



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
ISSN: 0325-2957
actabioq@fbpba.org.ar
Federación Bioquímica de la Provincia de
Buenos Aires
Argentina

Martínez Sarrasague, María; Barrado, Domingo Andrés; Zubillaga, Marcela; Hager, Alfredo; De Paoli, Tomás; Boccio, José

Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 40, núm. 1, enero-marzo, 2006, pp. 45-54
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53540108>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Conceptos actuales del metabolismo del glutatión

Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis

- María Martínez Sarrasague^{1*}, Domingo Andrés Barrado^{1*}, Marcela Zubillaga^{2*}, Alfredo Hager^{2*}, Tomás De Paoli^{2*}, José Boccio^{2*}

-
1. Bioquímico.
2. Dr. de la UBA.

* Cátedra de Física, Laboratorio de Isótopos Estables. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

** Cátedra de Radioisótopos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Resumen

El glutatión (GSH) juega un papel fundamental en la protección celular contra la injuria oxidativa. Los cambios de la concentración de GSH en sangre podrían dar una medida del *stress* oxidativo *in vivo*. El GSH disminuye con el envejecimiento, el ejercicio violento y también en ciertas patologías como diabetes, fibrosis quística, SIDA, cirrosis, infecciones, malnutrición proteica y tratamientos quimioterápicos, entre otros. El rol del GSH en diferentes funciones fisiológicas y en diversas patologías puede estudiarse empleando moléculas etiquetadas con isótopos estables, como por ejemplo con ¹³C. La cinética del ¹³CO₂, generado a partir de un ¹³C-sustrato, constituye una herramienta útil en el estudio de rutas metabólicas. La ¹³C-oxatiazolidina carboxilato (OTC) permite evaluar el balance del glutatión en diferentes condiciones patológicas y fisiológicas, determinando el estado redox en cada situación. En este trabajo se discuten aspectos básicos del metabolismo del glutatión y su vinculación con determinadas patologías en el hombre; también se analiza la utilización de los isótopos estables como una herramienta no invasiva para evaluar el balance de glutatión en seres humanos.

Palabras clave: glutatión * metabolismo * *stress* oxidativo * patologías * isótopos estables * ¹³C-oxatiazolidina carboxilato

Summary

CURRENT CONCEPTS ON GLUTATHIONE METABOLISM. USEFULNESS OF STABLE ISOTOPES OF ITS HOMEOSTASIS

Glutathione (GSH) plays an important role against free radicals, its blood concentration showing a strong correlation with in vivo oxidative stress. GSH concentration decreases with aging, strong fitness and oxidative stress among other pathologies like diabetes, cystic fibrosis, AIDS, cirrhosis, infections, protein malnutrition and chemotherapy treatments. The GSH performance in different physiological functions and diverse pathologies can be

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

studied using labeled molecules with stable isotopes, for instance using ^{13}C . The kinetic of the $^{13}\text{CO}_2$, generated from a ^{13}C -substrate, constitutes a useful tool for the studies of metabolic routes. The carboxylate ^{13}C -oxathiazolidine (OTC) enables the evaluation of the glutathione balance in different pathological and physiological conditions, determining the redox state in each situation. In this work, different basic aspects of glutathione metabolism are discussed, as well as its relationship with different pathologies. The usefulness of stable isotopes is also analyzed as a non invasive tool for determining glutathione balance in human beings.

Key words: glutathione * metabolism * oxidative stress * pathologies * stable isotopes * ^{13}C -oxothiazolidine carboxylate

Introducción

Desde el punto de vista químico el glutatión (GSH) es el compuesto de bajo peso molecular con grupo sulfhidrilo (-SH) más importante en plantas y animales. Se trata de un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína (Glu-Gly-Cys).

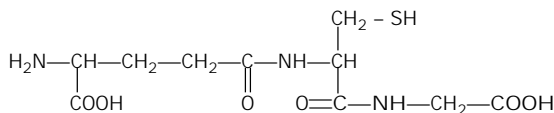


Figura 1. El glutatión reducido se conoce químicamente como *N*-(*N*-*L*-gamma-glutamil-*L*-cisteinil) glicina, su fórmula molecular es $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ y su peso molecular 307.33 g/mol. El glutatión oxidado es el *L*-gamma-glutamil-*L*-cisteinil-glicina disulfuro (GSSG), y su fórmula molecular es $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_2$.

En la Figura 2 se muestra el metabolismo básico del GSH (1).

La síntesis ocurre en dos etapas y depende de la disponibilidad de sustratos y de los mecanismos regulatorios. El paso de regulación en la síntesis ocurre a nivel de la enzima gamma-glutamil cisteinil sintetasa (γGCS), donde el GSH ejerce el *feed back* negativo (2).

El GSH está sujeto a un constante recambio en el organismo; hígado, riñones, pulmones, corazón, intestinos y músculos son los principales órganos responsables de su homeostasis. La captación de cada órgano o tejido depende de la actividad de la enzima gamma glutamil transpeptidasa (γGT o GGT) localizada en la membrana celular (3).

En la Tabla I se indican los lugares del organismo donde el GSH se encuentra en mayor concentración.

Dentro de las células el GSH se encuentra principalmente en mitocondrias, retículo endoplásmico y núcleo y es aquí donde se observa un aumento de su concentración en la apoptosis o muerte celular programada (4).

Además de las mencionadas en la Figura 2, pueden existir otras vías metabólicas para el GSH; por ejemplo, para la eliminación de compuestos tóxicos generalmente se forman tioéteres con el GSH y se obtienen productos conjugados con el glutatión a través de una unión con azufre. El derivado azufrado luego pierde glutámico y glicina, y conserva la cisteína. Posteriormente, la acetilación de la cisteína origina los llamados compuestos mercaptoúricos que aparecen en orina. Este proceso explica porqué la cisteína es el aminoácido limitante para la síntesis del GSH, ya que a diferencia de lo que

Tabla I. Concentración de GSH en el organismo.

