

Modificación de enzimas hepáticas en ratas desnutridas tratadas con acetaminofén

Miriam González-Mendoza,* Nelson Vicuña-Fernández,*

Recepción versión modificada 22 de julio del 2002; aceptación 06 de agosto del 2002

Resumen

El acetaminofén es utilizado como analgésico y antipirético. Por su relativa inocuidad en dosis terapéuticas, se usa frecuentemente en niños desnutridos y en mujeres embarazadas. Nos propusimos evaluar el efecto de acetaminofén en ratas desnutridas en una dosis equivalente a la terapéutica. 72 ratas machos Wistar de 18 semanas de edad, con peso entre 270 y 280 g se distribuyeron en forma aleatoria en 4 grupos: A. Normal sin restricción alimentaria, B. Normal sin restricción alimentaria tratado con acetaminofén (100 mg/kg), C. Desnutrido por restricción alimentaria y D. Desnutrido por restricción alimentaria tratado con acetaminofén (100 mg/kg). Se observó disminución del peso corporal y hepático en las ratas desnutridas y en las desnutridas tratadas con acetaminofén, y de la concentración de albúmina sérica ($p < 0.001$), se demostró que la actividad de las enzimas alanino-amino-transferasa (ALT), aspartato-amino-transferasa (AST) y fosfatasa alcalina es significativamente menor ($p < 0.001$) en el grupo de ratas desnutridas tratadas con acetaminofén con respecto a otros grupos. Podemos concluir que el acetaminofén induce lesiones hepáticas en las ratas desnutridas tratadas con una dosis única no tóxica de 100 mg/kg de peso, probablemente como consecuencia de la susceptibilidad inherente a la desnutrición.

Palabras Clave: *Transaminasas, desnutrición, acetaminofén, toxicidad hepática, ratas*

Introducción

Una alimentación balanceada en calorías, proteínas, vitaminas y minerales, es esencial para fomentar el crecimiento y el desarrollo de los niños, el cual se inicia en el momento de la concepción y cesa con el fin de la pubertad.

La deficiencia en la ingesta de alimentos de los niños en edad preescolar es, en la actualidad, el problema de salud más importante de los países en desarrollo. Los niños desnutridos generalmente tienen enfermedades

Summary

Acetaminophen is used as an analgesic and antipyretic. Due to its relative safety at therapeutic dose, it is frequently used in children and in pregnant women. We evaluated the effect of a dose equivalent to the therapeutic dose of Acetaminophen in undernourished rats; 72 Wistar male rats of 18 weeks of age, with weight between 270 and 280 g, were distributed randomly in four groups: A, normal without food restriction; B, normal without food restriction treated with Acetaminophen (100mg/kg); C; undernourished by food restriction and D, undernourished by food restriction treated with Acetaminophen (100mg/kg). The results showed decreasing of body and hepatic weight in undernourished rats and in undernourished treated with Acetaminophen, significant decrease of serum albumin concentration ($p < 0.001$). It was demonstrated that activity of the enzymes alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase significantly decreased ($p < 0.001$) in the group of undernourished rats treated with Acetaminophen compared with the other groups. We concluded that the Acetaminophen induces hepatic lesions in undernourished rats treated with a single non toxic dose of 100 mg/kg of weight, probably as a consequence of the inherent susceptibility to malnutrition.

Words Key: *Transaminase, Acetaminophen, hepatic toxicity, rats*

infecciosas asociadas (infestación parasitaria, trastornos bronco-pulmonares, diarreas etc.), conocidas como enfermedades de la pobreza.

