

COMUNICACION CORTA

EFECTO DEL LOBENZARIT EN LA CONCENTRACION DE GLUTATION REDUCIDO EN HOMOGENATO DE HIGADO DE RATON

D. Remirez, C. Pascual, R. González, N. Frutos y J. Armesto

Departamento de Diagnóstico y Biomedicina, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cub.

RESUMEN. El Lobenzarit (Lb) es un medicamento antiartrítico que también inhibe la hepatotoxicidad aguda inducida por el paracetamol en ratones e incrementa la concentración de glutatión reducido en el hígado. Utilizando homogenato de hígado de ratón quedó demostrado que concentraciones crecientes del Lb inducen un incremento proporcional en la transformación del glutatión oxidado en reducido. Este efecto se produce también en homogenato desalinizado que contiene NADPH además del glutatión oxidado, constituyendo una fuerte evidencia de que el Lb ejerce su efecto mediante la activación de la enzima glutatión reductasa lo que también se demuestra

ABSTRACT. In the present paper were performed additional studies on the mechanism of action of Lobenzarit (Lb), this drug has antiarthritic properties and also inhibits the acute hepatotoxicity induced by paracetamol in mice and increases the concentration of reduced glutathione in liver. Using homogenic mouse liver, it has been demonstrated that the increase of Lb concentrations provoke a proportional augment in the transformation of oxidized glutathione (GSSG) in reduced glutathione (GSH). This effect is also produced in desalinized homogenic compound which contain NADPH and GSSG. It provides strong evidence that Lb exerts its effect through the activation of the enzyme glutathione reductase, which is also demonstrated.

El Lb es un medicamento sintético con propiedades inmunomoduladoras, lo que ha propiciado su introducción exitosa en el tratamiento de la artritis reumatoidea.^{1,2} Este producto además de presentar propiedades como antioxidante³ inhibe también la hepatotoxicidad inducida por el paracetamol en ratones al provocar un incremento de la concentración de glutatión reducido en el hígado de estos roedores.⁴ El objetivo de este trabajo consistió en confirmar si estos efectos in vivo se producen también in vitro en homogenatos de hígado de ratón y además evaluar la hipótesis de que el mecanismo de acción del Lb es a través de la activación de la glutatión reductasa, enzima que convierte el glutatión oxidado en reducido

nato total y desalinizado por columna de Sephadex G-10 previa centrifugación a 4000 r/min 30 min a 4°C.

Muestras de 1 mL fueron incubadas durante 10 min a 37°C en las condiciones siguientes: H₂O + GSSG, Lb + GSSG, Lb + FAD⁺ + GSSG, FAD⁺ + GSSG, Lb + NADPH + GSSG, y NADPH + GSSG; utilizando 0,43 mg/mL de Lb; 33 mmol/L de GSSG; 0,78 mmol/L de FAD⁺ y 0,83 mmol/L de NADPH.

Se determinó el efecto de las distintas concentraciones de Lb sobre la transformación de GSSG en GSH; mediante la incubación de 1 mL del homogenato total y del desalinizado a 37 °C durante 60 min con GSSG 33 mmol/L y Lb a las concentraciones de 0; 0,086; 0,21; y 0,86 mg/mL.

Una vez terminadas las incubaciones, se determinó la concentración de GSH por el método de Beutler⁵ con algunas modificaciones. Se añadió a la mezcla de reacción 1,5 mL de de solución precipitante, se dejó 5 min en reposo, se filtró; y a 2 mL de Na₂HPO₄ 0,3 mol/L se le añadió 0,5 mL del filtrado. Posteriormente se le adicionaron 250 uL de DTNB (0,505 mmol/L), y se determinó la absorbancia a 412 nm contra un blanco reactivo empleando un equipo Spekol 220 de la Carl Zeiss Jena. Los resultados se expresaron en mol/g de hígado.

Además, se determinó la actividad específica de la enzima glutatión reductasa por el método de Smith y col.⁶

Reactivos y drogas

El Lb disódico utilizado en el estudio fue obtenido por el Laboratorio de Síntesis Orgánica del Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Los demás reactivos procedieron de fuentes comerciales regulares.

Tratamiento animal y preparación de la muestra. Se emplearon ratones (30 a 35 g) a los cuales se les extrajo el hígado. Dieciocho horas antes de la remoción del órgano, los animales fueron privados del alimento, recibiendo sólo agua ad-libitum.

El hígado fue homogenizado 1:5 (P/V) en solución de KCl fría 0,15 mol/L en un homogenizador Potter Elvehøj; se utilizó homoge-

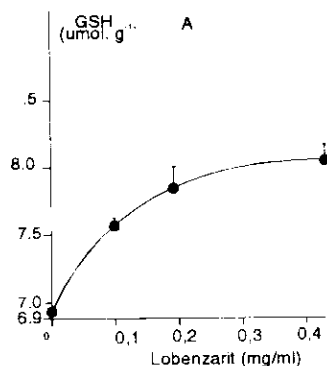


Fig 1. Efecto de la concentración del Lb sobre la transformación de GSSG en GSH sin desalinizar (A)

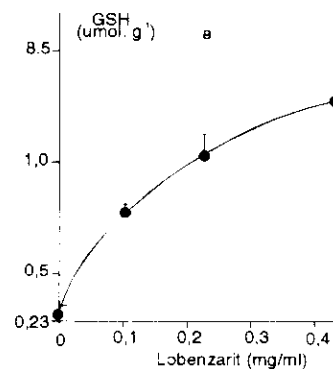


Fig 1. Efecto de la concentración del Lb sobre la transformación de GSSG en GSH desalinizado (B). Cada punto representa el valor de la media de tres experimentos + desviación estándar.