Cristalino	10 mM	Concentración más elevada del organismo para proteger de la foto-radiación
Hígado	5 - 7 mM	Principal órgano relacionado con la síntesis del GSH. La excreción biliar alcanza una concentración de 10 mM
Riñón	3 mM	Donde más GSH plasmático se consume
Corazón	2 mM	
Músculo	1 - 2 mM	Su concentración varía según el tipo de fibra muscular
Glóbulos rojos	2 mM	
Plasma	0.05 mM	Concentración correspondiente a GSH libre; existe, además, una fracción unida a proteínas

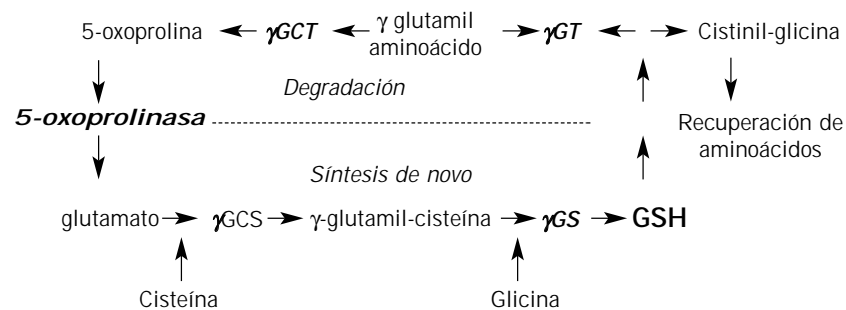


Figura 2. El ciclo del GSH está compuesto por 5 reacciones enzimáticas interrelacionadas; las enzimas intervinientes son: γ GCT: glutamyl carboxil transferasa, γ GT: glutamyl transpeptidasa, γ GS: glutámico sintetasa, γ GCS: glutamyl cisteinil sintetasa.

ocurre con los otros dos aminoácidos, no se recupera y su concentración intracelular es muy baja (1).

Como proveedor de cisteína existe la N-acetil cisteína (NAC), un precursor del aminoácido, que se puede suministrar por vía oral o intravenosa a fin de aumentar los niveles de cisteína cuando se necesita tener elevadas las concentraciones del GSH para favorecer los procesos de detoxificación. Otro precursor de la cisteína es un análogo de la 5-oxoprolina, la oxotiazolidina carboxilato (OTZ, OTC o Procys), que puede aumentar los niveles intracelulares de GSH, especialmente en circunstancias de *stress* oxidativo (5-7). En la Tabla II se resumen las principales funciones del GSH en el organismo. Para realizarlas, el grupo -SH nucleofílico del GSH se conjuga con el grupo electrofílico de las toxinas, tanto en forma directa como a través de reacciones catalizadas por las enzimas glutatión transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GP_{ox}).

El *stress* oxidativo se define como el desbalance entre oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, *stress* que potencialmente puede causar daño, lo cual está relacionado con diversas patologías humanas. Además, es sabido que el daño oxidativo puede ocurrir por aumento de la producción de especies activas del oxígeno, más conocidas como ROS (*reactive oxygen species*). Los ROS pueden ser radicales libres (superóxido, hidroxilo, peróxido, alcohoxilo, hidropéroxilo) o no (peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, oxígeno singulete, peroxinitrito). Si los ROS tienen una

concentración muy elevada y no alcanzan el último eslabón de la reducción del O_2 , el agua, se produce la oxidación de moléculas biológicas; los ROS afectan a las proteínas, hidratos de carbono, ADN, lípidos, enzimas de transporte y mecanismos celulares de transcripción (8-10).

El *stress* oxidativo puede ser causado por toxicidad de drogas, isquemia, metástasis, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, radiaciones y procesos inflamatorios mediados por citoquinas, entre otros (9) (11-14). En la Tabla III se puede ver una clasificación de las principales defensas antioxidantes.

Las enzimas antioxidantes tienden a aumentar con la edad, en procura de compensar la disminución de GSH hepático, pero este aumento no alcanza para el secuestro de los ROS generados, pues hay una pérdida de efectividad de las enzimas. Con la edad también se produce una disminución de la síntesis proteica; lo mismo ocurre con los niveles de citocromo P450. Frente a una deficiencia de GSH se observa un aumento de ROS, con el consecuente daño mitocondrial y celular (11).

Tanto el GSH como el ácido ascórbico (AA) son los principales protagonistas en la destrucción de intermediarios de ROS. Si bien sus funciones parecerían redundantes, no lo son porque tienen diferente mecanismo de acción y actúan a distintos tiempos o etapas del proceso antioxidante (2) (15).

Existe una interrelación significativa entre GSH y AA. La deficiencia de GSH va acompañada por una

Tabla II. Principales funciones en el organismo

GSH	<ul style="list-style-type: none"> - Mantiene el balance redox en la célula y la protege del <i>stress</i> oxidativo, nitrosativo y de los reactivos electrofílicos. - Actúa como coenzima. - Participa en procesos de detoxificación. - Controla la permeabilidad de membrana y el transporte de aminoácidos. - Interviene en el proceso de síntesis de proteínas, ADN y ARN. - Regula la formación y el mantenimiento de la forma activa de las enzimas.
-----	--

Tabla III. Principales defensas antioxidantes.

Defensas antioxidantes del organismo (8)(14)(15).	
Compuestos antioxidantes plasmáticos	GSH, ubiquinol, flavonoides, ácido úrico Vitaminas A, C y E
Enzimas antioxidantes	Superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa
Secuestradores de iones metálicos	Transferrina, ferritina, lactoferrina, óxido nítrico

disminución de AA. La administración de AA no sólo aumenta sus propios niveles, sino que también eleva los de GSH; el GSH también aumenta con un aumento de la vitamina E (16-19). En la Tabla IV se indican algunas situaciones en las que el GSH está disminuido.