El acetaminofén por su relativa inocuidad a dosis terapéuticas es ampliamente utilizado como analgésico y antipirético en las poblaciones de alto riesgo, niños desnutridos, embarazadas, ancianos y como sustituto en los individuos sensibles a la aspirina. Sin embargo, dosis mayores de 200 mg/kg de peso corporal pueden producir necrosis centrolobulillar hepática, cambios en las

* Departamento de nutrición y alimentación. Escuela de Nutrición. Facultad de Medicina

** Departamento de farmacología y toxicología. Escuela de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida Venezuela. Correspondencia y solicitud de sobretiros: Miriam González-Mendoza. Urbanización Río Alto casa N° 44, Avenida Principal de La Pedregosa. Mérida-Mérida. Venezuela.

transaminasas y fosfatasa alcalina en el hígado, aumento de la concentración de bilirrubina y del tiempo de protrombina, (Voishm y col. 1993 y Roach-Stacey 1997). Estas dosis depletan las reservas de glutatión hepático y saturan las vías de biotransformación glucuronidación y sulfatación, expresado por un aumento en la vida media del fármaco proporcional a la necrosis hepática (Prescott-Wright 1973). El desarrollo de las lesiones hepáticas está mediado por la conversión de una pequeña fracción de la dosis a un metabolito activo, producto de una reacción catalizada por el citocromo P450, este metabolito se une covalentemente a las proteínas hepáticas, causando necrosis del tejido. El metabolito activo es el N-acetil-para-benzoquinona-imina (Snawder y col. 1994, Thacher y col. 2000); a dosis terapéutica es inactivado por conjugación con el glutatión reducido y luego excretado como metabolito de la cisteína y del ácido mercaptúrico. En 1997 Allamed y col. encontraron que una dosis intraperitoneal de acetaminofén, reduce significativamente las reservas de glutatión en ratas lactantes en comparación con ratas adultas, mientras que en las ratas en crecimiento disminuyó la depleción del glutatión. Se ha mencionado que en individuos alcohólicos desnutridos tratados con dosis terapéuticas de acetaminofén, se observa un aumento de los niveles séricos de la enzima aspartato aminotransferasa, quizá debido al uso crónico del acetaminofén o por daños en el proceso de glucuronidación del fármaco (Zimmerman-Maddrey 1995); sin embargo, estudios más recientes con alcohólicos crónicos, quienes consumieron dosis tóxicas de acetaminofén, no mostraron relación entre el consumo de alcohol y la severidad de las lesiones hepáticas (Makin-Williams 2000). Una dosis terapéutica de acetaminofén, podría causar graves lesiones hepáticas y renales en individuos desnutridos, quienes se caracterizan por presentar cambios en los niveles séricos de proteínas, ácidos grasos, derivados glucosídicos, minerales y vitaminas; nutrientes involucrados en los procesos de detoxificación de sustancias químicas, como los medicamentos.

Con la hipótesis de que el acetaminofén a dosis terapéutica, pudiera producir o agravar lesiones hepáticas en animales con desnutrición severa, nos propusimos evaluar el efecto de una dosis terapéutica de acetaminofén en ratas adultas sometidas a restricción alimentaria.

Material y métodos

Animales

72 ratas macho Wistar, de 18 semanas de edad, con peso entre 270 y 280 g, provenientes del bioterio de la Universidad de Los Andes, fueron sometidas a un periodo de adaptación a las condiciones del bioterio experimental de la Escuela de Nutrición, recibieron alimento ratarina Protinal y agua "ad libitum" durante una semana.

Drogas

Se utilizó acetaminofén Merck, lote 220785, administrado por vía endovenosa (vena central de la cola) en dosis única de 100 mg/kg de peso corporal, disuelto en una solución de propilen glicol al 80 % en agua destilada v/v, preparada a temperatura entre 37 y 40°C, para obtener la solubilización óptima del fármaco. Esta dosis se considera terapéutica para las ratas Wistar, sólo se han reportado efectos tóxicos con dosis por encima de 200 mg/kg de peso corporal (Hinson y col. 1984, Coles y col. 1988; Voishm y col. 1993).

