

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDI DEL SISTEMA GLUTATIÓ/GLUTATIÓ S-TRANSFERASA EN GLANDULA SEBACIA HUMANA
Montserrat Giralt Batista
ISBN: 978-84-691-1876-4/DL: T-339-2008

**ESTUDI DEL SISTEMA GLUTATIÓ/GLUTATIÓ
S-TRANSFERASA EN GLÀNDULA
SEBÀCIA HUMANA**

MONTSERRAT GIRALT BATISTA
REUS, 1992

Als meus amics de la
Biblioteca.

A stylized handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

T 56

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRILI
BIBLIOTECA



1700089222

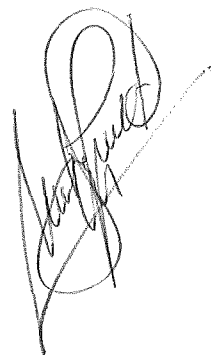
0572-60060

**ESTUDI DEL SISTEMA GLUTATIÓ / GLUTATIÓ
S-TRANSFERASA EN GLÀNDULA SEBÀCIA
HUMANA**

Tesi Doctoral presentada per
Montserrat Giralt i Batista
per optar al grau de Doctora
en Medicina i Cirurgia.

Universitat Rovira i Virgili.

Reus, 1992.



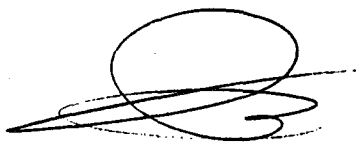
JORDI MALLOL MIRÓN, Catedràtic de Farmacologia i Terapèutica del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina de Reus (Universitat Rovira i Virgili),

CERTIFICA: que la Tesi Doctoral "Estudi del sistema glutatió/glutatió S-transferasa en glàndula sebàcia humana", presentada per Na MONTSERRAT GIRALT BATISTA, ha estat realitzada sota la seva direcció a la Unitat de Farmacologia del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina de Reus.

I, veient el treball realitzat per aspirar al títol de Doctor,

AUTORITZA la seva presentació i defensa davant del Tribunal corresponent.

Reus, 10 de setembre de 1992



Signat: J. Mallol Mirón

*Pocos libros deben ser estudiados,
muchos leídos, algunos releídos
y muchísimos experimentados.*

L. La Vista

AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada gràcies a la l'ajut incondicional de tot un equip de persones, a les quals dec el meu agraïment.

- Al Professor Jordi Mallol Mirón, Catedràtic de Farmacologia de la Universitat de Barcelona i Director d'aquesta Tesi Doctoral, per la seva dedicació, per la vàlua científica dels seus consells i perquè al llarg dels últims anys ha estat el puntal inicial per poder continuar en l'elaboració d'aquest treball traient aquelles barreres humanes i arquitectòniques que personalment m'hagi pogut trobar.

- A la Dra. Isabel Cervelló Pastor, per la seva dedicació en la realització de les tècniques immunològiques, així com pels seus suggeriments relatius a la redacció final.

- Al Dr. Eusebi Carreras Ginjaume, dels Laboratoris Carreras de Barcelona, que ha fet possible l'obtenció de la meva beca de recerca gestionada per la Fundació Juan Abelló, sense la qual hauria estat molt difícil la realització del present treball.

- A M. Rosa Nogués Llort, per la seva cooperació en l'anàlisi de lípids i radicals lliures.

- A M. Francesca Ortín Font, pel seu estímul i dedicació constants al llarg de la realització del present treball.

- A Joan Anton Sugrañes Morales, per l'assistència tècnica en les experiències de laboratori.

- A la meva germana Liduvina, pel seu suport i la seva col.laboració en la tasca de correcció ortogràfica.

- Als meus pares i germans, pel seu recolzament i ajut constants en totes les situacions difícils a les que m'he vist sotmesa al llarg d'aquests últims anys.

- A totes aquelles persones i institucions que molt amablement ens han cedit les mostres necessàries per portar a terme aquest estudi: Dr. A. Amura Taha i Sra. Begoña Crespo Varona, de la Clínica Bauern de Barcelona; Dr. Josep Antoni Bombí Latorre i Sra. Montserrat Tortosa, de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona; Dr. Jaume Planas Guasch i Sra. Antònia Belmonte Jordán, de la Clínica Planas de Barcelona; Dr. Josep M. Pons Piñol, de l'Institut Pons Juanpere de Reus; i Dra. M. Carme Padrol Martínez, de l'Hospital de Sant Joan de Reus, així com al Dr. Richard C. Strange, de la Universitat de Keele (Gran Bretanya), per haver-nos cedit els anticossos.