El rol del *stress* oxidativo en la fisiopatología de muchas enfermedades sugiere que los agentes que disminuyen el *stress* oxidativo podrían tener un impacto importante en el progreso de la enfermedad. El GSH es primordial en el sistema antioxidante del organismo y en el metabolismo redox; bajo condiciones de *stress* oxidativo el GSH es agotado, depletado, manifestándose el daño causado por los ROS en las células y tejidos (16).

GSH y estado redox

El estado redox en la célula indica el balance entre las especies oxidadas y las reducidas; está influido por factores fisiológicos, ambientales y nutricionales. De este balance dependen la activación de enzimas, la síntesis de ADN, la proliferación celular, los mecanismos de regulación de la apoptosis o muerte celular programada, el plegamiento de proteínas y la activación de factores de transcripción, entre otros. El GSH y el estado redox de algunos tioles (compuestos con grupo -SH) regulan la expresión de genes involucrados en la patogénesis de diferentes enfermedades (cáncer, aterosclerosis, SIDA, diabetes, etc.) (15).

Los principales reguladores del estado redox son el GSH, la cisteína, la tioredoxina (Trx) y las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). A través de la medida de la concentración de especies antioxidantes, de la actividad de enzimas y de la relación de concentraciones de las formas oxidada y reducida del GSH (GSSG/GSH) se puede obtener un perfil de comportamiento redox para cada tejido. La determina-

ción de la capacidad antioxidante total del plasma también puede ser útil para evaluar el estado redox, mientras que la relación en sangre GSH/GSSG reflejaría los cambios que se verifican en tejidos menos accesibles. Esta relación es mayor que 100 en condiciones normales; con el *stress* oxidativo se acumula GSSG y una proporción alterada indica cambios en el estado redox que afectan el balance de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (16) (20) (21).

Los órganos para trasplante se preservan refrigerados a 2 - 4 °C para reducir los cambios o injurias durante el período de espera. Se observó que el GSH jugaba un papel fundamental en el inicio de la apoptosis durante la preservación en frío de hepatocitos. Para evaluar su influencia se midieron, en cultivos sometidos a frío, los siguientes parámetros: ROS, GSH y GSSG, peroxidación lipídica y fragmentación de ADN. Durante el recalentamiento, la adición de N-acetil cisteína disminuyó significativamente el número de células con morfología apoptótica. También fue menor la producción de ROS, de peróxidos lipídicos y la depleción de GSH y de proteínas con grupos -SH (22) (23).

Se comprobó que el GSH es responsable de la modulación, durante la preservación en frío y el recalentamiento, de la inducción apoptótica, del nivel de producción de radicales libres y de la peroxidación lipídica. Las células preapoptóticas y apoptóticas tienen menos GSH y proteínas con grupos -SH que las células normales, lo que evidencia la regulación redox del proceso (21) (23).

La incubación con NAC, previa al recalentamiento del órgano, en el caso de trasplantes hepáticos, tendría importancia terapéutica para prevenir los efectos tempranos de la apoptosis.

Otra situación en la que se manifiesta la regulación del GSH es en la glicosilación proteica (adición de glucosa a proteínas). Existe una relación inversa entre ni-

Tabla IV. Situaciones en las que el GSH está disminuido.

GSH disminuido en(13-19)	- envejecimiento	- diabetes	- cirrosis
	- ejercicio violento	- fibrosis quística	- malnutrición proteica
	- <i>stress</i> oxidativo	- SIDA	- tratamientos quimioterápicos
	- infecciones	- retinopatías	- artritis reumatoidea

veles de GSH y glicosilación. La hemoglobina glicosilada (HbG) revela el grado de glicosilación de otras proteínas también expuestas a la glucosa circulante y aumenta significativamente en la deficiencia de GSH de los eritrocitos expuestos a elevadas concentraciones de glucosa (24) (25).

A continuación se comentará brevemente la vinculación existente entre los niveles de GSH y determinadas patologías.

GSH y cáncer

Las células cancerígenas pueden generar elevada cantidad de agua oxigenada (H_2O_2), la cual contribuiría en el daño y la mutación de tejidos, facilitando el crecimiento y la invasión del tumor. El estado persistente de *stress* oxidativo explicaría parcialmente algunas características importantes del cáncer (12) (20).

El aumento de GSH que puede aparecer en células tumorales se puede explicar como consecuencia de un aumento de la actividad mitótica. Los cambios de la velocidad de proliferación coinciden con cambios en la concentración intracelular de GSH. Cuando las células tumorales proliferan se producen más peróxidos, hay aumento de ROS y consecuentemente se oxida el GSH. Si disminuye la velocidad de proliferación, también lo hace el nivel de peróxidos (26).

El aumento de GSSG en sangre acompañando el crecimiento del tumor se puede atribuir a la oxidación de GSH en los eritrocitos y a un aumento de la liberación de GSSG desde diferentes tejidos. La anemia es un síntoma frecuentemente encontrado en los pacientes con cáncer; también se aprecian cambios enzimáticos que orientan hacia el estado oxidado.

Frente a casos de resistencia en la terapia contra el cáncer se considera de utilidad el conocimiento de la relación GSH/GSSG. Los ésteres del GSH son fármacos precursores del tripéptido que por sus características químicas pueden penetrar en las células y luego allí ser hidrolizados; así se logran elevados niveles de GSH que protegen a las células linfáticas contra los efectos letales de la radiación. La función más importante del GSH en la quimioterapia es su participación en la detoxificación de xenobióticos, peróxidos orgánicos y metales pesados; de este modo protege a las macromoléculas de las células, como por ejemplo el ADN (13) (20).

