie. París, 1974, pág. 3.
3. BITHELL, T. C., PAREKH, S. J. y STRONG, R. R.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 201, 145-154, 1972.
4. BORN, G. V. R.: *Nature* (London), 194, 297-299, 1962.
5. BOUNAMEAUX, Y. y VAN CAUWENBERGE, N.: *Le Sang*, 25, 88-97, 1954.
6. BOUSSER, M. G.: *Rev. Méd.*, 16, 1039-1055, 1974.
7. BYDEMAN, S. y JOUSSEN, O.: *Acta Med. Scand.*, Suppl. 525, 179-180, 1971.
8. CASTALDI, P. A., LARRIEU, M. J. y CAEN, J.: *Nature* (London), 207, 422-424, 1965.
9. CAEN, J. y LEVY-TOLEDANO, S.: *Nat. New Biol.*, 224, 159-160, 1973.
10. DAY, H. J. y HOLMSEN, H.: *Series Haemat.*, 4, 3-27, 1971.
11. GAETANO, G., VERMYLEN, J. y VERSTRATE, M.: *Nouv. Rev. Fr. d'Hémat.*, 11, 339-364, 1971.
12. GAETANO, G., VERMYLEN, J. y VERSTRATE, M.: *Acta Med. Scand.*, Supp. 525, 99-109, 1970.
13. HANDIN, R. I., FORTIER, N. L. y VALERI, C. R.: *Transfusion*, 10, 305-309, 1970.
14. HARDISTY, R. M. y HUTTON, R. A.: *Brit. J. Haematol.*, 11, 258-268, 1965.
15. HOLMSEN, H.: *Clinics Haemat.*, 1, 235-267, 1972.
16. HOWARD, M. A. y FIRKIN, B. G.: *Thromb. Diathes. Haemorrh.*, 26, 362-369, 1971.
17. MILLS, D. C. B.: *Clinics Haemat.*, 1, 295-305, 1972.
18. MUSTARD, J. F. y PACKMAN, M. A.: *Pharmacol. Rev.*, 22, 97-189, 1970.
19. PIETTE, M. y PIETTE, C.: *Le Sang*, 30, 144-151, 1959.
20. RITSCHARD, J. P., GUTTERIDGE, D. y BOUVIER, C. A.: *Nouv. Rev. Fr. d'Hémat.*, 15, 147-148, 1974.
21. ROSSI, E. C. y LEVIN, N. W.: *J. Lab. Clin. Med.*, 81, 140-148, 1973.
22. SENFT, G.: En «Salt and Water Balance» (K. H. Beyer, ed.). Pergamonn Press, Londres, 1968, págs. 83-91.
23. WEISS, H. J., ALEDORT, L. M. y KOCHWA, S.: *J. Clin. Invest.*, 47, 2169-2180, 1968.
24. ZUCKER, M. B., PERT, J. H. y HILGARTNER, M. W.: *Blood*, 30, 556-562, 1967.