Diseño Experimental

Las ratas se distribuyeron por el método aleatorio simple (Ugarte, 1958) en los siguientes grupos:

Grupo Normal

Constituido por 36 ratas, las cuales fueron alimentadas con ratarina Protinal y agua "ad libitum", mantenidas durante 15 días en jaulas metálicas individuales con piso de rejilla para evitar la coprofagia. Al final del lapso se dividieron en forma aleatoria en:

- A. Grupo Normal Sin Restricción Alimentaria (Normal Control).
Constituido por 12 ratas que fueron sacrificadas previa anestesia general con éter.
- B. Normal Sin Restricción Alimentaria Tratado con Acetaminofén (Normal Tratado).
Conformado por 24 ratas, que recibieron una dosis de acetaminofén y 6 horas después fueron sacrificadas previa anestesia general con éter.

Grupo Desnutrido Por Restricción Alimentaria

Constituido por 36 ratas, las cuales fueron sometidas durante 15 días a un período de restricción alimentaria del 75 % de la ingesta normal, durante este período recibieron agua "ad libitum", se les mantuvo en jaulas individuales con piso de rejilla, para evitar la coprofagia. El criterio establecido para considerar a estos animales como desnutridos, fue la pérdida de más del 30 % de peso corporal. Al finalizar este período fueron divididas en forma aleatoria en:

- C. Grupo Desnutrido por Restricción Alimentaria (Desnutrido Control).
Constituido por 12 ratas las cuales fueron sacrificadas previa anestesia general con éter.
- D. Desnutrido por Restricción Alimentaria Tratado Con Acetaminofén (Desnutrido Tratado).

Grupo formado por 24 ratas, al finalizar el periodo de restricción recibieron una dosis de acetaminofén y 6 horas después fueron sacrificadas previa anestesia general con éter.

El procedimiento de sacrificio y obtención de las muestras, se realizó en cada una de las ratas previa anestesia con éter. De inmediato se practicó la parotomía, con la finalidad de extraer el hígado, el cual fue lavado con una solución salina fría al 0,9 % para eliminar la sangre y evitar la deshidratación tisular, a continuación se registró el peso. Se tomó una muestra y se prepararon extractos crudos al 10 % p/v en una solución fisiológica fría, de acuerdo a lo descrito por Pottery y Elvehjem (1936). Además, se les extrajeron por punción de la vena cava inferior 4 mL de sangre para obtener suero, el cual se mantuvo congelado hasta el momento del análisis.

Metodología Analítica

En los homogenados de hígado se cuantificó la actividad enzimática de:

Alanino-amino-transferasa ALT (E.C: 2.6.1.2.).

La actividad de la ALT fue medida en medio alcalino, donde la intensidad del color es proporcional a la actividad enzimática (Tietz 1970), se utilizó un kit comercial. Los resultados se expresan en Unidades/Litro.

Aspartato-amino-transferasa AST (E.C.2.6.1.1.).

La actividad de esta enzima se determinó por fotolorimetría (Karmen, 1955) a través de kit comercial. Los resultados se expresan en Unidades/Litro.

Fosfatasa Alcalina (E.C: 3.1.3.1).

Consistió en medir la timolftaleína liberada en medio alcalino, cuya coloración es proporcional a la actividad enzimática; utilizando para ello el método colorimétrico de Bowers y Mc Comb, 1975. Los resultados se expresan en Unidades/Litro.

En el suero de cada una de las muestras se cuantificó albúmina sérica que se determinó por fotolorimetría (Bartholomew-Delaney 1986); mediante un kit comercial. Los resultados son expresados en g/Litro.

La absorbancia de las pruebas fotolorimétricas, correspondientes a la actividad de las enzimas AST, ALT y la Fosfatasa Alcalina y la concentración de la albúmina sérica, fue medida en un espectrofotómetro Baush & Lomb, modelo Spectronic 20.

Análisis Estadístico

Los datos son presentados como X + E.E. La prueba "t" de Student no pareada, fue utilizada para comparar los valores promedio en los grupos estudiados (Fisher y Yates, 1949). El paquete estadístico utilizado fue el statgraphic. El nivel de significación estadístico aceptado fue de $p < 0.05$.

Resultados

En el cuadro I, se presenta el peso corporal, peso hepático y niveles de albúmina sérica de las ratas normales y desnutridas tratadas con acetaminofén. Al comparar los normales con los desnutridos se observó un descenso significativo de estas variables en las ratas desnutridas control, el cual es aún mayor en las desnutridas tratadas con acetaminofén ($p < 0.001$).