GSH y aterosclerosis

La oxidación de la lipoproteína de baja densidad, LDL, es el primer paso en el desarrollo de la aterosclerosis. La citotoxicidad de la LDL oxidada también se manifiesta en la activación de los mecanismos apoptóticos. La LDL oxidada se comporta como pro-oxi-

dante, aumenta los niveles de ROS y estimula la expresión de la enzima decisiva para la síntesis del GSH, así se protegerían las células contra el *stress* oxidativo inducido por la LDL oxidada. El aumento de GSH depende del grado de oxidación de la LDL (2).

La enzima glutatiónperoxidasa (GP_x) y el GSH protegen contra el *stress* oxidativo inducido por la LDL oxidada. En cultivos de células endoteliales se observó que el tratamiento previo con un agente que disminuye los depósitos celulares de GSH, el butilsulfóxido (BSO), provoca un aumento de la citotoxicidad provocada por LDL oxidada. La situación se revierte si se usan antioxidantes (8) (27) (28).

El sistema antioxidante, importante para prevenir el desarrollo de la aterosclerosis, actuaría en diferentes niveles al prevenir la oxidación, disminuir la acción de la LDL oxidada y limitar la respuesta celular apoptótica a la lipoproteína oxidada.

GSH y malnutrición

El estudio de niños con malnutrición permitió determinar que tienen disminuido tanto el GSH como la velocidad de síntesis del mismo; presentan, además, una baja concentración de cisteína extra e intra celular y elevados niveles de marcadores de peroxidación lipídica inducida. El edema es una de las manifestaciones que se producen como consecuencia del severo daño a la membrana celular por acción de los radicales libres (29).

En los niños malnutridos también hay un menor aporte de cisteína a partir del metabolismo proteico; en el *kwashiorkor*, la velocidad de ruptura de las proteínas está disminuida por un déficit enzimático; pero no ocurre lo mismo en el marasmo. Las características del síndrome de *kwashiorkor* se asocian con el daño oxidativo debido al desbalance entre la generación de radicales libres y la capacidad antioxidante; se produce el daño oxidativo con las consecuentes subfunciones hepática e inmune (29).

En ensayos experimentales se observó que una dieta restringida en aminoácidos sulfurados disminuía la velocidad de síntesis de GSH y disminuía su recambio desde los tejidos. Una modificación en la disponibilidad dietaria de cisteína y de su precursor metionina puede modular la velocidad de síntesis de GSH y sus niveles en sangre, disminuyéndolos en el caso de la dieta sin aminoácidos azufrados (30).

Una situación así podría presentarse en los casos de la alimentación parenteral de pacientes que pasaron por una situación de *stress*. Puede suceder, por ejemplo, que después de una cirugía abdominal disminuya la capacidad de síntesis de GSH en los tejidos, pero que se mantenga el GSH de sangre; la diferencia dietaria estaría afectando entonces el recambio de GSH entre tejidos y sangre (30).

Los aminoácidos glicina o cisteína son igualmente adecuados para evaluar *in vivo* la velocidad de síntesis del GSH. En pacientes pediátricos internados con sepsis que recibían alimentación parenteral, se pudo determinar mediante el empleo de ^{13}C -cisteína, que la velocidad de síntesis de GSH era muy inferior a la de los controles. Se observó que la suplementación con N-acetil cisteína llevó a un aumento significativo, en sólo 9 días de tratamiento, de la concentración de GSH, de cisteína y de la velocidad de síntesis del tripéptido. También se comprobó un efecto antiinflamatorio como consecuencia de la disminución de la concentración de interleuquinas en plasma (5) (31).

Se pudo comprobar entonces que la terapia de suplementación con cisteína para restablecer el GSH durante las primeras etapas del tratamiento de la desnutrición disminuía la morbi-mortalidad infantil (29).

GSH y enfermedad alcohólica

El GSH se sintetiza en el citosol, pero entre 10 y 15% queda en las mitocondrias para protegerlas, principalmente, del agua oxigenada y de otros ROS que se producen en el metabolismo celular.

Mediante la exposición crónica de ratas a etanol se pudo observar un marcado decrecimiento del GSH mitocondrial (50%) debido a un deficiente transporte desde el citosol; también se vio alterada la microviscosidad interna de la mitocondria. Estas modificaciones determinan una susceptibilidad letal al *stress* oxidativo (32) (33).

La metionina y su forma activa S-adenosil metionina son importantes en el metabolismo de fosfolípidos y en la estructura y función de la membrana mitocondrial. La administración de S-adenosil metionina previene los daños hepáticos inducidos por alcohol y protege a la mitocondria. La enzima vinculada en el proceso, metionina adenosil transferasa, es regulada por el estado redox a través de los niveles intracelulares de GSH y de la relación GSH/GSSG.

Por aumento del etanol aumenta la generación de ROS, disminuye la actividad de la metionina adenosil transferasa y disminuyen la S-adenosil metionina, y el GSH. Se genera un círculo vicioso que se puede interrumpir por la administración exógena de S-adenosil metionina (33).

GSH y SIDA

En la infección asintomática por HIV se desconocen los mecanismos por los que está alterada la homeostasis del GSH. El *pool* eritrocitario de GSH está disminuido, probablemente porque decae la velocidad de su síntesis y también porque hay una menor disponibilidad de cisteína (34).

Una persistente carga oxidativa conduce a un au-

mento del consumo de GSH que no se compensa con un incremento de la velocidad de síntesis del tripéptido. El hecho de que el nivel de GSH esté comprometido en individuos infectados con HIV y que esto juegue un rol muy importante en la patogénesis de la enfermedad está bien documentado aunque todavía se desconozcan los mecanismos responsables de la deficiencia de GSH. En los pacientes con esta patología existe un 40% menos del tripéptido en glóbulos rojos y plasma; también se encuentra disminuido en las células CD8 y CD4T y en el fluido epitelial de pulmón.

