

EFEITO ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIO INDUZIDO PELO USO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDIAIS: UMA LIMITAÇÃO PARA A PRESCRIÇÃO PRÉ-CIRÚRGICA?

ANTIPLATELET EFFECT INDUCED BY NSAIDS: A LIMITATION ON PRE-SURGICAL PRESCRIPTION?

Paulo Rafael Sanches **CALVO**¹, Thaís Jacinto **BENETTI**¹, Raylana Domingues **BICHERI**¹, Livia Fonseca **CAVALHERO**¹, Nicole Iwane **KURASHIMA**¹, Antonio Marcos dos Anjos **NETO**², Mário dos Anjos **NETO FILHO**^{3*}

1. Acadêmico(a) do curso de graduação em Medicina da Faculdade Ingá; 2. Médico, Especialista em Urologista (SBU); 3. Prof. Dr. Adjunto da Disciplina de Farmacologia da Faculdade Ingá.

* Faculdades Ingá, Rodovia PR-317, 6114, Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87035-510. marioneto@unigna.br

Recebido em 07/10/2012. Aceito para publicação em 25/11/2012

RESUMO

Após a primeira visualização da agregação de plaquetas por Bizzozero, em 1882, houve particular interesse pela descoberta de substâncias inibidoras da agregação de plaquetas para tratar e/ou prevenir doenças tromboembólicas. Nos anos 1968, documentou-se que uma pequena dose de ácido acetilsalicílico (AAS), poderia prolongar o tempo de hemorragia, mesmo em indivíduos normais, resultando na proposta de interrupção do uso do AAS entre 7 e 10 dias antes de cirurgias. Nosso objetivo foi o de embasar farmacologicamente a possibilidade de pacientes com risco tromboembólico substituírem a utilização do AAS em monodose diária, uma semana antes de procedimentos cirúrgicos, pelo ibuprofeno, três vezes ao dia, até a véspera de cirurgias eletivas. Em conjunto, os trabalhos consultados nos permite sugerir que procedimentos cirúrgicos pequenos, pouco invasivos e com baixo risco de sangramento sejam realizados sem a interrupção da estratégia farmacológica adotada para obtenção da antiagregação de plaquetas, enquanto que pacientes com risco tromboembólico poderiam substituir o AAS administrado em monodose diária, uma semana antes de procedimentos cirúrgicos, pelo ibuprofeno, três vezes ao dia, até a véspera de cirurgias eletivas de grande porte, bastante invasivas e com risco de sangramento.

PALAVRAS-CHAVE: agregação plaquetária, anti-inflamatórios não-esteroides, tempo de sangramento, aspirina, ibuprofeno, cirurgia geral.

ABSTRACT

After the first visualization from the platelets aggregation by Bizzozero, in 1882, there was special interest by the discovery of inhibitors of platelets aggregation, to treat and prevent thromboembolic diseases. In 1968, was documented that a small dose of Aspirin[®] (ASA) could prolong the bleeding time in healthy people, resulting in the practice of discontinuing use of aspirin between 7 and 10 days before surgery. Our objective was to substantiate pharmacologically that patients with thromboembolic risk substitute the single-dose daily ASA, one week before surgical procedures, by the ibuprofen three times a day until the day before elective surgery. Take together, the studies reviewed allows us to suggest that small surgical procedures, minimally invasive, with a low risk of bleeding to be carried out without interruption of pharmacological strategy adopted to obtain platelet antiaggregation, while patients with thrombotic risk could substitute the ASA single-dose daily, one week before surgical procedures, by the ibuprofen three times a day, until the eve of elective large invasive surgical procedures with a bleeding risk.

KEYWORDS: platelet aggregation, anti-inflammatory agents, non-steroidal, bleeding time, aspirin, ibuprofen, general surgery.

1. INTRODUÇÃO

Após a primeira visualização da agregação de plaquetas por Bizzozero, em 1882, inúmeros estudos subsequentes permitiram a melhor compreensão acerca da capacidade de agregação das plaquetas e das respectivas

condições clínicas onde se verifica modificações patológicas dos padrões hemodinâmicos e/ou da bioquímica dos elementos do sangue circulante¹.

A partir de então, houve particular interesse pela descoberta de substâncias que pudessem induzir a inibição da agregação de plaquetas, como forma de tratar e/ou prevenir doenças tromboembólicas, deflagrando um novo tempo para as tentativas de prevenção do infarto do miocárdio e dos acidentes vasculares isquêmicos.

Com a descoberta das propriedades pró-agregantes do ADP, foi uma questão de tempo para que as propriedades antiagregante de plaquetas, induzida pelo ATP e pela adenosina, fossem descobertas; não por acaso, mas sim pela relação química existente entre estas moléculas^{2,3}.

Nos idos de 1968, fora documentado que uma pequena dose de ácido acetilsalicílico (AAS), Aspirina^R (Bayer), administrada por via oral, poderia prolongar o tempo de hemorragia, mesmo em indivíduos normais, evidenciando clinicamente seu potencial para inibição da agregação plaquetária^{4,5,6}, e por tanto, de sua associação com o aumento no tempo de sangramento e com o risco de hemorragia per e pós-cirúrgica.

Diante desta constatação e com base em estudos posteriores de cirurgia geral eletiva, fora confirmado o aumento no sangramento per e pós-cirúrgico após o uso da Aspirina^R, o que resultou na proposta de interrupção do uso do AAS de 7 a 10 dias antes de procedimentos cirúrgicos^{7,8}. A relativização desta proposta veio a partir de estudos que sugeriam não ser necessária a interrupção do uso de AAS no período pré-cirúrgico, em pacientes submetidos á procedimentos com baixo risco hemorrágico per ou pós-cirúrgico e/ ou que apresentam baixa expectativa de transfusões de sangue em decorrência da cirurgia^{9,10}.

Entretanto, quando se pode prever a realização de procedimentos cirúrgicos invasivos o suficiente para justificar a necessidade de eventual transfusão de sangue e/ ou com várias horas de duração, um grupo de pacientes que faz uso de Aspirina^R para inibir a agregação plaquetária, previamente à realização de cirurgia eletiva, deve ser considerado: o grupo de pacientes que não pode ficar sem suas doses diárias de AAS, sob o risco de agravo de doenças tromboembólicas pré-existentes. Então, como manter este grupo de pacientes em segurança clínica, até o momento da cirurgia, porém sem expô-los ao risco hemorrágico aumentado nas fases per e pós-cirúrgica?