El cuadro II, muestra la actividad de las enzimas alanino-amino-transferasa ALT, aspartato-amino-transferasa AST y fosfatasa alcalina en el tejido hepático, de ratas normales y desnutridas tratadas con acetaminofén. Las diferencias se observan entre los grupos desnutridos y los normales ($p < 0.001$) excepto para la fosfatasa alcalina, se observa que la actividad enzimática es menor en el grupo desnutrido tratado con acetaminofén ($p < 0.001$) que en el grupo normal y en el desnutrido control.

Discusión

Algunos estudios han señalado que la restricción prolongada de proteínas y calorías conducen a cambios anatómicos y funcionales de órganos y tejidos (Campbel y Kosterlitz, 1984). Las ratas que por períodos prolongados reciben dietas deficientes de proteínas y calorías presentan retardo

Cuadro I. Peso corporal, peso hepático y albúmina sérica de ratas normales y desnutridas tratadas con acetaminofén

	Normal		Desnutrido	
	Control n=12	Tratado n=24	Control n=12	Tratado n=24
Peso Corporal (g)	275.95 ± 1.59	273.36 ± 1.81	*193.04 ± 4.04	*187.35 ± 3.05
Peso Hepático (g)	10.05 ± 0.51	10.24 ± 0.35	*4.39 ± 0.06	*3.72 ± 0.17
Albúmina Sérica (g)	32.80 ± 0.80	32.0 ± 0.50	*24.50 ± 1.10	*24.30 ± 0.90

Los datos se expresan en X ± E.E

* $p < 0.001$ vs control normal

Cuadro II. Actividad de las enzimas alanino amino transferasa ALT, aspartato amino transferasa AST y fosfatasa alcalina en tejido hepático de ratas normales y desnutridas tratadas con acetaminofén

	Normal Control n= 12	Desnutrido Tratado n=24	Control n=12	Tratado n=24
ALT (U/L)	1422.30 ± 15.90	1436.36 ± 14.21	*583.22 ± 4.85	*515.33 ± 14.31
AST (U/L)	1096.00 ± 4.66	1106.00 ± 6.30	*658.73 ± 5.21	*611.931 ± 11.78
Fosfatasa Alcalina (U/L)	794.36 ± 52.30	817.78 ± 32.87	732.97 ± 31.16	*595.71 ± 19.61

Los datos se expresan en $X \pm EE$

* $p < 0.001$ vs control normal

en el crecimiento y desarrollo, por desnutrición de tipo marasmático (Anthony y Edozien, 1975). Nuestros resultados coinciden con estos hallazgos, en cuanto a los cambios en el peso corporal, peso hepático y en las concentraciones séricas de albúmina de las ratas desnutridas; estos cambios son significativamente mayores en las ratas desnutridas y tratadas con acetaminofén.

Estudios experimentales con ratas normales y adrenalectomizadas, han demostrado que la actividad de la enzima alanino-amino-transferasa es proporcional al contenido de proteínas de la dieta (Rosen y col. 1963): También se ha señalado que el ayuno induce una disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina, la aspartato-amino-transferasa y de la aldolasa, y que dicha disminución es proporcional a la pérdida de las proteínas hepáticas (Soberón y Sánchez, 1961); esto sugiere que en condiciones catabólicas hay una disminución de la actividad de estas enzimas.

Kwan y col. (1995) señalaron que las diferencias en la actividad metabólica y en la capacidad para sintetizar glutatión, pueden predisponer a los individuos que toman dosis terapéuticas de acetaminofén a los efectos adversos también se ha señalado que una sobredosis accidental de acetaminofén en lactantes y niños febriles agudamente desnutridos, induce un aumento de los niveles de transaminasas, por arriba de las mil unidades por litro (Heubi y col. 1998).