Finalment, voldria fer constar el meu sincer agraïment a totes les persones que en el transcurs d'aquests anys de tesi m'han brindat el seu suport tant físic com moral d'una forma espontània i voluntària, i sense les quals no hauria estat possible continuar la realització del present treball:

Dr. Frederic Mallol	Dr. Pedro Cobos	Mercedes de las Heras
Dra. Amàlia Lafuente	Dra. Verònica Piera	Agnes E. Laville
Dra. M. Teresa Colomina	Dr. Josep Tomás	Joaquim Margalef
Manel Santafé	Dr. Josep M. Olivé	Josep Ribalta
Dr. José Luis Paternain	Dr. Josep M. Masip	Jordi Balañá
Dr. Jacobo Aguilar	Bonifacia García	Esmeralda Bueno
Dra. Teresa Usabiaga	Mercè Pego	Carmen Cobos
Dr. Joan Fernández	Daniel Muñoz	Agustí García
Dr. Ramón Hernández	Manuel González	José Luis Valdivieso
Montserrat Fortuny	Família Foguet	Josep M. Plademunt
Neus García	Amparo Aguilar	Resurrección Ureta
Jaume Folch	Peter Turner	Alejandro Bermúdez

Aquesta tesi va dedicada al Gabriel, per la seva paciència i per haver cedit gran part del temps que hauria d'haver-li dedicat.

ÍNDICE

ÍNDEX

I.- INTRODUCCIÓ	1
1.- RADICALS LLIURES. CONCEPTE	2
2.- RADICAL LLIURE D'OXIGEN. CONCEPTE. ESPÈCIES REACTIVES D'OXIGEN	4
3.- MECANISMES DE FORMACIÓ. FONTS D'OXIGEN	8
4.-EFECTES DELS RADICALS LLIURES SOBRE LES ESTRUCTURES CEL·LULARS	12
4.1.- LIPOPEROXIDACIÓ	13
4.1.1.- LIPOPEROXIDACIÓ ENZIMÀTICA	14
4.1.2.- LIPOPEROXIDACIÓ ESPONTÀNIA	15
4.1.2.1.- FASE D'INICIACIÓ	16
4.1.2.2.- FASE DE PROPAGACIÓ	17
4.1.2.3.- FASE DE FINALITZACIÓ	18
5.- MECANISMES DE DEFENSA	19
5.1.- SISTEMES DE PROTECCIÓ ENZIMÀTICS	21
5.2.- ANTIOXIDANTS. <i>SCAVENGERS</i> I <i>QUENCHERS</i> ..	24
6.-ORIGEN DE LA PATOLOGIA RELACIONADA AMB RADICALS LLIURES	30
7.- GLUTATIÓ S-TRANSFERASES (GST)	39
7.1.-NOMENCLATURA DE LES GST CITOSÒLIQUES	39
7.2.-DISTRIBUCIÓ DE LES GST PELS TEIXITS	41
7.3.-GST: DIFERÈNCIES SEGONS EL SEXE	43
7.4.-MECANISME DE CATÀLISI DE LES GST	44
7.5.-FUNCIONS DE LES GST	46
7.6.-SUBSTRATS DE LES GST	49
7.7.-INHIBIDORS DE LES GST	53
7.8.-INDUCTORS DE LES GST	54

7.9.-PAPER DE LES GST EN LA RESISTÈNCIA A FÀRMACS	55
7.10.-GST I PATOLOGIA	57
8.- GSH	61
8.1.-DISTRIBUCIÓ	61
8.2.-BIOSÍNTESI I CICLE REDOX	61
8.3.-FUNCIONS DEL GSH	64
8.4.-GSH I PATOLOGIA	66
8.5.-ALTRES FUNCIONS DEL GSH	68
9.- PELL. GLÀNDULA SEBÀCIA	71
9.1.- GLÀNDULA SEBÀCIA	72
II.- HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS	78
III.- MATERIAL I MÈTODES	81
1.- ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ	82
2.- OBTENCIÓ DE MOSTRES	82
2.1.- OBTENCIÓ DE MOSTRES DE RATA	82
2.2.- OBTENCIÓ DE MOSTRES HUMANES	83
3.- CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES	83
4.- DISSECCIÓ DE LES MOSTRES	84
5.- PREPARACIÓ DE LES MOSTRES DE CITOSOL	85
5.1.- MOSTRES DE RATES	85
5.2.- MOSTRES HUMANES	85
6.- ESTUDI ENZIMÀTIC DE LA GST	86
6.1.- ACTIVITAT GST UTILITZANT COM A SUBSTRAT CDNB	86
6.2.- ACTIVITAT ISOMERASA DE LA GST	88
6.3.- ESTUDI D'INHIBICIÓ DE L'ACTIVITAT GST AMB ESTEROIDES	88
7.- ANÀLISI DEL GSH	89

