

Efecto de glutatión encapsulado en niosomas y glutatión libre en la intoxicación con acetaminofeno en gatos

Denzoin Vulcano, Laura A.

Área de Patología General y Área de Toxicología. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. Paraje Arroyo Seco, Tandil, Argentina
laura@vet.unicen.edu.ar

El gato doméstico, *Felis catus*, es un hipercarnívoro que se alimenta exclusivamente de proteína animal. Existe una relación directa entre la dieta y la evolución de las enzimas participantes en los procesos metabólicos por lo cual esta especie presenta deficiencias para los procesos de biotransformación resaltando como los más evidentes la glucuronoconjugación, metilación, hidroxilación, sulfoconjugación y conjugación con glutatión. Un ejemplo de estas particularidades es la lenta glucuronoconjugación del acetaminofeno en el gato doméstico, ya que la isoenzima UDP glucuronosiltransferasa 1A6 (UGT1A6) no se expresa en el hígado felino como resultado de múltiples mutaciones inactivantes sobre el gen que la codifica, dando lugar a un defecto de especie para el metabolismo de drogas.

En la mayoría de las especies, el acetaminofeno es metabolizado predominantemente por conjugación por ácido glucurónico y conjugación por sulfato. Un porcentaje de acetaminofeno es oxidado por el citocromo P-450 produciendo N-acetil p-benzoquinonaimina que se conjuga con GSH (glutatión) y es eliminado por orina como conjugados del ácido mercaptúrico. Los gatos tienen una limitada capacidad para metabolizar el acetaminofeno por glucuronoconjugación. El resultado es una elevada presentación de acetaminofeno a la vía oxidativa de citocromo P-450 que induce la formación del metabolito electrofílico, altamente reactivo, N-acetil p-benzoquinonaimina (NAPQI). Este metabolito, posee características electrofílicas que le permiten establecer aductos con las macromoléculas celulares provocando daño hepático y formación de metahemoglobina, la cual se produce en el gato por la abundancia de grupos tioles de la hemoglobina felina que la hace particularmente sensible al daño oxidativo.

El GSH es una molécula central en la homeostasis celular y una de sus funciones es la detoxificación de sustancias electrofílicas, entre ellos el metabolito reactivo NAPQI. Su uso para

el tratamiento de la intoxicación con acetaminofeno se encuentra limitado por su corta vida libre en plasma una vez que es administrado por vía endovenosa. La encapsulación del compuesto en nanovesículas de surfactante no iónico (NIOSOMAS), representa una alternativa para proteger la molécula de degradación plasmática y para favorecer su acumulación en hígado, permitiendo la inactivación del metabolito NAPQI.

En esta tesis se establecieron los valores fisiológicos de GSH, GSSG (glutatión oxidado) y GSht (glutatión total) en plasma, eritrocito e hígado que no estaban establecidos para el gato. Los valores encontrados en plasma (μM) fueron $4,50 \pm 0,98$ (GSH); $23,86 \pm 3,85$ (GSht) y $9,68 \pm 3,89$ (GSSG). En eritrocito, los valores (mM) fueron de $1,54 \pm 0,46$ (GSH); $2,87 \pm 0,88$ (GSht) y $0,66 \pm 0,36$ (GSSG). Para el hígado los valores (nM/mg de proteína) encontrados fueron de $34,58 \pm 15,10$ (GSH); $57,66 \pm 25,20$ (GSht) y $11,54 \pm 8,45$ (GSSG). El dato más significativo es que GSSG está presente en concentraciones más elevadas que GSH en plasma, contrariamente a lo que ocurre en otras especies, poniendo en evidencia que fisiológicamente en el gato existe una rápida oxidación de GSH a GSSG en el plasma como posteriormente se determinó en los ensayos realizados *in vitro*.

Se desarrolló una metodología para la encapsulación de GSH en NIOSOMAS. Estas vesículas se forman por la agregación de las moléculas de surfactante no iónico en un medio acuoso: las moléculas anfífilicas se orientan formando una bicapa que tiende a cerrarse sobre sí misma formando vesículas. La formación de las vesículas no es espontánea y requiere del agregado de energía en la forma de agitación o calor. Se ensayaron tres metodologías y diferentes proporciones de los componentes estructurales de las vesículas. Se obtuvieron vesículas con una relación Span 60/Colesterol/DCP, 67,5: 27,5:5 por el método de agitación sonicación que presentaron un porcentaje de atrapamiento

del 49,9% que fue considerado apto para los ensayos *in vivo*. Estas vesículas presentaron un tamaño de 422 nm. Los ensayos en animales de laboratorio mostraron buena tolerancia a la perfusión endovenosa.

Los estudios de farmacocinética de GSH libre (200 mg/kg y 13,66 mg/kg en cloruro de sodio al 0,9%) y GSH niosomal (13,66 mg/kg en cloruro de sodio al 0,9%) permitieron conocer el comportamiento plasmático-metabólico de estos compuestos. La dosis de GSH niosomal presentó una vida media de 58 minutos, duplicando la vida media de la misma dosis administrada en forma libre, como así también la vida media de la dosis de 200 mg/kg, permitiendo mantener niveles plasmáticos por encima del valor basal durante más tiempo. La dosis niosomal administrada vía intravenosa provocó un incremento significativo de la concentración de GSH en hígado y eritrocito con respecto a ambas dosis de la forma libre. El tratamiento con GSH a 200 mg/kg aumentó la concentración de GSH eritrocitario y hepático y permitió alcanzar concentraciones terapéuticas en plasma.

Se evaluó la respuesta de tres tratamientos GSH libre (200 mg/kg), GSH niosomal (13,66 mg/kg) y aminoácidos (180 mg/kg de N-acetilcisteína y 280 mg/kg de metionina) en animales intoxicados con acetaminofeno (Dosis tóxica: 150 mg/kg). Tanto el tratamiento con GSH libre (200 mg/kg) como el tratamiento con GSH niosomal en dosis de 13,66 mg/kg fueron efectivos para disminuir la hepatotoxicidad y la toxicidad hemática en gatos. Si bien ambas formulacio-

nes fueron efectivas, el grupo tratado con GSH (200 mg/kg) tuvo una menor formación de metahemoglobina y se estableció una mayor concentración de GSH en plasma, lo cual hace a este tratamiento más efectivo para la disminución de la metahemoglobina. El mecanismo de acción de GSH puede ser explicado por un doble efecto, por un lado inactivando NAPQI formada en las primeras horas de la intoxicación o fase metabólica y por otro lado, un efecto sobre la inactivación de las especies reactivas mitocondriales formadas en la fase postmetabólica de la intoxicación y que son las responsables de la amplificación del daño hepatocelular. El tratamiento con GSH niosomal agrega a estos efectos hepatoprotectores mencionados anteriormente un tercer efecto producto de la acumulación de las vesículas en las células Kupffer activadas por productos liberados durante la muerte de los hepatocitos. Producto de esta activación se produce la liberación de especies reactivas y óxido nítrico. GSH acumulado en estas células inactivaría estas especies reactivas lo cual explicaría el mayor efecto hepatoprotector de la formulación niosomal. Surge entonces el desarrollo potencial de una terapia combinada con niosomas y GSH libre, superadora de las terapias actualmente usadas.

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

Director: Alejandro L. Soraci

Codirectora: M. Ofelia Tapia