

Evaluación toxicológica de la L-Glutamina

Toxicological evaluation of L-Glutamin

Yamirka Alonso Geli¹; Yamisleydi Alonso Moreno¹; Grisel del Toro García¹; José E. Falcón Dieguez¹; Yoagne Trapero Quintana¹; Isbel Guerra Sardiñas².

¹ Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente. Cuba.

² Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Cuba

RESUMEN

Se ha estudiado las propiedades antidrepanocítica de la L-glutamina como complemento en el tratamiento de la anemia drepanocítica, enfermedad muy frecuente en el mundo para la que aún no existe tratamiento efectivo. En el presente trabajo se realizó un estudio de actividad hemolítica de la L-Glutamina sobre eritrocitos normales y SS mediante la determinación del por ciento de hemólisis a relaciones molares hemoglobina: L-glutamina (1:1, 1:4, 1:8 y 1:10) empleando una técnica espectrofotométrica; se realizó además un test de clasificación toxicológica según la guía de la Organización para el Desarrollo y cooperación Económica (OECD) a la dosis de 2000 mg/kg en ratas wistar (3 hembras y 3 machos); se les administró el vehículo a otro grupo empleado como control. Se buscó la presencia o no de síntomas y signos clínicos, las variaciones de peso de los animales antes y después del tratamiento y se realizó la necropsia al finalizar el test. En el estudio de la actividad hemolítica no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las medias de cada relación molar en ningún tipo de células por lo que no hay dependencia entre la hemólisis y la concentración. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la hemólisis entre células normales y SS. En el test de clasificación no se observaron signos ni síntomas de toxicidad a la dosis empleada; en el análisis macroscópico de los órganos no se observaron alteraciones patológicas y no hubo variaciones de peso entre el grupo experimental y el control, por lo que la L-Glutamina según la guía de la OECD es una *Sustancia No Clasificable*.

Palabras clave: L-Glutamina, anemia drepanocítica, toxicidad aguda oral, actividad hemolítica.

SUMMARY

The antidrepanocytic properties of L-glutamine as a complement in the treatment of drepanocytic anemia, a very common disease in the world for which there is no effective treatment yet, were studied. A study of the hemolytic activity of L-Glutamine on normal erythrocytes and SS was conducted by the determination of the percent of hemolysis at molar ratios of haemoglobin to L-glutamine (1:1, 1:4, 1:8 and 1:10) by using a spectrophotometric technique. A test of toxicological classification was also made according to the guide of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) at a dose of 2000 mg/kg in Wistar rats (3 females and 3 males). The vehicle was administered to other group used as control. The presence or not of symptoms, clinical signs, and variations of weight of the animals before and after treatment were searched. Necropsy was performed at the end of the test. In the study of hemolytic activity, no significant differences ($p < 0.05$) were found among the means of every molar ratio in any type of cells, so there was no dependence between hemolysis and concentration. No statistically marked differences ($p < 0.05$) were found in the hemolysis between normal cells and SS. In the classification test, neither symptoms nor signs of toxicity were observed at the dose used. No pathological alterations were detected in the macroscopic analysis of the organs, and there were no weight variations between the experimental and the control group. Therefore, L-Glutamine according to the guide of the OECD is a Non Classifiable Substance.

Key words: L-Glutamine, drepanocytic anemia, acute oral toxicity, hemolytic activity.

INTRODUCCIÓN

L-Glutamina de fórmula molecular $C_5H_{10}N_2O_3$ es uno de los 20 aminoácidos que constituyen las proteínas en mamíferos, es el más abundante y participa en más procesos metabólicos que cualquier otro, aunque no es un aminoácido esencial. Se ha empleado como aditivo alimenticio, en la suplementación deportiva, en tratamientos post-operatorios, etc.^{1,2} También ha sido estudiado por sus propiedades antidrepanocítica; Rumen N.M. en 1975, demostró que la L-glutamina disminuye la afinidad de la hemoglobina por el CO independientemente de la presencia o no de 2,3 DPG, disminuye el grado de deformación de los eritrocitos SS desoxigenados aunque el efecto se revierte paulatinamente y caduca en 4 o 5 días; ³ otros autores han demostrado que a pesar de los cambios morfológicos apreciados en los eritrocitos SS en presencia de este aminoácido, la elasticidad de la membrana de estos no es recuperada.⁴ Por otra parte, se ha demostrado que los glóbulos rojos deformados tienen una disminución en la $NAD^+/NADH$ (Sup. + +NADH); como la L-glutamina esta involucrada en el último paso de la síntesis de NAD, un aumento en la disponibilidad *in vivo* puede explicar el mecanismo principal para la elevación de la concentración de NAD en los glóbulos deformados , lo que da la posibilidad de que este aminoácido pueda inhibir la falciformación de los eritrocitos en la anemia Drepanocítica (AD).⁵