8.- DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES	89
9.- PURIFICACIÓ DE L'ENZIM	90
9.1.- CROMATOGRAFIA D'INTERCANVI IÒNIC	90
9.2.- CROMATOENFOC	91
10.- IDENTIFICACIÓ D'ISOENZIMS: TÈCNiques IMMUNOLÒGIQUES	92
10.1.- ELISA	93
11.- DETERMINACIÓ DE RADICALS LLIURES	95
11.1.- DETERMINACIÓ DEL MALONDIALDEHID ...	95
11.2.- DETERMINACIÓ D'HIDROPERÒXIDS	95
11.3.- DETERMINACIÓ DELS DIENS	96
12.- DETERMINACIÓ DE LÍPIDS	97
13.- ESTUDI ESTADÍSTIC	97
IV.- RESULTATS I DISCUSSIÓ	98
1.- LOCALITZACIÓ DE L'ACTIVITAT GST EN LES DIFERENTS PARTS DEL TEIXIT	99
2.- CONSERVACIÓ DE LES FRACCIONS SOLUBLES	101
3.- ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LA GST .	101
3.1.- ACTIVITAT GST UTILITZANT COM A SUBSTRAT CDNB	102
3.1.2.- MOSTRES APARELLADES	107
3.2.- ACTIVITAT ISOMERASA DE LA GST	112
3.2.1.- ESTUDIS PREVIS EN FRACCIÓ SOLUBLE DE FETGE DE RATA	112
3.2.2.- ACTIVITAT ISOMERASA DE LA GST EN GLÀNDULA SEBÀCIA	115
3.3.- INHIBICIÓ DE LA GST PER ESTEROIDES	116
3.3.1.- MOSTRES DE FETGE DE RATA	116
3.3.2.- MOSTRES DE GLÀNDULA SEBÀCIA HUMANES	122

4.- PURIFICACIÓ DE LA GST	128
4.1.- CROMATOGRAFIA D'INTERCANVI IÒNIC ...	128
4.2.- CROMATOENFOC	129
5.- ELISA	138
6.- CONTINGUT DE GSH	139
7.- DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DEL SISTEMA GST/GSH DE LA GLÀNDULA SEBÀCIA	144
8.- RADICALS LLIURES	148
8.1.- MALONDIALDEHID	148
8.2.- HIDROPERÒXIDS	150
8.3.- DIENS	152
9.- LÍPIDS	155
10.- PROTEÏNES / g TEIXIT	162
V.- DISCUSSIÓ GLOBAL	165
VI.- CONCLUSIONS	172
VII.- BIBLIOGRAFIA	175

I.- INTRODUCCIÓ

I.- INTRODUCCIÓ

1.- Radicals lliures. Concepte

Els Radicals Lliures (RLL) han estat definits com a tota espècie amb capacitat d'existència independent que té un o més electrons desaparellats, o també com a espècies químiques amb electrons de similar *spin* direccional. Hem de recordar que els electrons, en els àtoms, ocupen regions de l'espai conegudes com a orbitals. En cada orbital hi ha com a màxim 2 electrons amb *spin* direccionals oposats.

L'estructura dels RLL està representada pel símbol R·, on el punt indica la presència d'un electró desaparellat, és a dir, un electró que està sol en l'orbital. La majoria de molècules biològiques no tenen radicals, sinó que els seus electrons estan aparellats, ja que els electrons són més estables quan estan aparellats en l'orbital (76).

Aquesta espècie és generada per un o dos mecanismes: fisió d'enllaços homolítics o transferència d'electrons. La fisió homolítica té lloc quan una molècula absorbeix la suficient energia com per causar una fenecura en un enllaç químic. El resultat és dues espècies que retenen ambdues l'electró d'unió (8, 44).