Em face desta situação dialética, nosso objetivo foi o de buscar na literatura o embasamento farmacológico necessário para subsidiar clínicos e cirurgiões sobre a possibilidade de pacientes com doenças tromboembólicas substituírem a utilização do AAS em monodose diária, uma semana antes de procedimentos cirúrgicos, pelo ibuprofeno, três vezes ao dia, até a véspera de cirurgias

eletivas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento desta revisão integrativa optamos pela proposta de Ganong (1987)¹¹, obedecendo-se às seguintes etapas: 1) identificação da questão norteadora, seguida pela busca dos descritores ou palavras-chaves; 2) determinação dos critérios de inclusão ou exclusão da pesquisa em bases de dados online; 3) categorização dos estudos, resumizando e organizando as informações relevantes; 4) avaliação dos estudos pela análise crítica dos dados extraídos; 5) discussão e interpretação dos resultados examinados, contextualizando o conhecimento teórico e avaliando quanto sua aplicabilidade; 6) apresentação da revisão integrativa e síntese do conhecimento de cada artigo revisado de maneira sucinta e sistematizada.

No presente estudo a questão norteadora da revisão integrativa foi: verificar quais as evidências disponíveis na literatura mundial que possam embasar a possibilidade de pacientes com doenças tromboembólicas substituírem a utilização do AAS em monodose diária, uma semana antes de procedimentos cirúrgicos, pelo ibuprofeno, três vezes ao dia, até a véspera de cirurgias eletivas.

Foram consultadas as bases de dados LILACS (Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), a biblioteca SciELO (*Scientific Electronic Library on Line*) e PubMed (*National Center for Biotechnology Information - NCBI, U.S. National Library of Medicine*), incluindo-se os estudos que abordaram a temática do risco e do manejo da antiagregação plaquetária induzida por anti-inflamatórios não-esteroidais em pacientes submetidos á cirurgias eletivas, publicados desde 1962 até 2012, independente do idiomas de publicação. Foram utilizados os seguintes descritores controlados para a busca e também utilizados como palavras-chave: agregação plaquetária (*platelet aggregation*), anti-inflamatórios não-esteroides, (*anti-inflammatory agents, non-steroidal*), tempo de sangramento (*bleeding time*), Aspirina^R (*Aspirin*), ibuprofeno (*ibuprofen*), cirurgia geral (*general surgery*).

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. Bioquímica da agregação hemostasia

A hemostasia é um processo que envolve vários mecanismos que cessam o sangramento quando há uma ruptura de vasos sanguíneos. Inúmeros fatores incluindo células endoteliais, plaquetas, proteínas da cascata de coagulação e a fibrinólise desempenham funções essenciais para manutenção da hemostasia¹². A hemostasia consiste de uma fase vascular, outra fase plaquetária e uma terceira fase de coagulação.

As duas primeiras fases constituem a hemostasia primária, que inclui os vasos sanguíneos, as plaquetas e proteínas plasmáticas, bem como o fator de von Willebrand e o fibrinogênio. A vasoconstrição reflexa à lesão do vaso facilita a adesão e a agregação plaquetária, necessários para a formação do coágulo.

A fase de coagulação, também conhecida com hemostasia secundária é responsável pela consolidação das plaquetas no coágulo pela formação de um coágulo de fibrina. Finalmente, a fibrinólise livra o organismo de depósitos fibrinosos. A fase plaquetária de hemostase é dividida em três etapas: adesão, secreção e agregação. Durante o trauma, receptores de superfície, tais como da glicoproteína (GP) complexo Ib/IX, asseguram a aderência das plaquetas às fibras de colágeno subendotelial por meio do fator de von Willebrand (vWF)¹³.

As plaquetas, em seguida, são submetidas a alterações morfológicas - principalmente pelo aparecimento de pseudópodes - e bioquímicas, levando à secreção do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos no ambiente extracelular. Existem dois tipos diferentes de grânulos: grânulos densos, que contêm o trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), serotonina e cálcio. Os grânulos alfa contêm proteínas, tais como o fibrinogênio (Fg) e o vWF. As moléculas de ADP secretadas para o meio extracelular ajudam a provocar a agregação de plaquetas através da alteração na configuração do receptor GP IIb / IIIa. Estas alterações permitem ao GP IIb / IIIa ligar-se ao fibrinogênio circulante ou à moléculas do vWF. A coesão e a agregação plaquetária são asseguradas pela formação de pontes entre os receptores GP IIb / IIIa da superfície da plaqueta com o Fg ou com o vWF¹³.

Estes e outros estudos contribuíram com a tentativa de contextualizar o conhecimento científico com a condição clínica de pacientes cujas modificações patológicas dos padrões hemodinâmicos e/ou da bioquímica do sangue circulante relacionavam-se com as doenças tromboembólicas. Tornou-se clara a necessidade de mais avanços em estudos que pudessem levar a novas substâncias capazes de inibir a agregação plaquetária, além do ATP e da adenosina: um novo tempo para as tentativas de prevenção do infarto do miocárdio e dos acidentes vasculares isquêmicos fora iniciado^{14,15}.

3.2 Efeito dos AINEs sobre a agregação de plaquetas

Sintonizados com a necessidade destes estudos, em 1968, alguns grupos de pesquisadores^{4,5,6} documentaram que uma pequena dose de Aspirina^R, administrada por via oral, poderia prolongar o tempo de hemorragia, mesmo em indivíduos normais (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos quando a Aspirina^R, mas não o salicilato de sódio, foram administrados por via oral ou

adicionada ao plasma rico em plaquetas, permitindo a conclusão de que a Aspirina^R era capaz de inibir a agregação de plaquetas por bloquear a liberação de ADP a partir destas: mas como esta evidencia poderia ser explicada?

Em 1971, a partir dos estudos conduzidos no Departamento de Farmacologia da Faculdade Real de Cirurgias da Inglaterra, em Londres, verificou-se que a Aspirina^R adicionada ao plasma humano rico em plaquetas (*in vitro*) ou quando administrada por via oral, era capaz de inibir seletivamente a liberação de prostaglandina (PG) E₂ a partir de plaquetas. No mesmo ano, os estudos do brasileiro Sérgio Ferreira¹⁶ em conjunto com Sir John Vane¹⁷, permitiram à Smith & Willis (1971)¹⁸ sugerir que “a eficácia clínica da Aspirina^R e da indometacina como agentes anti-inflamatórios poderia ser explicada pela inibição da produção de prostaglandinas”, dadas as evidências de que a Aspirina^R inibiu a conversão do ácido araquidônico em PGs, nas plaquetas analisadas.