La AD fue la primera enfermedad de origen molecular descubierta, tiene una alta incidencia a nivel mundial y en nuestro país (fundamentalmente en Ciudad de la Habana, Guantánamo y Santiago de Cuba),⁶ constituye además un problema de salud y un problema social a nivel nacional. No se ha encontrado aún un tratamiento efectivo para combatirla;^{7,8} de ahí la importancia de estas investigaciones que conducen a la evaluación de este compuesto como candidato a fármaco, por la cual nos proponemos la realización de estudios de actividad hemolítica y test de clasificación toxicológica que avalen su uso en el tratamiento de esta patología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos: Etanol (ALFA AESAR); heparina sódica (SIGMA); NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ y Na₂CO₃ (Panreac); L-glutamina (SIGMA); soluciones Drabkin (Imefa).

Equipamiento: Centrifuga Tehtnica LC-320c, Balanza electrónica ER-182A, Espectrofotómetro ULTROSPEC III y monitor de pH Pharmacia LKB.

Determinación de actividad hemolítica

Para evaluar la actividad hemolítica de los compuestos descartando la influencia de las propiedades intrínsecas de los eritrocitos SS se realizaron todas las pruebas simultáneamente en eritrocitos normales. Las muestras de sangre procedentes de pacientes con hemoglobinopatía SS y de donantes voluntarios supuestamente sanos fueron tomadas en el Laboratorio Clínico del Hospital General Santiago, Santiago de Cuba.

Preparación de las muestras

La sangre total heparinizada se centrifugó a 3000 r.p.m, durante 10 min.; se desplasmatizó y el precipitado celular fue sometido a tres lavados consecutivos con PBS pH=7.4 para obtener el concentrado de eritrocitos lavados y se calculó la concentración de hemoglobina por el método de la cianometahemoglobina.^{9,10} Se prepararon las soluciones para el ensayo a las relaciones molares hemoglobina: L-glutamina (1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:8, 1:10)⁷ utilizando tampón PBS a pH 7.4 como disolvente.

Procedimiento experimental

Se estudiaron las razones molares hemoglobina:L-Glutamina 1:1, 1:4, 1:8, 1:10. Como control positivo se utilizó una solución 0.1 % de Na₂CO₃ y como control negativo PBS pH 7.4.¹¹

Se tomó 1 mL del concentrado de eritrocitos y se resuspendió en 10 mL de PBS pH=7.4. Para la evaluación de los compuestos se utilizaron 0.2 mL de solución de eritrocitos a los que se le adicionaron 10 µL de la solución de cada compuesto y se completó el volumen a 10 mL con PBS pH 7.4. Como control positivo se emplea una solución de NaCO₃ al 0,1% y como control negativo se tomaron PBS pH7.4. Se realizaron 5 ensayo y por cada ensayo se realizaron tres réplicas de cada relación molar.

Una vez añadido el compuesto se mezclaron cuidadosamente las muestras y se dejaron reposar 10 min., posteriormente se centrifugaron a 3 000 r.p.m durante 10

min. A temperatura ambiente; y se evaluó el sobrenadante midiendo la absorbancia a la longitud de onda $\lambda = 545$ nm. Se calculó el por ciento de hemoglobina liberada o porcentaje de hemólisis (%H) a partir del valor medio de las mediciones de la absorbancia por réplica para cada una de las relaciones molares según la fórmula:

$$\%H = \frac{\text{Abs(Muestra)}_{540\text{nm}}}{\text{Abs(Control)}_{540\text{nm}}} \times 100$$

Los valores obtenidos se graficaron en Microsoft Excel 97, se obtuvieron las curvas de actividad hemolítica por razón molar y la curva promedio para cada prueba. Se compararon las medias (Statgraphics Plus 2.1) con el test de rangos múltiples y el análisis de varianza simple (ANOVA) para un 95% de confiabilidad.