Nuestros resultados en animales desnutridos por restricción alimentaria del 75% de la dieta normal, a los cuales se les suministró una dosis de acetaminofén equivalente a la dosis terapéutica humana, no tóxica para las ratas muestran que los niveles de actividad de las enzimas alanino-amino-transferasa y aspartato-amino-transferasa en tejido hepático, son menores que en las ratas control. Este efecto se puede explicar por las condiciones catabólicas previas. Sin embargo, el hecho de que la actividad de estas enzimas sea significativamente menor en las ratas con restricción alimentaria y tratamiento con acetaminofén, sugiere que la desnutrición incrementa la susceptibilidad al fármaco que entonces produce lesiones hepáticas.

Con relación a la fosfatasa alcalina se ha descrito un aumento en su actividad en ratas mantenidas con dietas hipoproteicas e hiperglucídicas (Ross y Ely, 1954). En estudios previos se demostró que el ayuno prolongado induce un descenso de la actividad de esta enzima (Miller, 1948) y la restricción alimentaria aguda mantiene los valores normales, como parte del proceso adaptativo, el cual implica un aumento de la glucogénesis y del aprovechamiento de los ácidos grasos para obtener la energía que necesita el organismo (Segovia, 1982). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en niños desnutridos, en los cuales se ha observado un aumento en la actividad de la fosfatasa, que luego del tratamiento retorna a los valores normales (Mukherjee y Sarkar, 1958).

Ratas, ratones, conejos y hámster tratados con una sobredosis de acetaminofén presentan niveles elevados de fosfatasa alcalina sérica, los cuales se relacionan con la severidad de las lesiones hepáticas (Prescott, 1983). Por otra parte, las concentraciones hepáticas de esta enzima son menores, lo cual podría vincularse con la pérdida de citoplasma, evidenciada por la disminución del tamaño del hígado (Miller, 1948 González Mendoza 1991). Nuestros resultados son semejantes, con relación a los animales desnutridos no tratados con acetaminofén, mientras que el grupo desnutrido tratado con el fármaco, no recuperó la actividad de la fosfatasa después de 15 días de restricción; esta respuesta puede estar relacionada con un efecto tóxico del acetaminofén a nivel hepático potenciado por la desnutrición.

En conclusión, se demostró que el nivel de actividad de las enzimas alanino amino transferasa, aspartato amino transferasa y fosfatasa alcalina en el tejido hepático, es significativamente menor en las ratas desnutridas por restricción alimentaria tratadas con una dosis única no tóxica de acetaminofén (100 mg/Kg), lo cual sugiere que una dosis terapéutica de este fármaco es capaz de inducir lesiones hepáticas, observadas sólo en individuos normales con una sobredosis de acetaminofén (200-1000 mg/Kg), en alcohólicos crónicos y en desnutrición aguda.

Es necesario considerar que en los desnutridos ocurre una disminución de sustratos útiles para la biotransformación del acetaminofén, lo cual implica una disminución de la capacidad de glucuronidación del mismo, así se favorece la unión del metabolito tóxico, responsable de las lesiones hepáticas a las células del hígado aún cuando el fármaco sea administrado en dosis terapéuticas. Por esto la administración de fármacos como el acetaminofén, a individuos desnutridos podría convertirse en un factor agravante del estado patológico.

Fuente de Financiamiento. Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes (CDCHT- ULA)