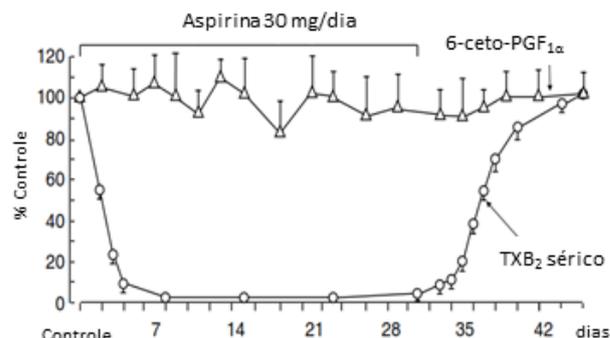


Figura 1. Inibição seletiva e cumulativa da produção de tromboxano (TXB₂) por plaquetas induzida por baixa dosagem de Aspirina^R em voluntários saudáveis. Born & Patrono (2006)¹⁹ apud Redrawn para Patrignani *et al.*, 1982).

Mas, a assertiva de Smith & Willis, embora fosse racional, não tinha um sólido embasamento bioquímico, posto que as PGs conhecidas à época, PGE₂ e a PGF_{2α} não eram capazes de promover a agregação plaquetária, fazendo-os pensar que algum outro composto ainda não identificado estaria relacionado ao efeito antiagregante plaquetário ativado pela Aspirina^R. Com a descoberta dos novos compostos, intermediários instáveis, os endoperóxidos cíclicos PGG₂ e PGH₂, e de um extremamente potente, mas fugaz, agregante plaquetário, o prostanóide denominado tromboxano A₂ (TXA₂)^{20,21}, Smith & Willis haviam encontrado os componentes que faltavam para documentar definitivamente a relação entre a inibição bioquímica do metabolismo do ácido araquidônico pela Aspirina^R, impedindo a produção do TXA₂ e a consecutiva redução da agregação plaquetária. Frisa-se que a avaliação da produção de TXA₂ é realizada de forma indireta: uma vez que o TXA₂ tem uma meia-vida curta, sua concentração é estimada indiretamente pelo seu produto de hidratação mais estável, o TXB₂^{22,23}. A evo-

lução do conhecimento científico acerca do mecanismo de ação do AAS em termos de inibição da agregação plaquetária é esquematizada na Figura 2.

O papel do TXA₂ é semelhante ao do ADP, isto é, induz a agregação plaquetária, além de ser um potente vasoconstritor²². Embora o tempo de meia-vida da Aspirina^R seja de aproximadamente 20 minutos, a inibição da produção de TXA₂ pode ser mantida pela administração em monodose diária²². Antes dos estudos de Armstrong *et al.* (2008)²⁴ não havia clareza acerca da relação de proporcionalidade necessária para a ativação de plaquetas e a produção de TXA₂. Contudo, Hennekens *et al.* (2004)²⁵ já haviam demonstrado anteriormente a necessidade de inibição de pelo menos 95% do TXA₂ com a Aspirina^R, para uma redução significativa da agregação TXA₂-dependente, mesmo sendo as plaquetas anucleadas, e portanto desprovidas da capacidade de sintetizar novas COX-1, ou de regenerar as COX-1 irreversivelmente acetilada pela Aspirina^R, ficando a produção de TXA₂ dependente da produção de novas plaquetas^{22,23}.

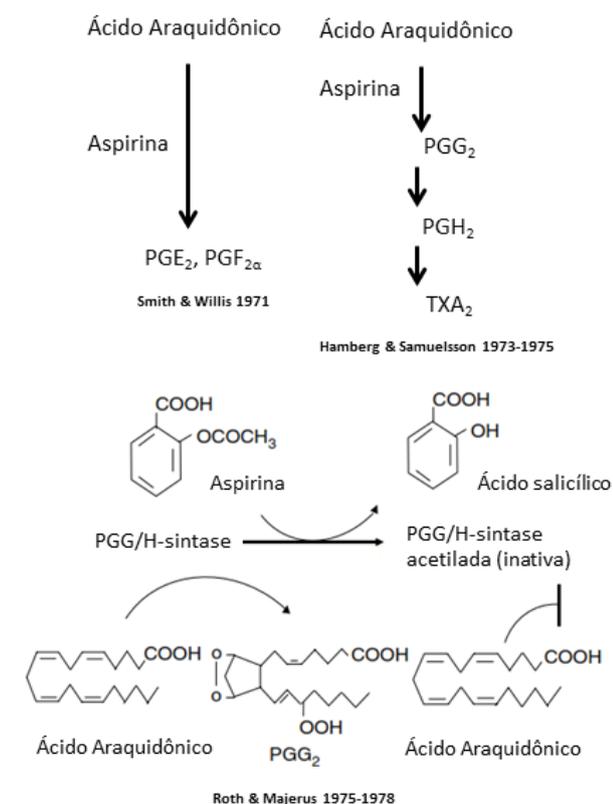


Figura 2. Principais etapas históricas no processo de compreensão do mecanismo de ação da Aspirina^R sobre a bioquímica de inibição da atividade plaquetária. PG, prostaglandina; TX, tromboxano. Born & Patrono (2006)¹⁹.

Com base nestas evidências, fármacos com a capacidade de inibir a agregação das plaquetas, como os AINEs passaram a ser clinicamente utilizados para pre-

venir e/ou reverter a agregação plaquetária na trombose arterial, principalmente no infarto do miocárdio e no acidente vascular cerebral isquêmico. A partir de então, tornou-se possível algum controle sobre a potencialmente letal agregação de plaquetas, como os tampões hemostáticos no local da lesão vascular em resposta a hemorragia ou em fissuras ou rupturas em placas ateroscleróticas²³. Na prática, fora possível visualizar o equilíbrio favorável entre os efeitos benéficos e prejudiciais de terapia antiplaquetária, conseguida por tratamento de doentes cujo risco trombótico claramente supera o seu risco de sangramento e de complicações²³.