Test de Clasificación ¹²

El estudio de toxicidad aguda oral se realizó según la guía 423 de la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica (OECD), ¹² cumpliendo con las normas éticas descritas por la Organización Mundial de Salud (OMS), por el Consejo Internacional para la Ciencia de animales de laboratorio (ICLAS) para el uso de animales de experimentación, ¹³ las guías de Buenas prácticas de Laboratorio ¹⁴ y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Laboratorio de Investigaciones Biológicas del Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). ¹⁵

Procedimiento experimental

La solución a administrar se preparó a una concentración de 2000 mg/mL empleando L-glutamina (SIGMA), la cual es soluble en agua a 20°C. Se pesaron 5g de L- glutamina y se le adicionaron 25 mL de agua, se agitó hasta formar una solución homogénea.

Se utilizaron 12 ratas Wistar, 6 Hembras (H) y 6 Machos (M) (colonia CIDEM Ciudad de la Habana), adultas jóvenes entre los 42 y 50 días y un peso entre los 150-200 gr. Se mantuvieron en cuarentena durante 7 días, a temperatura de 20 ± 2 °C, humedad relativa del 55% y con ciclo luz/oscuridad 12:12 y se marcaron con ácido pícnico antes de iniciar el estudio. La alimentación, a base de ración peletizada y agua a voluntad, se le retira la noche anterior a la administración y se esperan 3 horas (h) para reanudar su suministro. Al grupo tratado se les administró una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal (p.c) mediante intubación intragástrica, y un factor de volumen/peso de 0.01 mL/g, en iguales condiciones se administró el grupo control. ^{15, 16}

Los animales se pesaron los días 0, 7 y 14 y la observación de los signos y síntomas clínicos se realizó constantemente durante las primeras 24 horas, y diariamente por un período de 14 días. Al finalizar este período se procedió al sacrificio bajo atmósfera de éter, se les realizó la autopsia y examen macroscópico de órganos y tejidos en busca de alteraciones patológicas. Los órganos evaluados fueron: corazón, hígado, pulmón, riñón, bazo, estómago e intestino. ^{17, 18}

Se le realizó el procesamiento estadístico de la variación de peso de los animales mediante un test de comparación de medias de los valores de peso del grupo experimental y control para un nivel de significación $p < 0,05$ en el programa Statgraphics plus 2.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad hemolítica

Se calcularon los valores de % de hemólisis para cada relación molar hemoglobina:L-glutamina por ensayo en individuos no drepanocíticos y pacientes drepanocíticos respectivamente. El cálculo se realizó a partir del valor medio de las mediciones de la absorbancia de las réplicas en el test de actividad hemolítica.

En el caso de los ensayos con muestras de individuos no drepanocíticos se obtuvieron valores de % de hemólisis inferiores al 1%. Se realizaron los correspondientes test estadístico utilizando el Statgraphics Plus 2.1 y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre relaciones molares, empleando el procedimiento de comparación múltiple (método de Duncan) para un 95% de nivel de confianza, lo que nos permite afirmar que no hay dependencia entre los valores de % de hemólisis observados y la concentración del compuesto.

En el caso de los ensayos con muestras de sangre de pacientes drepanocíticos el % de hemólisis alcanza el máximo valor de 1 %.

Los datos obtenidos se representaron gráficamente, usando el Microsoft Excel 97, y se obtuvieron las curvas de actividad hemolítica por relación molar ([figura 1](#)).

Puede observarse que el comportamiento en ambos tipos de células es similar, no se observó dependencia entre el % de hemólisis y la concentración de la L-glutamina ; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para un 95% de confianza entre las medias para cada relación molar en ninguno de los dos tipos de células.