Es importante la instalación de un tratamiento con N-acetil cisteína o procisteína a fin de revertir parcialmente la situación, dado que el GSH es esencial para regular la proliferación celular, mantener la función de los eritrocitos, restringir la replicación del HIV y sobre todo para aumentar la sobrevida de los pacientes infectados. Mediante la administración de la N-acetil cisteína se logra restablecer y sostener la homeostasis del GSH (35-37). En la Tabla V se resumen las enfermedades antes mencionadas, y su relación con el GSH.

Técnicas actuales con isótopos estables

Los isótopos estables pueden ser usados, tanto *in vivo* como *in vitro*, para determinar aspectos dinámicos del metabolismo. Presentan, respecto de los isótopos radiactivos, la ventaja de poder emplearse en grupos vulnerables (niños, mujeres embarazadas) (38).

La metodología general de los estudios *in vivo* consiste en la administración por vía oral o endovenosa de un compuesto marcado con el isótopo estable, para que una vez en el organismo intervenga en el proceso metabólico, enzimático o no, que se desea investigar. Se puede entonces estudiar la velocidad de aparición o desaparición de metabolitos a través de muestras de sangre, orina o aún más conveniente y simple, de aire espirado, obtenidas a diferentes tiempos (39-41).

La técnica ideal con isótopos estables es aquella que combina un método no invasivo de administración del compuesto marcado, con una recolección de muestra de características similares y que, además, presenta elevada sensibilidad y especificidad. El empleo de técnicas con moléculas marcadas con ^{13}C , un isótopo estable, encuentra numerosas aplicaciones y reúne las condiciones mencionadas. La cantidad o la velocidad de aparición de CO_2 marcado ($^{13}\text{CO}_2$), generado a partir de un ^{13}C -sustrato, podría ser un indicador del estado de diferentes funciones fisiológicas relacionadas con el sustrato. Los *metaprobos* o probadores metabólicos permiten estimar también la actividad de determinadas enzimas en el cuerpo (39) (42-44).

Según la bibliografía, el ácido ^{13}C -octanoico se emplea para evaluar el vaciamiento gástrico. El ^{13}C -trio-

Tabla V. Relación entre enfermedades y GSH.

Patología	Alteración	Relación con GSH
Cáncer	Estado persistente de <i>stress</i> oxidativo Aumento de la concentración de ROS	Aumentan los niveles de GSSG plasmático por aumento de la actividad mitótica tumoral
Aterosclerosis	La LDL oxidada provoca aumento de la concentración de ROS Aumenta la apoptosis celular	Aumenta la síntesis de GSH para proteger a las células del <i>stress</i> oxidativo
Malnutrición	Aumenta la concentración de ROS que dañan la membrana celular; se produce edema y hay subfunción hepática e inmune	Disminuye la concentración de GSH, la velocidad de síntesis de GSH, la concentración de cisterna y la concentración de enzimas por déficit proteico
Alcoholismo	Aumenta la generación de ROS y la susceptibilidad al <i>stress</i> oxidativo Alteraciones a nivel mitocondrial	Disminuye la concentración de GSH mitocondrial Disminuye la actividad enzimática de metil adenosil. transferasa
SIDA	Incremento de procesos oxidativos Se desconocen los mecanismos que alteran la homeostasis del GSH	Disminuye la concentración de GSH en hematíes y en plasma Disminuye la velocidad de síntesis de GSH

tanoin, el ^{13}C -triolein, y el ^{13}C -triglicéridos son usados en el estudio de malnutrición e hipercolesterolemia. El diagnóstico y seguimiento de la infección por *Helicobacter pylori* se puede realizar empleando ^{13}C -urea, que por acción de la enzima bacteriana ureasa origina $^{13}\text{CO}_2$ que puede ser cuantificado en el aire espirado mediante espectrometría de masa (42) (43).

Una aplicación clásica de isótopos estables la constituye el empleo de ^{13}C -aminopirina para distinguir diferentes grados de enfermedad hepática que afectan los procesos de demetilación en el citocromo P-450. En investigaciones recientes se usaron análogos de aminoácidos para evaluar la función mitocondrial hepática a través de la medición del $^{13}\text{CO}_2$ exhalado (45).

El aumento de homocisteína en plasma es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares, pues sus manifestaciones aparecen tarde; conviene detectar temprano los problemas de depuración de la homocisteína, para, mediante un tratamiento de suplementación vitamínica, disminuir el riesgo de los trastornos circulatorios. Si se usa ^{13}C -metionina se puede determinar *in vivo* la dinámica del ciclo de reconversión del aminoácido; el enriquecimiento de $^{13}\text{CO}_2$ en el aire espirado puede permitir aproximaciones cuantitativas de su secuencia metabólica (46).

La incorporación de ^2H -glicina en el GSH es un ejemplo de isótopo estable incorporado a una molécula que permite medir la cinética del metabolismo del GSH *in vivo*. También para determinar la importancia de la cisteína de dieta en la síntesis de GSH en sangre entera se empleó el ^{13}C -cisteína, y mediante espectrometría de masa, se evaluó el enriquecimiento isotópico con ^{13}C del tripéptido y de la cisteína plasmática (34).

En un trabajo orientado a evaluar la importancia de

los aminoácidos con azufre se estudiaron dos grupos de individuos adultos sanos que recibieron dietas distintas: una con aminoácidos completos y otra sin aminoácidos azufrados. El marcador empleado fue ^{13}C -cisteína, en concentración suficiente para marcar todo el GSH sanguíneo. En las muestras de aire exhalado se determinó el $^{13}\text{CO}_2$. También se obtuvieron muestras de sangre cada hora y en ellas se determinó ^{13}C -cisteína, ^{13}C -cisteína-GSH y GSH en sangre entera. En la dieta sin aminoácidos azufrados se observó un aumento de flujo de oxiprolina, aumento de su velocidad de oxidación y aumento de la excreción urinaria. Esto evidencia un cambio en la velocidad de síntesis y en el recambio del GSH (Figura 2) (30).