3.3 A bioquímica relacionada ao efeito antiagregante de plaquetas induzido pelo AAS

Roth & Majerus (1975)²⁶ e Roth *et al.* (1975)²⁷ contribuíram para compreensão acerca do mecanismo de ação da Aspirina^R, evidenciando a partir da estrutura cristalina da PGH-sintase inativada, que a Aspirina^R inibe a enzima ciclooxigenase (COX) pela acetilação do resíduo de serina (Ser-529 na COX-1 humana) graças à estratégica localização destes resíduos, que impede o acesso do substrato da enzima, o ácido araquidônico, ao sítio catalítico da enzima COX (Figura 2).

Um ano depois, Moncada *et al.* (1976)²⁸ descobriram a prostaciclina (PGI₂), uma substância instável, com propriedades vasodilatadoras, produzida a partir das paredes de leitos vasculares, que é capaz de modular o prostanoide plaquetário (TXA₂), inibindo-o. A partir de então, os pesquisadores identificaram uma situação dualística, denominada de “dilema da Aspirina^R”. Por um lado, ao inibir a COX, o AAS inibe a síntese de TXA₂ (efeito antiagregante). Contudo, ao inibir a mesma enzima COX, o AAS inibe a síntese de PGI₂, que deixa de modular negativamente a síntese de TXA₂ (efeito agregante).

Diante destes achados, concluiu-se que o efeito antiagregante plaquetário do AAS é na verdade resultado do efeito agregante subtraído do efeito antiagregante. Porém, como ainda não houvesse evidência de que a Aspirina^R seria trombogênica em doses elevadas, acreditou-se que a inibição da PGI₂ vascular poderia limitar os potenciais efeitos antitrombóticos da Aspirina^R, promovidos a partir da modulação inibitória da prostaciclina, sobre a produção de TXA₂ das plaquetas. Estas considerações foram responsáveis por desencadear uma corrida mundial em busca da menor dose eficaz de Aspirina^R suficiente para inibir a função agregante das plaquetas, culminando com o conhecimento clínico do efeito antitrombótico da Aspirina^R em baixas doses.

Resultados concordantes com esta tese foram publicados, demonstrando imediata e praticamente completa acetilação da COX-1 de plaquetas pela Aspirina^R, com a subsequente supressão da produção do TXA₂ plaquetário sob o efeito de 160 mg da droga²⁹. Faltava demonstrar a

implicação tácita do TXA₂ com as doenças tromboembólicas. Foi o que demonstraram FitzGerald & Patrono, comprovando os níveis baixos de síntese de TXA₂ em humanos saudáveis³⁰ enquanto que era evidente o aumento da síntese de TXA₂ em síndromes cerebrovasculares e coronarianas agudas, bem como em doenças com maior fator de risco cardiovascular e mieloproliferativas associadas a ativação plaquetária persistente²³.

3.4 Interrupção do uso clínico do AAS antes de procedimento cirúrgicos

Embora, haja estudos sugerindo não ser necessária a interrupção do uso de AAS antes de procedimentos cirúrgicos que não evidenciem qualquer aumento significativo na perda de sangue ou a necessidade de transfusões de sangue^{9,10}, segundo Patrono *et al.* (2004)²³, a função plaquetária é retomada em níveis normais após 7 dias após a administração da última dose¹⁹ de Aspirina^R, sugerindo que a interrupção do uso deste fármaco seria necessário para garantir uma condição mais favorável da homeostasia do paciente.

Mas então, como compreender tal discrepância? Vários fatores podem explicar esta discrepância, incluindo a heterogeneidade das populações estudadas, as melhorias nas técnicas cirúrgicas e a utilização de diferentes métodos para o controle do sangramento. Seria razoável sugerir então, que em pacientes sem comorbidades, especialmente cardiovasculares ou hemostáticas, submetidos a procedimentos cirúrgicos pouco invasivos poder-se-ia adotar métodos hemostáticos locais³² pouco influenciados pela ação da Aspirina^R.

No entanto, uma avaliação médica criteriosa deve ser solicitada caso haja a intenção de interromper o uso da Aspirina^R por 7 a 10 dias antes de cirurgias em pacientes com um elevado risco hemorrágico (devido ao uso), ou isquêmico (pela interrupção do uso).

Pacientes com elevado risco hemorrágico podem ser aqueles com anormalidades qualitativa ou quantitativa de plaquetas³³, portadores de coagulopatias congênitas ou adquiridas³⁴, doentes renais crônicos³⁵, com falência hepática³⁶ e ainda pacientes etilistas^{37,38,39}. A Tabela 1 resume as principais doenças hemostáticas correlacionando-as com doenças sistêmicas.

Adicionalmente, é recomendável que a realização de procedimentos cirúrgicos neste pacientes seja realizada em ambiente hospitalar.

Sob a óptica de que o AAS tem sido associado com um aumento no tempo de sangramento e com o risco de hemorragia per e pós-cirúrgico, para a realização de cirurgias eletivas, tem sido frequentemente recomendado que o paciente pare de tomar o AAS entre 7 e 10 dias antes do procedimento cirúrgico. Esta recomendação foi baseada em estudos de cirurgia geral, que relataram um aumento no sangramento per e pós-cirúrgico em pacien-

tes que tomam AAS^{7,8}.

Ao contrário do AAS, os outros AINEs inativam a enzima COX de modo transitório. Os efeitos destes AINEs sobre a homeostasia primária depende de seu tempo de meia-vida plasmática⁴⁰. Assim, AINEs como o piroxicam, possuem um prolongado efeito que perdura por dias após sua administração⁴¹. Por outro lado, AINEs de curta duração, como o ibuprofeno, perder o seu efeito antiplaquetário, em poucas horas. Contudo, embora o tempo de sangramento geralmente seja maior após a administração de AINEs que não o AAS, ainda assim muitos permanecem dentro das faixas mínimas e máxima consideradas normais⁴². Finalmente, os AINEs COX-2-seletivos, tais como meloxicam, rofecoxib e celecoxib, não alteram fatores hemostáticos, não sendo necessária interrupção de sua utilização antes de cirurgias eletivas⁴³.