En general, els radicals són més reactius que les espècies no radicalars, encara que hi ha considerables variacions en aquesta reactivitat. Així, l'electró extern no aparellat desenvolupa un camp elèctric amb tendència a aparellar-se amb un electró arrancat a l'orbita externa d'una molècula veïna estable, que es transforma a la vegada en radical lliure.

Els radicals poden reaccionar amb altres molècules de diferents maneres. Així,

si es troben dos radicals poden combinar els seus electrons desaparellats i unir-se formant un enllaç covalent. Un radical pot donar un electró desaparellat a una altra molècula, o pot agafar un electró d'una altra molècula d'ordre parell.

Així, doncs, si un radical dóna un electró o agafa un electró a partir d'un no radical, aquest no radical es transforma en radical. Per tant, l'aspecte més important d'aquest fenomen és que s'inicia una reacció en cadena (76).

Els radicals lliures provenen, entre altres, de:

- l'àtom d'hidrogen ($H\cdot$);
- els metalls de transició, com el ferro i el coure, que tenen un paper important en els processos de lipoperoxidació;
- l'oxigen molecular, en el qual dos electrons desaparellats presents en l'òrbita externa fan un biradical que correspon a l'estat més estable d'aquesta molècula i justifica el feble poder oxidant. La captació d'energia per la molècula d' O_2 -com és el cas d'una irradiació- modifica la seva configuració electrònica externa, conduint a dues formes particularment reactives (O_2^*) anomenades oxigen singulet, una radicalar (sigma) i l'altra no radicalar (delta), les quals, a causa de la seva relativament llarga mitja vida tenen un paper molt important en les oxidacions de microorganismes;
- les molècules d'oxigen nitrogenades (NO_x), com el NO i el NO_2 , que són contaminants atmosfèrics;
- aquells anions de reaccions espontànies com és l'anió superòxid (O_2^-), resultant de la captació d'un electró per la molècula d' O_2 ;
- el radical hidroxil ($\cdot OH$), la gran inestabilitat del qual el fa un potent oxidant;
- i tots aquells que van apareixent al llarg de la lipoperoxidació, que donada la seva naturalesa esdevenen a la vegada radicals, com per exemple els radical acicloxil, acilperoxil i d'altres (154).

2.- Radical lliure d'oxigen. Concepte. Espècies reactives d'oxigen

Fridovich el 1978 cridava l'atenció sobre la paradoxa bioquímica de l'oxigen amb les següents paraules: "de la mateixa forma que JANO, l'oxigen té dues cares, una benigna i l'altra maligna, l'oxigen molecular és virtualment tòxic per a totes les formes de vida i aquesta toxicitat es fa evident en incrementar la seva concentració".

Aquesta paradoxa consisteix en què l'oxigen és essencial per a les formes de vida aeròbiques, però massa oxigen o un metabolisme inadequat d'aquest pot ser tòxic per a l'organisme. Aquesta dualitat, coneguda des de fa molts anys, està començant a ser entesa a través de les espècies actives de l'oxigen i els radicals lliures d'oxigen (RLLO)(164).

Generalment, les discussions sobre RLL en fisiologia sovint només consideren RLLO. El 1924 es va establir que l'oxigen molecular (O_2) conté electrons desaparellats. No va ser descrit com a $\bar{O}=\bar{O}$, en el qual tots els electrons estaven aparellats, sinó com a $\bar{O}-\bar{O}$. Encara que l' O_2 té una naturalesa radicalar i pot ser fins i tot un biradical (dos electrons desaparellats), no té una reactivitat extrema (11).

Els RLLO són les formes moleculars o atòmiques de l'oxigen que posseixen un nombre imparell d'electrons en l'òrbita externa, ja sigui per fixació d'un electró suplementari, per transferència d'un electró a partir de l'òrbita interna, o per la pèrdua d'un electró de l'òrbita externa.

Els RLLO són molt reactius i tenen una gran capacitat de participar en reaccions en cadena, formant una cascada de radicals lliures susceptibles de desnaturalitzar i de destruir nombroses molècules biològiques (89).

Freqüentment, el terme "radical d'oxigen" és mal utilitzat, essent assignat a tots

els reactius intermedis de les espècies de l'oxigen, incloent-hi totes les formes moleculars que no són radicals. Estaria més indicat parlar de "espècies reactives d'oxigen", en lloc de radicals lliures d'oxigen.