Entre los *tests* de $^{13}\text{CO}_2$ en el aire espirado interesan aquellos que permitan inferir las condiciones en que se encuentran los depósitos de GSH y evaluar la respuesta en su síntesis frente a una depleción estimulada.

El empleo de ^{13}C -oxatiazolidina carboxilato (OTC) permite seguir el curso de la depleción de GSH aún frente a una injuria leve inducida. El mismo compuesto también puede ser usado para estimar la capacidad relativa de reposición de GSH de acuerdo con los distintos estados de *stress* oxidativo (47).

La Figura 3 muestra la ruta metabólica de síntesis del GSH y el nivel en el cual interviene la enzima oxoprolinasa (con el número 3 en la figura). El sustrato natural de la enzima es la 5-oxoprolina y la oxotiazolidina es un análogo, que como se menciona en la introducción, se emplea con fines terapéuticos para aumentar los depósitos celulares de cisteína y reponer los niveles de GSH. En circunstancias en que las reservas del tripéptido estaban disminuidas, ya sea por causas naturales (edad), en enfermedades (SIDA), o en la depleción por intoxicación

con acetaminofeno, experiencias realizadas con oxotiazolidina permitieron calcular indirectamente la movilización de los precursores para la síntesis de GSH (7).

El acetaminofeno (APAP = Tylenol[®]) es un analgésico, antipirético que en dosis bajas se puede usar para causar artificialmente una depleción de GSH; en dosis elevadas causa hepatotoxicidad. La oxotiazolidina refleja entonces efectivamente el curso de la depleción de GSH, aún ante una injuria suave y puede ser usada para estimar la capacidad relativa de reposición de GSH. Con esta finalidad se empleó entonces ¹³C-oxotiazolidina, que por acción de la oxoprolinasa originó cisteína y ¹³CO₂, detectable en el aire espirado (1) (40).

En condiciones basales, las concentraciones intracelulares de GSH son lo suficientemente elevadas como para inhibir su propia síntesis (etapa 1 de la Figura 3), de modo que los sustratos fluyen a través de un *shunt* o ruta alternativa, en la que intervienen diferentes enzimas y originan oxiprolina. Este compuesto, en las condiciones mencionadas, saturaría presumiblemente la vía de la 5-oxoprolinasa. Si un análogo de la oxoprolina, como por ejemplo la ¹³C-oxotiazolidina es introducido en las condiciones basales será hidrolizado en muy baja proporción debido a la presencia de oxoprolina endógena en concentraciones elevadas, la enzima no estará disponible para el análogo marcado y por lo tanto habrá una menor producción de ¹³CO₂. La 5-oxoprolina no ejerce un *feed back* significativo de la síntesis de GSH.

Por otro lado, en respuesta a un estímulo depletorio agudo de GSH, se produce la síntesis *de novo* del tripéptido. Para ello los sustratos se retiran de la vía de la oxoprolina, lo que provoca que sus niveles intracelulares disminuyan y consecuentemente una mayor proporción de la ¹³C-oxotiazolidina es ahora hidrolizada, lo que se evidencia en una mayor concentración de ¹³CO₂ en el aire espirado.

Si aumenta la excreción de ¹³CO₂, es porque los depósitos de GSH están disminuidos y están alterados los

sustratos naturales para la oxoprolinasa. Una adecuada concentración de GSH da una menor velocidad de conversión de oxotiazolidina y una disminución en la proporción de ¹³CO₂ en el aire espirado.

La prueba de ¹³C-oxotiazolidina sirve para identificar individuos de riesgo porque tienen bajos depósitos de GSH, o bien porque tienen disminuida la capacidad de síntesis de GSH. El ensayo con ¹³C-oxotiazolidina sirve para caracterizar a los pacientes según su tasa metabólica basal y su capacidad de producción en respuesta a una injuria controlada, por ejemplo con acetaminofeno. Tanto en el caso de un aumento basal de la tasa metabólica como en el de una baja respuesta estimulada, no se observará una buena respuesta a tratamientos con antioxidantes y a terapias relacionadas con recuperación de los niveles de GSH. Estos casos son más sensibles, por ejemplo, a los daños de los tratamientos quimioterápicos (47).

La oxotiazolidina se usa terapéuticamente para estimular la síntesis hepática de GSH, aumentar el GSH intracelular en pacientes dializados o con SIDA, sensibilizar tumores al agente quimioterápico, revertir la disfunción endotelial en pacientes con enfermedades arterio-coronarias, mejorar la respuesta inmune y aliviar la injuria a los pulmones en pacientes con disfunción respiratoria aguda.

La efectividad de la administración directa de GSH es restringida debido a que es fácilmente hidrolizado en intestino e hígado, de allí que se probaran drogas que permitieran reponer los niveles de GSH, sin sufrir la limitación de la degradación. La oxotiazolidina puede ser administrada oralmente, no se le conocen efectos adversos serios y es bien tolerada (34) (48).