Referencias

1. **Voishm W, Daly M, Boon A Healtley V.** Paracetamol and acute biliary pain with cholestasis. *Lancet.* 1993;342:869.
2. **Roach J, Stacy B.** Acetaminophen toxicity. *Orthop Nurs* 1997;16:49-53.
3. **Prescott LF, Wright N.** The effect of hepatic and renal damage on paracetamol metabolism and excretion following overdosage. A pharmacokinetics study. *Br J Pharmacol* 1973;49:602-613.
4. **Snawder J, Roe A, Wayne Benson R, Roberts D.** Loss of CYP2E1 and CYP1A2 activity as a function of acetaminophen dose: Relation to toxicity. *Biochem and Biophys Res Commun.*1994;203:532-539
5. **Thatcher N, Edwards R, Lemone N, Dochmer J and Davies D.** The potential of acetaminophen as a product in gene-directed enzyme proding therapy. *Cancer gene Therapy.* 2000;7:521-525.
6. **Allamed A, Vansoun E, Zarghi A.** Role of glutation conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen induced hepatotoxicity. *Mech Ageing Dev* 1997;95:71-79.
7. **Zimmermam HJ, Maddrey WC.** Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure. *Hepatology.* 1995;22 767-773.
8. **Makin A, Williams R.** Paracetamol hepatotoxicity and alcohol consumption in deliberate and accidental overdose. *QJM* 2000;93:341-349.
9. **Hinson J, Han-Hsu H, Mays J, Holts S, Mc Lean P, Ketterer B.** Acetaminophen induced alteration in blood glucose and blood insulin levels in mice. *Common Chem Pathol Pharmacol.* 1984;43:381-391.
10. **Coles B, Wilson I, Wardman P, Hinson J, Nelson S, Ketterer B.** The spontaneous and enzymatic reaction of N-acetyl-p-benzoquinoneimine with glutathione: a sloped flow kinetic study. *Arch. Biochem Biophys* 1988;264:253-260.
11. **Ugarte JM.** Bases estadísticas de la investigación médica. Universidad de Chile. Santiago. 1958.
12. **Pofter V, Elvehjem CA.** Modified method for study of the tissue oxidations. *J.Biol.Chem.*1936; 114:495-504.
13. **Tietz NW.** Fundamentals of clinical chemistry. W B Saunders, Co. 1970
14. **Karmen A.** Oxalacetate transaminase. *J Clin Invest* 1955;34:131.
15. **Bowers GN, Mc Comb RB.** Measurement of alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem* 1975;21:1988-1995.
16. **Bartholomew RJ, Delaney AM.** Colorimetric determination of seric albumin. *Proc Austral Assoc. Clin Bichem* 1986;1:214.
17. **Fisher RA, Yates F.** Tablas estadísticas para investigadores científicos. Madrid. 1949
18. **Campbel IRM, Kosterlitz HW.** The effects on dietary protein on the turnover phospholipids ribonucleic acid and deoxy-ribonucleic acid in the liver. *J. Biol. Chem* 1984;175:989-990.
19. **Anthony LE, Edozien JC.** Experimental protein and energy deficiencies in rat. *J. Nutr* 1975;105:631-648.
20. **Rosen F, Harding HR, Milholland RJ and Nichol CA.** Glucocorticoids and transaminase activity. *J Biol Chem* 1963;238:3725-3729.
21. **Soberon G, Sanchez E.** Changes in difective enzyme concentration in growing rat liver. *J Biol Chem* 1961;236:1602-1605.
22. **Kwan D, Bartie W, Walker S.** Abnormal serum transaminasas following therapeutic doses of acetaminophen in the absence of known risk factors. *Digest. Disease and Sci* 1995;40:1951-1955.
23. **Heubi J, Barbacci M, Zimmermam H.** Therapeutic misadventures with acetaminophen: hepatotoxicity after multiple doses in children. *J Pediatric* 1998;132:22-27.
24. **Ross M, Ely J.** Protein depletion and age. *J. Franklin Inst.* 1954;258:241-243.
25. **Miller L.** Changes in rat liver enzyme activity with acute inanition. Relation of loses of enzyme activity to liver protein loss. *J Bol Chem* 1948;172:113-121.
26. **Segovia LT.** Fosfatasa alcalina, proteína y ácidos nucleicos en hígado de ratas con restricción alimentaria aguda. Tesis de Ascenso. Universidad de Los Andes. Facultad de Medicina. Mérida Venezuela. 1982.
27. **Murherjee KL, Sarkar NK.** Liver enzymes in human undernutrition. *Brit J Nutr* 1958;12:1.
28. **Prescott LF.** Paracetamol overdosage. *Drug* 1983;25:290-314.
29. **González-Mendoza M.** Hepatotoxicidad del acetaminofén en ratas desnutridas. Tesis de Magíster Scientiarum. Universidad de Los Andes. Mérida Venezuela. 1991