Una de las principales manifestaciones clínicas de la AD es la anemia hemolítica crónica, por lo que hay que tener en cuenta que, compuestos que exacerben la hemólisis o modifiquen las propiedades reológicas de la sangre, tendrán una marcada incidencia negativa en la evolución de la enfermedad; estos factores han sido considerados al estudiar el efecto hemolítico de la L-Glutamina

En general se obtuvieron % de hemólisis tanto en eritrocitos de pacientes drepanocíticos como en individuos no drepanocíticos inferiores al 10 %, que es el valor máximo permisible tomado como referencia para afirmar que un compuesto con actividad biológica sea considerado inocuo en este sentido, teniendo en cuenta las características propias de la enfermedad.

Al comparar los resultados obtenidos en eritrocitos de pacientes drepanocíticos e individuos no drepanocíticos, se obtuvieron resultados similares a pesar de que los eritrocitos SS son más frágiles y rígidos que los normales, por estar sometidos a cambios intracorporales que causan pérdida de su elasticidad,^{19,20} lo que demuestra que el efecto de la L-glutamina corresponde a una hemólisis basal.

Los resultados mostrados sugieren la ausencia de efectos citotóxicos de este compuesto antidrepanocítico sobre los eritrocitos, su blanco de acción farmacológica.

Toxicidad aguda oral

El comportamiento del peso corporal durante los 14 días del estudio se muestran en la [figura 2](#). Se pudo observar en un análisis comparativo del peso corporal entre el grupo estudio en la dosis de 2000 mg/kg PC y el control que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$), correspondiéndose con lo que se reportado por literatura de que los animales con edades comprendidas entre las 42 y 50 semanas aumentan de peso progresivamente. ¹⁶ Los datos referentes al peso corporal poseen una gran sensibilidad para detectar alteraciones debidas a productos químicos de baja toxicidad, es uno de los indicadores que mayor información ofrecen en los estudios toxicológicos. ²¹

Al administrar L-Glutamina no se observaron síntomas ni signos clínicos de alteraciones patológicas y no se presentó mortalidad en el período de observación para la dosis de 2 000 mg/kg la cual se consideró límite para este tipo de estudio, se observó un comportamiento normal en las ratas para la especie; los resultados se corresponden con los reportados por Castell L.M en 1997, que planta que a dosis elevada no se ha encontrado toxicidad en la suplementación con L-glutamina. ²²

En la autopsia no se encontraron evidencias de alteraciones patológicas en los órganos analizados, los cambios observados en todos los animales fueron atribuidas a artefactos originados en el sacrificio de los animales.

Las manifestaciones clínicas determinan la presencia de daños en los órganos y tejidos que alteran las funciones de los mismos y dependen en gran medida de factores como la dosis, el tiempo de exposición, la edad del animal y de forma general el estado de salud.

Las observaciones clínicas después de la administración de la L-glutamina sugieren a la ausencia de efectos tóxicos durante el tiempo de duración del ensayo a la dosis de 2000 mg/kg de peso corporal, por lo que no fue necesario ensayar dosis inferiores.

CONCLUSIONES

- La L-glutamina no presenta efectos citotóxicos sobre eritrocitos en las condiciones experimentales del estudio.

- Según la guía de la OECD se incluye la L-glutamina en la categoría de sustancia *no clasificada* a la dosis de 2000 mg/kg de peso corporal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ziegler T. Safety and metabolic effects of L-Glutamine administration in humans. J. Parent and Ent. Nutr. 1990; 14(4), 13-16.
2. Haussinger D, Coth E., Lang F., Gerok W. Cellular hidration state: an important determinant of protein catabolism in health and disease. The Lancet 1993; 341,1330-32.
3. Rumen N.M. Inhibition of sickling in erythrocytes by amino acids. Blood 1975; 45(1), 225-230.
4. Sirahama K., Kuboto S. y Tsi yang J. Do amino acids reverse the sickling of erythrocytes containing hemoglobin S?. Hemoglobin 1980; 4(2), 149-155.