Tabela 1. Doenças sistêmicas associadas com doenças hemostáticas

Tipos de doenças hemostáticas	Doenças sistêmicas
Anomalias paquetárias	
Quantitativa	Anemia hemolítica Anemia megaloblástica Cirrose hepática e hipertensão Etilismo Leucemia Lupus eritematoso sistêmico Purpura trombocitopênica idiopática AIDS
Qualitativa	Anemia megaloblástica Falência renal e síndrome urêmica Doença de von Willebrand Síndrome de Bernard-Soulier Síndrome de Chediak-Higashi Síndrome de Hermansky-Pudlak Síndrome de Wiskott-Aldrich Doença de Glanzmann
Coagulopatias Congênita	Deficiência do Fator VII Hemofilia A: deficiência do Fator VIII Hemofilia B: deficiência do Fator IX
Adquirida	Cirrose hepática Deficiência de vitamina K Etilismo

Schafer (1995)⁴².

O AAS ainda é o único AINEs utilizado no tratamento e prevenção da trombose⁴⁴. Em parte esta constatação se deve ao fato de que o AAS inibe irreversivelmente a COX plaquetária, isto é, por toda a existência da plaqueta, impedindo a biossíntese de prostaglandinas e TXA₂, e a consecutiva ativação da agregação plaquetária^{45, 46}. Apesar disso, a Aspirina^R foi aprovada como antiagregante plaquetário no Japão apenas no ano 2000, sendo agora amplamente prescrito para a prevenção de eventos cardiovasculares secundárias²⁹.

3.5 Substituição do AAS pelo Ibuprofeno para obtenção do efeito antiagregante de plaquetas:

O ibuprofeno é um AINEs utilizado como analgésico, antitérmico e agente anti-inflamatório propriamente dito. Mills *et al.* (2012)⁴⁷, observaram que depois de uma administração por via oral de Ibuprofeno, o fármaco apareceu no plasma de forma inalterada, alcançando pico plasmático de 100 μ M após 4 horas, com pico do nível sanguíneo *in vivo* sendo atingido após 2 horas, diminuindo para 12 μ M após 10 horas da administração. Após 24 horas de sua administração, muito do Ibuprofeno administrado é excretado na urina.

Akagi *et al.* (2011)⁵³ compararam o efeito antiagregante da Aspirina^R *versus* ibuprofeno, loxoprofeno e etodolac, administrando estes AINEs antes ou depois da Aspirina^R, e induzindo a agregação com colágeno (25 mg/ mL). No grupo da Aspirina^R, a inibição máxima da agregação de plaquetas foi de $37,7 \pm 4,3\%$ após 6 h da administração ($p < 0,01$). Em contraste, a percentagem de inibições com o ibuprofeno, loxoprofeno de sódio e etodolac após 6 h de administração variou de 0,7 a 18,5%, sendo o maior valor obtido pelo ibuprofeno e mantidos sem variação significativa até 12 h após a administração.

Quando os autores⁵³ dosaram os níveis de TXB₂ no soro, verificaram que no grupo tratado com etodolac, 6 h após a administração do AINEs, a concentração de TXB₂ era mais baixa do que a do grupo de controle, porém, significativamente maiores do que nos grupos tratados com ibuprofeno ou loxoprofeno de sódio, sugerindo que o etodolac ligeiramente inibe COX-1, mas o ibuprofeno e loxoprofeno exercem maior inibição da atividade de COX-1, embora transitória. Assim Akagi *et al.* (2011)⁵³ mostraram, dentro dos limites de seu estudo, que dentre os AINEs estudados, o loxoprofeno e o ibuprofeno seriam melhores inibidores reversíveis da agregação plaquetária, tendo-se como referência o efeito da Aspirina^R.

Estudos ainda mais antigos (Ikeda 1977)⁵⁴ mostraram que o ibuprofeno, assim como a Aspirina^R, inibe a ciclooxigenase das plaquetas e bloqueia a segunda fase de agregação estimulada pelo ADP ou pela adrenalina⁴⁸. Entretanto, ao contrário da Aspirina^R, o ibuprofeno forma uma ponte salina com Arg120 de COX-1⁴⁹, inibindo a atividade enzimática de síntese da PGH₂. Contudo, a supressão da função das plaquetas é limitada a um tempo fixo após a administração do ibuprofeno, uma vez que a inibição de COX-1 é reversível^{40,50} e de curta duração; as plaquetas não são mais afetadas 24 horas após a administração do ibuprofeno^{51,52}. (Figura 3).

Uma metanálise realizada com 474 estudos de avaliação do risco de hemorragia cirurgia em pacientes em uso de doses baixas de Aspirina^R crônica mostrou que o risco de hemorragia cirúrgica aumentou 1,5 vezes, sem provocar o aumento no nível de gravidade de complicações hemorrágicas ou de mortalidade⁵⁵. Porém, estudos

retrospectivos mostraram que a descontinuidade da administração da Aspirina^R pode resultar em um aumento de 2.3% a 6% do risco de eventos trombóticos, como síndrome coronariana aguda⁵⁶, acidente vascular isquêmico⁵⁷ ou isquemias de membros.

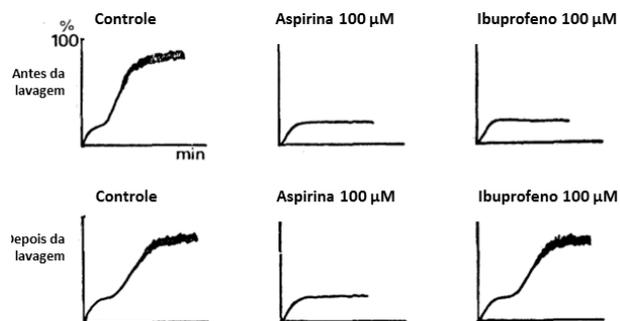


Figura 3. Plaquetas foram incubadas com 100 μ M de Aspirina^R ou ibuprofeno por 5 min, a 37°C, após o que, a agregação das plaquetas foi estimulada com adrenalina (5uM) (curvas da porção superior). Plaquetas pré-incubadas com Aspirina^R ou ibuprofeno foram lavadas com salina normal e ressuspensas em PPP do mesmo indivíduo para outro estudo agregação (curvas da porção inferior). Ikeda (1977)⁵⁴.

Reiteramos com base na literatura que não há consenso sobre a retirada da medicação antiplaquetária antes de cirurgias eletivas. Diretrizes publicadas incluem a possibilidade de substituição temporária de Aspirina^R por um AINEs inibidor reversível COX-1, até o momento da cirurgia^{58,59,60}. Atualmente, os AINEs mais utilizados na prática clínica são os derivados acrílicos do ácido propiônico, como o ibuprofeno, dexibuprofeno e flurbiprofeno.