Conclusiones

Por todo lo expuesto se comprende el papel preponderante del GSH, no sólo en la detoxificación de

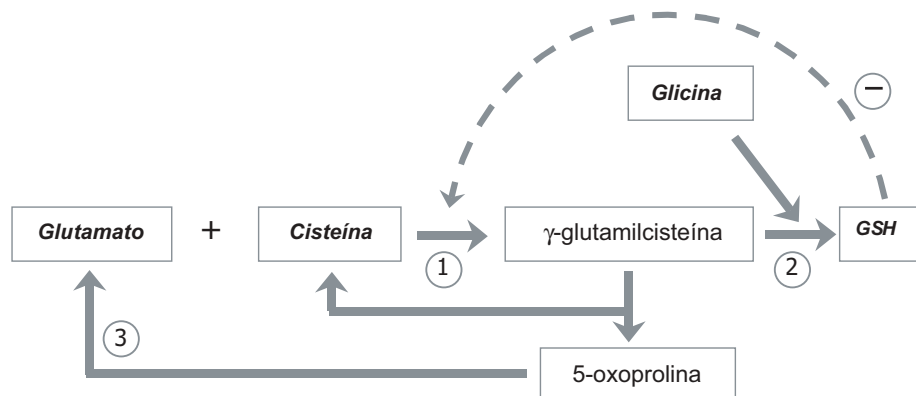


Figura 3. El GSH es sintetizado en 2 etapas a partir de glutamato, cisteína y glicina; en un primer paso (1) interviene la enzima γ -glutamilcistein sintetasa, y luego (2) la GSH sintetasa. El GSH ejerce *feed back* negativo en la reacción 1. La γ -glutamilcisteína no convertida en GSH sigue una ruta alternativa, produciendo cisteína y 5-oxoprolina; esta última es convertida en glutamato vía la enzima 5-oxoprolinasa (3).

compuestos endógenos y exógenos sino también en los procesos de defensa contra el *stress* oxidativo y su influencia en el balance del estado redox celular. Se asocia envejecimiento con bajos niveles de GSH y también se lo implica en la teoría de envejecimiento mediado por radicales libres (13).

Es por ello que resulta de interés el desarrollo de una metodología que permita evaluar el estado de los depósitos tisulares del tripéptido y la respuesta frente a estímulos depletorios del mismo. Si el método reúne características de especificidad, sensibilidad y cualidades de no invasivo, resultará beneficioso para ser empleado en aquellos casos o situaciones en que otras técnicas no son recomendadas. Se pueden sumar a estas ventajas el hecho de que el empleo de isótopos estables, en lugar de los radioisótopos, evita los inconvenientes de irradiación en los grupos de riesgo.

Debido que la enzima oxoprolinasa está ampliamente distribuida en los tejidos, la medida indirecta de su actividad permite inferir un índice de la actividad de síntesis de GSH y de su homeostasis empleando como sustrato ¹³C-oxotiazolidina y cuantificando la presencia de ¹³CO₂ en el aire espirado,

Consecuentemente, el *test* de ¹³C-oxotiazolidina permite la implementación y el seguimiento de terapias, además de caracterizar a los individuos según su tasa metabólica basal para oxotiazolidina y su capacidad de respuesta a una injuria controlada (47).

Los *tests* de aire espirado para diagnóstico no son nuevos, pero su asociación con isótopos estables convierte en metodologías con un futuro promisorio. Su empleo en la rutina clínica es aún limitado, tal vez por el elevado costo del equipamiento y por la falta de estandarización de los protocolos, además de la necesidad de contar con estudios poblacionales que permitan normatizar los valores para el diagnóstico de enfermedades (40).

CORRESPONDENCIA

BIOQ. MARÍA MARGARITA MARTÍNEZ SARRASAGUE
Cátedra de Física. Facultad de Farmacia Y Bioquímica
Junín 956
1113 CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES. Argentina
Tel: (011) 4964-8201 - Fax: (011) 4964-8204
E-mail: marga@ffyb.uba.ar

Referencias bibliográficas

- Griffith OW. Biological and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad Biol Med* 1999; 27 (9/10): 922-35.
- Cho S, Hazama M, Urata Y, Goto S, Horiuchi S, Sumikawa K, *et al.* Protective rol of glutathione synthesis in response to oxidized low density lipoprotein in human vascular endothelial cells. *Free Rad Biol Med* 1999; 26 (5-6): 589-602.
- Deneke S, Fanburg B. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 1989; 257: 163-73.
- Meister A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271: 35-42.
- Badaloo A, Reid M, Forrester t, Heird W, Jahoor F. Cysteine supplementation improves the erythrocyte glutathione synthesis rate in children with severe edematous malnutrition. *Am J Clin Nutr* 2000; 76: 646-52.
- Raguso C, Ajami A, Gleason R, Young V. Effect of cysteine intake on methionine kinetics and oxidation determined with oral tracers of methionine and cysteine in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 1997; 66 (2): 283-92.
- Williamson J, Meister A. Stimulation of hepatic glutathione formation by administration of 2-oxothiazolidine-4-carboxylate.5-oxo-L-prolinase substrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 936-9.
- Polidori MC, Stahl W, Eichler O, Niestroj I, Sies H. Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Rad Biol Med* 2001; 30 (5): 456-62.
- Galle J. Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 2135-7.
- Togashi H, Shinzawa H, Matsuo T, Takeda Y, Takahashi T, Aoyama M, *et al.* Analysis of hepatic oxidative stress status by electron spin resonance spectroscopy and imaging. *Free Rad Biol Med* 2000; 28 (6): 846-53.
- Palomero J, Galán A, Muñoz M, Tuñón M, González Gallego J, Jiménez R. Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin A in rats. Changes in liver glutathione and antioxidants enzymes. *Free Rad Biol Med* 2001; 30 (8): 836-45.
- Handelman G. Evaluation of oxidant stress in dialysis patients. *Blood Purif* 2000; 18: 343-9.
- Chen X, Carystinos G D, Batist G. Potential for selective modulation of glutathion in cancer chemotherapy. *Chem Biol Interact* 1998; 111-112: 263-75.
- Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P Jr, Reed RL, *et al.* Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age related macular degeneration and diabetes. *Free Rad Biol Med* 1998; 24 (5): 699-704.
- McCall M, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad Biol Med* 1999; 26 (7-8): 1034-53.
- Jones D, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn M, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Rad Biol Med* 2000; 28 (4): 625-35.
- Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad Biol Med* 2000; 29 (11): 1106-14.
- Mendiratta S, Qu Z, May J. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidants effects in blood. *Free Rad Biol Med* 1998; 24 (5): 789-97.
- Guo Q, Packer L. Ascorbate-dependent recycling of vitamin E. *Free Rad Biol Med*. 2000; 29(3/4): 368-74.
- Navarro J, Obrador E, Carretero J, Petschen I, Avino J, Perez P, *et al.* Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells asso-