5. Niihara N., Yukaka Z., Charles R., Tanaka Kouichi R. L-glutamine therapy for sickle cells diseases and talasemia. United States Patent 5693671, 1997.
6. Espinosa E. M. La anemia de pranáocítica en Cuba. Experiencia de 30 años. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia 1996; 12(2), 97-105.
7. Del Toro G., Falcón J.E., Alonso Y., Valdés Y. C., Cabal C. A. Vainillina: agente inhibidor de la polimerización de la hemoglobina S. Bioquímica 2003, 28(4), 4-10.
8. Del Toro G. La Anemia Drepanocítica: Orígenes, Distribución Geográfica y Fisiopatología. Inhibición de la polimerización de la hemoglobina S y la falciformación de los glóbulos rojos. Monografías de Excelencia 2001; ISBN: 959-207-012-1.
9. Fernández A., Falcón J.E., Del Toro G., Pozo A. R. Caracterización de los buffer fosfatos utilizados en la preparación de solución de hemoglobina a pH controlado. Rev Cubana Quím. 2001; 13 (3), 87-96.
10. Del Toro G., Falcón J.E., Alonso Y. Estudio de la actividad hemolítica del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído en hematíes SS. Rev Cubana Farm. 2002; 36 (Suplemento Especial 1), 54-54.
11. Stanley H.R. Toxicity testing of dental materials 1985. (1st ed). Boca Ratón. CRC Press.
12. OECD. Guidelines for testing of chemical. 423: acute oral toxicity-acute toxic class method, 2001.
13. Guidelines for Breeding and Care of Laboratory Animals World Health Organization and International Council for Laboratory Animals Science (ICLAS), 1998.
14. Food and Drug Administration, Good Laboratory Practice for non clinical laboratory studies 1997; Title 21 Code of Federal Regulations Subchapter A, Part 58.
15. Procedimientos Normalizados de Trabajo del Laboratorio de Investigaciones Biológicas del CIDEM, 2004.
16. Hayes W. Principles and Methods of Toxicology. 3ra ed. Raven Press. New York, 1994.; 864-867.
17. Guyton A, Hall J. Tratado de Fisiología Médica. Edición Interamericana. McGraw-Hill,; 1998; 835-48.
18. Repetto M. Toxicología Fundamental. 3ra Ed. Editorial Científico - Médica. Barcelona. España, 1998; 320.
19. Eaton W.A., Hofrichter J. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. Blood 1987; 70,1245-66.
20. Milner PF. Los trastornos drepanocíticos. Clínica Hematológica. Hemoglobinas anormales 2/2. Barcelona, Salvat;: 1976; 72-107.

21. Mosberg AT, Hayes WA. Subchronic toxicity testing En: Principles and methods of toxicology 1989; 2da. Ed, editado por A Wallace Hayes. Raven Press, Ltd; New York.

21. Castell L.M., Newsholme E.A. The effects of oral Glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. University Department of Biochemistry Oxford U.K, 1997; 13(7-8), 738-742.

Recibido: 2 de julio del 2007.

Aprobado: 18 de julio del 2007.

Yamirka Alonso Geli. Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.

E mail: yalonso@cbm.uo.edu.cu, yalonso02@yahoo.es.

Figura 1: Relación entre el % de hemólisis y la relación molar hemoglobina/L-Glutamina en eritrocitos de pacientes drepanocíticos (-○-) e individuos no drepanocíticos (-■-).

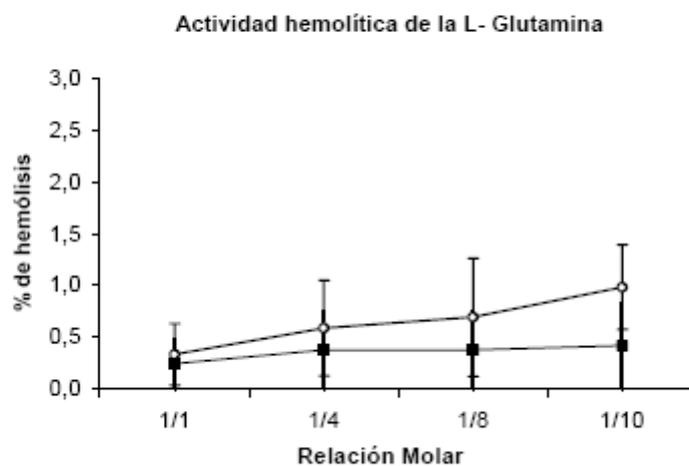


Figura 2: Comportamiento del peso corporal de rata del grupo experimental L-glutamina 2000 mg/Kg (-○-) respecto al grupo control (-▲-).