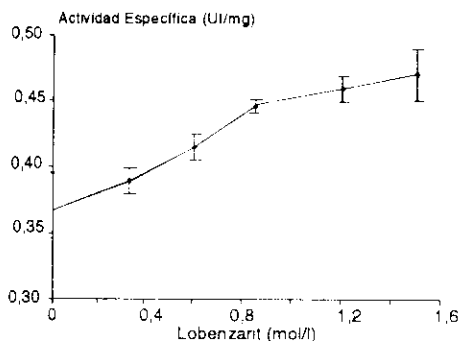


Fig 2. Efecto de la concentración del Lb sobre la actividad específica de la enzima glutatión reductasa en homogenato de hígado de ratón. Cada punto representa el valor de la media de tres experimentos desviación estandar

Para la valoración de los resultados se realizó un análisis de varianza de clasificación simple con un diseño completamente aleatorizado ($p,05$) y las medias fueron comparadas con el test de comparaciones múltiples (Duncan) ($p<0,05$).

Con el aumento de la concentración de Lb en el homogenato se incrementó proporcionalmente la formación de GSH a partir de GSSG (Fig.1) tanto en la muestra no desalinizada (Fig.1A) como en la desalinizada (Fig.1B). Como consecuencia de la desalinización, la concentración inicial de GSH resultó menor para este tipo de muestra. No obstante, el incremento de GSH provocado por la adición de 0,43 mg/mL de Lb fue prácticamente el mismo para ambos tipos de muestras, siendo del orden de 1,15 mol/g de hígado.

Estos resultados indicaron que el Lb desempeñó un papel fundamental a nivel de la enzima glutatión reductasa que es la responsable de transformar al GSSG en GSH. Debido a que esta enzima utiliza como cofactor NADPH y en algunas especies el FAD^+ puede actuar como activador, se evaluó el efecto del Lb sobre la transformación de GSSG en GSH en presencia de NADPH y FAD^+ en homogenato de hígado de ratón.

La Tabla I muestra los resultados de la determinación de la concentración de GSH expresados en mol/g. Cada valor representa la media del ensayo por triplicado desviación estandar $p < 0,05$ entre a y b a y c. $p < 0,01$ entre d y e d y f e y f. Esto evidenció que la adición del NADPH (0,83 mmol/L) en el homogenato total y el desalinizado provocó incremento de la conversión del GSSG en GSH, no ocurriendo así, con la adición del FAD^+ (0,78 mmol/L). Efectivamente, cuando al homogenato desalinizado que contenía GSSG se le añadió NADPH (Tabla I) se produjo un aumento de GSH debido a la actividad enzimática de la glutatión reductasa. La adición de Lb en este sistema provocó un incremento aún mayor en la concentración de GSH.

En la muestra no desalinizada el pequeño incremento provocado por el Lb, posiblemente se debió a que esta muestra contenía niveles basales superiores, tanto de GSH como de NADPH.

La adición de FAD^+ (Tabla I) provocó incrementos similares a los que provocó el Lb cuando se le añadió respectivamente, a muestras que contenían GSSG, tanto desalinizadas como no desalinizadas.

TABLA I

Influencia de la adición de FAD^+ el NADPH sobre la transformación de GSSG en GSH

| Muestra | Lb + NADPH | NADPH H ₂ O | Lb | Lb + FAD^+ | FAD^+ | |
|--------------|-------------------|------------------------|-------------------|--------------|-------------------|-------|
| +GSSG | +GSSG | +GSSG | +GSSG | +GSSG | +GSSG | +GSSG |
| Homeogenato | 3,5 | 0,5 | 4,35 ^a | 0,4 | 4,45 | 0,4 |
| Total | 5,24 ^c | 0,4 | | | 4,95 | 0,2 |
| Desalinizado | 0,75 | 0,2 | 1,32 ^d | 0,3 | 1,15 | 0,3 |
| | | | | | 9,22 ^e | 0,2 |
| | | | | | 5,48 ^f | 0,1 |

Se encontró una dependencia directa entre la concentración de Lb y la actividad específica de la enzima glutatión reductasa, cuestión que evidenció la activación de la glutatión reductasa por el Lb in vitro. Esto ha sido confirmado más recientemente, en experimentos in vivo en los cuales el Lb incrementó significativamente la actividad previamente disminuida de esta enzima por el paracetamol.⁷

Ha quedado demostrado que el mecanismo por el cual el Lb aumenta la transformación de GSSG en GSH está basado en la activación de la enzima glutatión reductasa por el fármaco.

BIBLIOGRAFIA

- Shiokawa Y., Horluchi Y., Mizushima Y., Kageyama T., Shichikawa K., Ohful T., Honma M., Yoshizawa H., Abe C., and Ogawa N. *J. Rheumat.* 11, 615 1984.
- Ohsugi Y., Nakano T., Ueno K., Fuku H., Niki R., Sugawara Y., Hata S. *Int. J. Immunotherapy* 1, 85, 1985.
- Cynsh O., Saitoh M., Cynshi F., Tanemura M., Hata S. and Nakano M. *Biochemical Pharmacology* 4, 2117, 1990.
- González R., Pascual C., Ancheta O., Carreras B., Ramirez D. and Pellón R. In: *Agents and Action* 37, 114-120, 1992
- Beutler E., In: *Red Cell Metabolism. A manual of Biochemical Methods*, 103-105, Grune and Stratton, New York, 1971.
- Smith I., Vierheller T., and Thome C., *Analytical Biochemistry* 175, 408, 1988.
- Carreras B, González R. y Pascual C. *Tesis de Diploma. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, 1990.*