Pacientes que usam Aspirina^R por necessidade de redução da agregação plaquetária podem estar em risco, caso a suspensão seja feita entre 7 e 10 dias do procedimento, com já relatado, em função da inibição irreversível da COX-1 da plaqueta.

Pensando-se na possibilidade de substituição da Aspirina^R por outro AINEs com inibição reversível da COX-1 plaquetária 7 dias antes do ato cirúrgico, o ideal é manter o paciente anticoagulado até as vésperas da cirurgia. Sob esta perspectiva podemos sugerir o uso de ibuprofeno 3 vezes ao dia, iniciando seu uso no sétimo dia antes da cirurgia, em substituição à Aspirina^R. Esta dose encontra fundamentação nos experimentos de Akagi *et al.* (2011)⁵³, que inibiu a liberação de TXB₂, de modo semelhante à Aspirina^R administrada em monodose diária. Além disso, De La Cruz *et al.* (2010)⁶¹ concluíram que AINEs propiônicos podem demonstrar efeito antiplaquetário quantitativamente e qualitativamente semelhante ao da Aspirina^R, podendo ser potenciais substitutos desta⁶⁰: ao testar o ibuprofeno e o dexibuprofeno, do ponto de vista qualitativo, os perfis antiplaquetários são semelhantes aos da Aspirina^R⁶² (Tabela 2).

Sob análise quantitativa, o dexibuprofeno foi a droga

que mais se pareceu à Aspirina^R. O maior efeito do dexibuprofeno, comparado com ibuprofeno e flurbiprofeno podem ser porque dexibuprofeno é o enantiômero S(+)-ibuprofeno, isto é: o dexibuprofeno é um isômero óptico do ibuprofeno. As formas racêmicas são uma mistura de 50% dos enantiômeros S(+) e R(-). Vale destacar que a fração R(-) do dexibuprofeno isoladamente não teve nenhum efeito antiplaquetário e não inibe a atividade da COX-1^{63,64}.

Tabela 2. Média de valores da concentração de Aspirina^R, Ibuprofeno racêmico (Ibuprofeno), Dexibuprofeno e Flurbiprofeno racêmico (Flurbiprofeno) que inibe 50% da agregação máxima de plaquetas em amostras de sangue total (IC₅₀).

	IC ₅₀ (μM)		
	ADP (2,5μM)	Colágeno (1 μg/ml)	Ác. Araquidônico (400 μM)
Aspirina	135 ± 10,1	0,7 ± 0,05	0,4 ± 0,03
Dexibuprofeno	15,4 ± 0,9	0,4 ± 0,02	0,8 ± 0,06
Ibuprofeno	36,1 ± 2,4	29,8 ± 1,1	14,7 ± 1,2
Flurbiprofeno	26,7 ± 1,1	20,2 ± 1,2	6,4 ± 0,5

De La Cruz *et al.* (2010)⁶¹.

Para substituir o uso em monodose da Aspirina^R pelo ibuprofeno, um outro efeito destes AINEs a ser verificado é o de estimular a síntese de óxido nítrico (NO), dada sua correlação com o efeito antitrombótico produzido pela Aspirina^R em humanos^{65,66}.

Plaquetas humanas sintetizam o NO por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que catalisa a oxidação do átomo de nitrogênio do terminal de guanidina da L-arginina para formar L-citrulina⁶⁷. Duas das três isoformas conhecidas da enzima NO-sintase (NOS) encontram-se nas plaquetas: a isoforma endotelial (eNOS, NOS3) e a induzível (iNOS, NOS2)^{68,69}, com predomínio da eNOS. O NO tem importantes propriedades antitrombóticas, incluindo inibição da agregação de plaquetas e da adesão das plaquetas ao endotélio vascular⁶⁹ através da ativação da enzima guanilato-ciclase solúvel e consequente aumento do cGMP. O NO derivado da plaqueta pode também desempenhar um papel importante na regulação tanto do recrutamento de plaquetas quanto da agregação de plaquetas após um estímulo pró-agregante⁷⁰.

De La Cruz *et al.* (2010)⁶¹ e Miyamoto *et al.* (2007)⁷¹ observaram que os derivados arílicos do ácido propiônico também aumentam a produção de NO pela ativação da via constitutiva. Por conseguinte, o efeito do ibuprofeno sobre a síntese de NO é semelhante ao da Aspirina^R, conforme documentado na literatura^{61,71}.

Entretanto, há sólidas evidências^{22,72} documentadas sobre a redução do efeito antiplaquetários da Aspirina^R quando outro AINEs como o ibuprofeno é administrado concomitantemente. Esta redução de eficácia da Aspirina^R é atribuída ao fato da ligação do ibuprofeno com a Arg120 impedir a acetilação da Ser529 pela Aspirina^R⁷³.

4. CONCLUSÕES

Nosso trabalho objetivou subsidiar clínicos e cirurgiões sobre o embasamento farmacológico, relacionado ao uso dos AINEs como fármacos antiagregantes de plaquetas. Mesmo diante dos potenciais problemas associados ao uso de AINEs, ainda hoje, este grupo terapêutico é imprescindível como coadjuvante de inúmeros procedimentos clínicos e cirúrgicos^{74,75}. Sugerimos que o leitor reflita sobre o fato de que na prática, o equilíbrio favorável entre os efeitos benéficos e prejudiciais da terapia antiplaquetária é conseguida com o tratamento de doentes cujo risco trombotico claramente supera o seu risco de sangramento e de complicações²¹. Assim, sugerimos que procedimentos cirúrgicos pequenos, pouco invasivos e com baixo risco de sangramento sejam realizados sem a interrupção da estratégia farmacológica adotada para obtenção da antiagregação de plaquetas.

Entretanto, sugerimos com base na literatura consultada, que existe embasamento farmacológico suficiente para subsidiar clínicos e cirurgiões sobre a possibilidade de pacientes com doenças tromboembólicas substituírem a utilização da Aspirina^R em monodose diária, uma semana antes de procedimentos cirúrgicos, pelo ibuprofeno, três vezes ao dia, até a véspera de cirurgias eletivas em procedimentos cirúrgicos de grande porte, bastante invasivos e com risco de sangramento.

5. FINANCIAMENTO

Agradecemos à Faculdade Ingá, pelo fomento necessário para o desenvolvimento deste estudo.