Tota la literatura existent discuteix sobre les espècies reactives d'oxigen, promulgant el coneixement d'aquestes espècies, que són vistes com a extremadament reactives i a la vegada destructives de l'organisme. S'ha de tenir en compte que la química dels radicals lliures ha tingut un paper essencial en l'origen de les formes de vida aeròbiques. Així mateix, és obvi que les reaccions on intervenen radicals són una part de l'homeostasi dels processos cel·lulars (11).

Aquestes espècies actives d'oxigen (reduïdes) tenen els seus corresponents sistemes enzimàtics intracel·lulars que les neutralitzen i del quals parlarem més endavant. Per extensió, les substàncies -ja siguin de naturalesa enzimàtica o no- que eliminen RLLO reben el nom d'antioxidants (*scavengers*) (164).

S'han descrit molts tipus de RLLO:

- el radical superòxid és una molècula d'oxigen que ha fixat un electró extern suplementari. Es representa amb el símbol $O_2^{\cdot-}$, on el punt "." simbolitza l'electró desaparellat del radical lliure. Si bé aquest radical no és una espècie particularment reactiva, pot fàcilment travessar lípids de membrana per mitjà dels canals d'anions i reduir altres radicals lliures molt més reactius, com el radical hidroxil (OH^{\cdot}) i el radical perhidroxil (HO_2^{\cdot}), per exemple (8).

- El radical hidroxil, OH^{\cdot} , és el resultat de la descomposició de l'aigua oxigenada, H_2O_2 . Està format a partir del radical superòxid i és encara més reactiu que el primer i amb una vida més curta. La formació dels radical hidroxil de l' H_2O_2 pot ser catalitzada per productes que continguin ferro, com la ferritina, hemoglobina o mioglobina. A l'igual que l'anió superòxid $O_2^{\cdot-}$, són

formats per processos enzimàtics estimulats per aports energètics, sobretot sota la forma de radiacions ultraviolades (UV), lumíniques o ionizants.

- L'oxigen singlet, $^1\text{O}_2$, igualment molt agressiu, no és un RLLO, però sí una molècula d'oxigen excitada, la qual, sota l'acció directa d'un quant d'energia, ha transferit un electró de l'òrbita interna a l'òrbita externa (56).

Les espècies reactives d'oxigen, moltes de les quals són radicals lliures d'oxigen i estan involucrades en el dany oxidatiu, es poden veure a la taula 1 (173).

Compost	Característiques
O_2^- , anió superòxid	Un electró en estat reduït, format en moltes reaccions d'autooxidació.
$\text{H}_2\text{O}^\bullet$, radical perhidroxi	Forma protonada de l' O_2^- , més liposoluble.
H_2O_2 , peròxid d'hidrogen	Estat reductor amb dos electrons, format a partir d' O_2^- (HO_2^\bullet) per dismutació o directament de l' O_2^- .
OH^\bullet , radical hidroxil	Estat reductor amb tres electrons, format per la reacció de Fenton, reacció Haber-Weiss ; altament reactiu.
RO^\bullet , radical alcoxi	Radical orgànic d'oxigen central (ex. lípid).
ROO^\bullet , radical peroxi	Format a partir d'hidroperòxid orgànic, ROOH , per abstracció d'hidrogen.
$^1\text{O}_2$ oxigen singlet	Estat primari d'excitació.
RO (també RO^*)	Carbonil excitat (ex. format via dioxetane com a intermediari).

TAULA 1.- Espècies reactives d'oxigen d'interès en l'estrès oxidatiu (extret de la ref. 173).

Així, doncs, la seqüència univalent habitual de reducció de la molècula d'oxigen resulta en la formació de l'anió superòxid ($O_2^{\cdot-}$), que es converteix en peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i aquest en radical hidroxil (OH^{\cdot}) (fig. 1).