- ciate with tumour growth in vivo. *Free Rad Biol Med* 1999; 26 (3-4): 410-8.
21. Piwocka K, Jaruga E, Skierski J, Grazka I, Sikora E. Effect of glutathione depletion on caspase-3 independent apoptosis pathway induced by curcumin in jurkat cells. *Free Rad Biol Med* 2001; 31 (5): 670-8.
 22. Hancock J, Desikan R, Neill S. Does the redox status of cytochrome C act as a fail – safe mechanism in the regulation of programmed cell death? *Free Rad Biol Med* 2001; 31 (5): 697-703.
 23. Vairetti M, Griffini P, Pietrocola G, Richelmi P, Freitas I. Cold-induced apoptosis in isolated rat hepatocytes: protective role of glutathione. *Free Rad Biol Med* 2001; 31 (8): 954-61.
 24. Jain Sushil K. Glutathione and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency can increase protein glycosylation. *Free Rad Biol Med* 1998; 24 (1): 197-201.
 25. De Mattia G, Bravi MC, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, Armiento A, Ferri C, *et al.* Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998; 47(8): 993-7.
 26. Navarro J, Obrador E, Pellicer JA, Aseni M, Vina J, Estrela JM. Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Rad Biol Med* 1997; 22: 1203-9.
 27. Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol Ther* 1991; 51: 155-94.
 28. Aviram M. Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis and anti-atherogenicity of antioxidants. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 599-608.
 29. Reid M, Badaloo A, Forrester T, Morlese JF, Frazer M, Heird WC, *et al.* In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in children with severe protein-energy malnutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: 405-12.
 30. Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, Yu YM, Lu XM, Zurakowski D, Tompkins RG, *et al.* Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (10): 5071-6.
 31. Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, Ming-Yu Y, Lu XM, Zurakowski D, Curley M, *et al.* Cysteine metabolism and whole blood glutathione synthesis in septic pediatric patients. *Crit Care Med* 2001; 29 (4): 870-7.
 32. Stoyanovsky D, Wu D, Cederbaum A. Interaction of 1-hydroxyethyl radical with glutathione, ascorbic acid and a-tocopherol. *Free Rad Biol Med* 1998; 24 (1): 132-8.
 33. Fernández-Checa J, Colell A, García-Ruiz C. S-Adenosyl-L-methionine and mitochondrial reduced glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol* 2002; 27: 179-83.
 34. Wen-Zhe Ho, Starr SE, Sison A, Douglas S. L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in mononuclear Phagocytes and Lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4 (3): 352-7.
 35. Moberly JB, Logan J, Borum PR, Story KO, Webb LE, Jassal SV, *et al.* Elevation of whole-blood glutathione in peritoneal dialysis patients by L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a cysteine prodrug (Procysteine). *J Am Soc Nephrol* 1998; 9 (6): 1093-9.
 36. Crankshaw DL, Berkeley LI, Cohen JF, Shirota FN, Nagasawa HT. Double-prodrugs of L-cysteine: Differential protection against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Biochem Mol Toxicol* 2002; 16 (5): 235-44.
 37. De Rosa SC, Zaretsky MD, Dubs JG, Roederer M, Anderson M, Green A, *et al.* N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 841-56.
 38. Wolfe RR. Radiactive and stable isotope tracers in biomedicine. New York: Wiley-Liss; 1992.
 39. Young VR, Ajami AM. Isotopic metaprobes, nutrition and the roads ahead. *J Parent Enteral Nutr* 1999; 23: 175-94.
 40. Kurpad a, Ajami A, Young V. ¹³C breath test in infections and beyond. *Food Nutr Bull* 2002; 23 (3): 21-29.
 41. Raguso C, Ajami A, Gleason R, Young V. Effect of cysteine intake on methionine kinetics and oxidation determined with oral tracers of methionine and cysteine in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 1997; 66 (2): 283-92.
 42. van Dijk-van Aalst K, Van Den Driessche M, van der Schoor S, Schiffelers S, van't Westeinde T, Ghos Y, *et al.* ¹³C mixed triglyceride breath test: a non invasive method to assess lipase activity in children. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 2001; 32(5): 579-85.
 43. Bazzoli F, Cecchini L, Corvaglia L, Dall'Antonia M, De Giacomo C, Fossi S, *et al.* Validation of the ¹³C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: a multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2000;95 (3): 646-50.
 44. Pons G, Blais JC, Rey E, Plissonnier M, Richard MO, Carrier O, *et al.* Maturation of caffeine N-demethylation in infancy: a study using ¹³C₂ breath test. *Pediatr Res* 1998; 23: 632-6.
 45. Klatt S, Taut C, Mayer D, Adler G, Beckh K. Evaluation of the ¹³C-methacetin breath test for quantitative liver function testing. *J Gastroenterol* 1997; 35(8): 609-14.
 46. Kulik W, Kok RM, de Meer K, Jakobs C. Determination of isotopic enrichments of (1-¹³C)homocysteine, (1-¹³C)methionine and (2H₃-methyl-1-¹³C)methionine in human plasma by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2000; 738: 99-105.
 47. Fukagawa N, Hercules E, Ajami A. L-2-(1-¹³C) oxathiazolidine-4-carboxylic acid: a probe for precursor mobilization for glutathione synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: 171-6.
 48. Witschi A, Reddy S, Stofer B, Lauterburg H. The systemic availability of oral glutathione. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 43: 667-9.