REFERÊNCIAS

- [1] Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962 a; 194:927–29.
- [2] Born G, Cross MJ. Inhibition of the aggregation of blood platelets by substances related to adenosine diphosphate. *J. Physiol*. 1962; 166:29-30.
- [3] Clayton S, Born GVR, Cross MJ. Inhibition of the aggregation of blood platelets by nucleotides. *Nature (London)*, 1963; 200:138-9.
- [4] O'Brien JR. Effects of salicylates on human platelets. *Lancet*, 1968; 1:779–83.
- [5] Weiss HJ, Aledort LM, Kochwa S. The effect of salicylates on the hemostatic properties of platelets in man. *J Clin Invest*, 1968; 47:2169–80.
- [6] Hawkins D, Pinkard RN, Crawford IP, Farr RS. Structural changes in human serum albumin induced by ingestion of acetylsalicylic acid. *J Clin Invest*, 1969; 48:536–42.
- [7] Bick RL. Alterations of hemostasis associated with cardiopulmonary bypass: pathophysiology, prevention, diagnosis, and management. *Semin. Thromb Hemost* 1976; 3(2):59–82.
- [8] Ferraris VA, Ferraris SP, Lough FC, Berry WR. Preoperative aspirin ingestion increases operative blood loss after coro-

- nary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*, 1988; 45(1):71-4.
- [9] Ferraris VA, Swanson E. Aspirin usage and perioperative blood loss in patients undergoing unexpected operations. *Surg Gynecol Obstet*, 1983; 156(4):439-42.
- [10] Bartlett GR. Does aspirin affect the outcome of minor cutaneous surgery? *Br J Plast Surg*, 1999; 52(3):214-6.
- [11] Ganong LH. Integrative reviews of nursing research. *Res Nurs Health*, 1987; 10(1):1-11.
- [12] Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipp TJ, Seligsohn U, editors. *Williams Hematology*. 6th ed. Columbus(Ohio): McGraw-Hill; 2001.
- [13] George JN, Shatil SJ. The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. *N Engl J Med*, 1991; 324(1):27-39.
- [14] Born GVR, Cross MJ. Effects of inorganic ions and of plasma proteins on the aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate. *J Physiol*, 1964; 170:397-414.
- [15] Cross MJ. Effect of fibrinogen on the aggregation of platelets by adenosine diphosphate. *Thromb Diath Haemorrh*, 1964; 12:524-7.
- [16] Ferreira SH, Moncada S, Vane JR. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from spleen. *Nat. New Biol*, 1971; 231:237-9.
- [17] Vane JR. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biology*, 1971; 231:232-5.
- [18] Smith JB, Willis AL. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat New Biol*, 1971; 231:235-7.
- [19] Hamberg M, Samuelsson B. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973; 70:899-903.
- [20] Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action of prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974; 71:3824-28.
- [21] Patrono C, Coller B, Dalen JE, FitzGerald GA, Fusters V, Gent M *et al.* Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest*, 2001; 119:39S-63S.
- [22] Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Torunier B *et al.* Cyclooxygenase inhibitors and the anti-platelet effects of aspirin. *N Engl J Med*, 2001; 345:1809-17.
- [23] Patrono C, Coller B, Fitzgerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. The seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest*, 2004; 126:234S-264S.
- [24] Armstrong PCJ, Truss NJ, Ali FY, Dhanji AA, Vojnovic I, Zain ZNM, Bishop-Bailey D, Paul-Clark MJ, Tucker AT, Mitchell JA, Warner TD. Aspirin and the *in vitro* linear relationship between thromboxane A₂-mediated platelet aggregation and platelet production of thromboxane A₂. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2008; 6: 1933-43.
- [25] Hennekens CH, Schror K, Weisman S, FitzGerald GA. Terms and conditions: semantic complexity and aspirin resistance. *Circulation*, 2004; 110:1706-8.
- [26] Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest*, 1975; 56:624-32.
- [27] Roth GJ, Stanford N, Majerus PW. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975; 72: 3073-76.
- [28] Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature (London)*, 1976; 263:663-5.
- [29] ISIS-2 Second International Study of Infarct Survival Collaborative Group, *Lancet*, 1988; 2:349-60.
- [30] Patrono C, Ciabattini G, Pugliese F, Pierucci A, Blair IA, Fitzgerald GA. Estimated rate of thromboxane secretion into the circulation of normal man. *J. Clin. Invest.*, 77, 590-594.
- [31] Born GVR, Patrono C. Antiplatelet drugs. *Brit J Pharmacol*, 2006; 147:S241-S251.
- [32] Rogerson KC. Hemostasis for dental surgery. *Dental Clin North Am*, 1995; 39(3):649-62.
- [33] Barbui T, Buelli M, Cortellazo S, Viero P, De Gaetano G. Aspirin and risk of bleeding in patients with thrombocytopenia. *Am J Med*, 1987; 83(2):265-8.
- [34] Pullar T, Capell HA. Interaction between oral anti-coagulant drugs and non-steroidal anti-inflammatory agents: a review. *Scott Med J*, 1983; 28(1):42-7.
- [35] Escolar G, Cases A, Bastida E, Garrido M, Lopez J, Revert L, and others. Uremic platelets have a functional defect affecting the interaction of von Willebrand factor with glycoprotein IIb-IIIa. *Blood*, 1990; 76(7):1336-40.
- [36] Thomason JM, Seymour RA, Murphy P, Brigham KM, Jones P. Aspirin-induced post-gingivectomy haemorrhage: a timely reminder. *J Clin Periodontol* 1997; 24(2):136-8.
- [37] Mannucci PM, Vicente V, Vianello L, Cattaneo M, Alberca I, Coccato MP, and others. Controlled trial of desmopressin in liver cirrhosis and other conditions associated with a prolonged bleeding time. *Blood*, 1986; 67(4):1148-53.
- [38] Deykin D, Janson P, McMahon L. Ethanol potentiation of aspirin-induced prolongation of the bleeding time. *N Engl J Med*, 1982; 306(14):852-4.
- [39] Rosove MH, Harwig SS. Confirmation that ethanol potentiates aspirin-induced prolongation of the bleeding time. *Thromb Res* 1983; 31:525-7.
- [40] Cronberg S, Wallmark E, Soderberg I. Effect on platelet aggregation of oral administration of 10 non-steroidal analgesics to humans. *Scand J Haematol*, 1984; 33(2):155-9.
- [41] Weintraub M, Case KR, Kroening B. Effects of piroxicam on platelet aggregation. *Clin Pharm Ther*, 1978; 23:134-5.
- [42] Schafer AI. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J Clin Pharmacol*, 1995; 35(3):209-19.
- [43] Leese PT, Hubbard RC, Karim A, Isakson PC, Yu SS, Geis GS. Effects of celecoxib, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor, on platelet function in healthy adults: a randomized controlled trial. *J Clin Pharmacol*, 2000; 40(2):124-32.
- [44] Bennett JS. Novel platelet inhibitors. *Ann Rev Med*, 2001; 52:161-84.
- [45] Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, and other. Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A₂ receptor. *Nature*, 1991; 349(6310):617-20.
- [46] Roth GJ, Siok CJ. Acetylation of the NH₂-terminal serine prostaglandin synthetase by aspirin. *J Biol Chem*, 1978; 253(11):3782-4.
- [47] Mills DCB, Robb IA, Roberts GCK. The release of nucleotides, 5-hydroxytryptamine and enzymes from human blood platelets during aggregation. *J Physiol*, 1968; 195:715-29.
- [48] Smith WL, Lands WE. Stimulation and blockade of prostaglandin synthesis. *J Biol Chem*, 1971; 246:6700-04.

- [49] Greig GM, Francis DA, Falguyet JP, Ouellet M, Percival MD, Roy P, Bayly C, Mancini JA, O'Neill GP. *Mol Pharmacol*, 1997;52: 829-38.
- [50] Wynalda DJ, Brooks CD. Inhibition of platelet aggregation by Motrin. *Fed Pros*, 1975; 34:873.
- [51] McIntyre BA, Phllp RB. Effect of three nonsteroidal anti-inflammatory agents on platelet function and prostaglandin synthesis in vitro. *Thromb Res*, 1977; 12:67-77.
- [52] McIntyre BA, Phllp RB, Inwood MJ. Effect of ibuprofen on platelet function in normal subjects and hemophilic patients. *Clin Pharmacol Ther*, 1978; 25:616-21.
- [53] Akagi Y, Nio Y, Shimada S, Aoyama T. Influence of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs on the Antiplatelet Effects of Aspirin in Rats. *Biol Pharm Bull*, 2011; 34(2):233-7.
- [54] Ikeda Y. The effect of ibuprofen on platelet function in vivo. *Keio J. Med*, 1977; 26: 213-22.
- [55] Burger W, Chemnitz JM, Kneissl GD, Rucker G. Low-dose aspirin for secondary cardiovascular prevention: cardiovascular risks after its perioperative withdrawal versus bleeding risks with its continuation—review and meta-analysis. *J Intern Med*, 2005; 257:399–414.
- [56] Ferrari E, Benhamou M, Carboni P, Marcel B. Coronary syndromes following aspirin withdrawal: a special risk for late stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol*, 2005; 45:456–9.
- [57] Sibon I, Orgogozo JM. Antiplatelet drug discontinuation is a risk factor for ischemic stroke. *Neurology*, 2004; 62:1187–9.
- [58] Douketis JD, Berger PB, Dunn AS, Jaffer AK, Spyropoulos AC, Becker RC, Ansell J; American College of Chest Physicians. The perioperative management of antithrombotic therapy: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th edition). *Chest*, 2008; 133:299S–339S.
- [59] Samama CM, Bastien O, Forestier F, Denninger MH, Isetta C, Juliard JM, Lasne D, Leys D, Mismetti P; French Society of Anesthesiology and Intensive Care. Antiplatelet agents in the perioperative period: expert recommendations of the French Society of Anesthesiology and Intensive Care (SFAR) 2001 - summary statement. *Can J Anaesth*, 2002; 49:S26–35.
- [60] Chassot PG, Delabays A, Spahn DR. Perioperative antiplatelet therapy: the case for continuing therapy in patients at risk of myocardial infarction. *Br J Anaesth*, 2007; 99:316–28.
- [61] De La Cruz JP, Reyes JJ, Ruiz-Moreno MI, Lopez-Villodres JA, Jebrouni N, Gonzalez-Correa JA. Differences in the In Vitro Antiplatelet Effect of. *Anesthesia & Analgesia*. 2010 Dec; 111(6):1341-6.
- [62] De La Cruz JP, Camara S, Bellido I, Carrasco T, Sanchez de la Cuesta F. Platelet aggregation in human whole blood after chronic administration of aspirin. *Thromb Res*, 1987; 46:133–40.
- [63] Boneberg EM, Zou MH, Ullrich V. Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by R(-) and S(-)-ibuprofen. *J Clin Pharmacol*, 1996; 368:16S–9S
- [64] González-Correa JA, Arrebola MM, Muñoz-Marín J, Guerrero A, Navas MD, De La Cruz JP. Interaction between S(-)-ibuprofen and R(-)-ibuprofen in type 1 and 2 cyclooxygenase activity in human blood. *Meth Find Exp Clin Pharmacol*, 2006; 28:147-9.
- [65] Lopez Farre A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millas I, Monton M, Casado S. Effect of aspirin on platelet-neutrophil interaction: role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation*, 1995; 91:2080–8.
- [66] De La Cruz JP, Blanco E, Sanchez de la Cuesta F. Effect of dipyridamole and aspirin on the platelet-neutrophil interaction via the nitric oxide pathway. *Eur J Pharmacol*, 2000; 397:35–41.
- [67] Moncada S, Hirai Y. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *J Clin Invest*, 1991; 21:361–74.
- [68] Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 1995; 125:370–7.
- [69] Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. An L-arginine / nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87:5193–7.
- [70] Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol*, 1990; 101:325–8.
- [71] Miyamoto A, Hashiguchi Y, Obi T, Ishiguro S, Nishio A. Ibuprofen or ozagrel increases NO release and l-nitro arginine induces TXA(2) release from cultured porcine basilar arterial endothelial cells. *Vascul Pharmacol*, 2007; 46:85–90.
- [72] Sohn S, Kwon K, *Pediatr. Cardiol*, 2008; 29:153-6.
- [73] Loll PJ, Picot D, Garavito RM, *Nat Struct Biol*, 1995; 2:637-43.
- [74] Montenegro MA, Palomino H. Induction of cleft palate in mice by inhibitors of prostaglandin synthesis. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 1990;10(1):83-94.
- [75] Sylaidis P, O'Neill TJ. Diclofenac analgesia following cleft palate surgery. *Cleft Palate Craniofac J*, 1998 Nov;35(6):544-5.