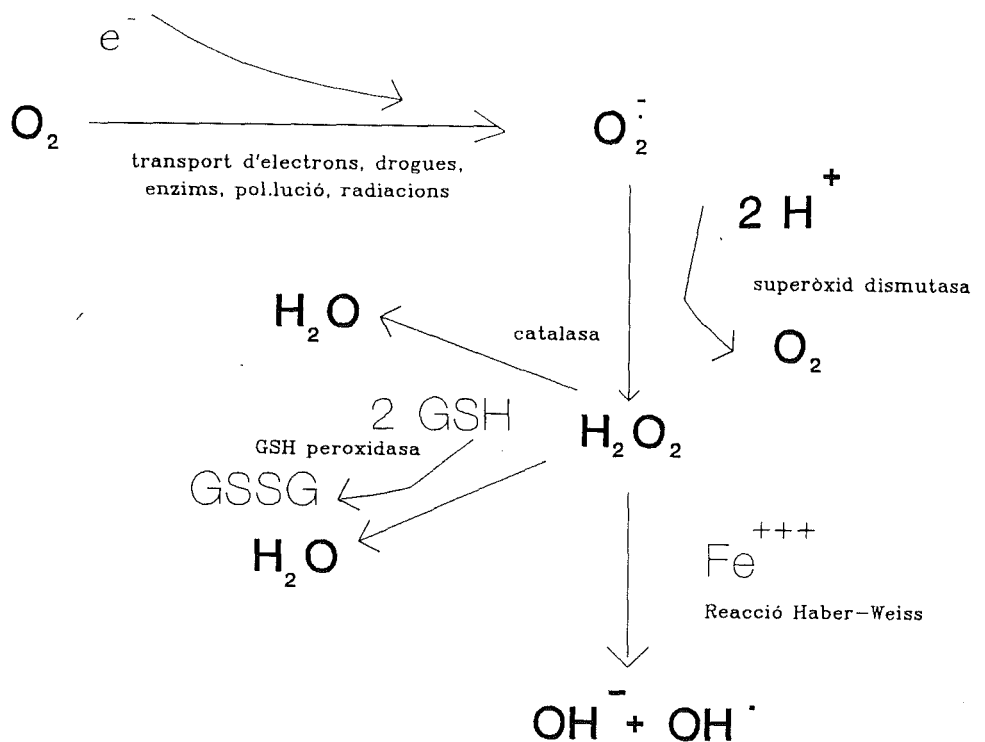


Fig. 1.- Producció de radical superòxid ($O_2^{\cdot-}$); radical hidroxil (OH^{\cdot}) i peròxid d'hidrogen (H_2O_2) (extret de la ref. 105).

3.- Mecanismes de formació. Fonts d'oxigen

El nostre organisme produeix constantment formes actives de l'oxigen i RLLLO per mitjà de mecanismes molt diversos (taula 2).

<p>Extracel.lulars</p> <ul style="list-style-type: none"> Substàncies i agents que produeixen radicals lliures d'oxigen Fum de cigarrets Llum solar Oxidació de fàrmacs (paracetamol, tetraclorur de carboni) Radiacions ionitzants Shock tèrmic Substàncies cícliques de naturalesa REDOX (paraquat, diquat, al.loxà, dexorrubicina...) Substàncies que oxiden el glutatió <p>Intracel.lulars</p> <ul style="list-style-type: none"> Enzims oxidants involucrats Cicloxigenasa Galactosa-oxidasa Indolamín-dioxigenasa Lipo-oxigenasa Monoamino-oxidasa Xantín-oxidasa Triptòfan-dioxigenasa <p>Cèl.lules fagocítiques</p> <p>Cèl.lules endotelials</p> <ul style="list-style-type: none"> Eosinòfils; macròfags; monòcits; neutròfils
--

TAULA 2.- Fonts de radicals lliures extracel.lulars i intracel.lulars (extret de la ref. 164).

Aquests mecanismes depenen de l'agent inductor i de la resposta cel.lular. Així, destaquen:

a) l'oxigen hiperbàric. Una pressió parcial elevada d'oxigen, com per exemple a nivell dels alvèols pulmonars, incrementa significativament la formació d' $O_2^{\cdot-}$. En aquest sentit, durant la recuperació dels estats anòxics, la reoxigenació sobtada i massiva d'un òrgan isquèmic (reperfusió) s'acompanya paradoxalment d'un agreujament del dany cel.lular (paradoxa de l'oxigen) que és, en efecte, la conseqüència d'una hiperoxidació d' $O_2^{\cdot-}$, lligada per ella mateixa a l'augment del flux d' O_2 per la via de la seva reducció univalent, així com per la perturbació del sistema enzimàtic d'oxidació de la xantina. Aquests processos han estat tots particularment estudiats en la isquèmia miocàrdica i intestinal (154);

b) les radiacions ionitzants, generades per les explosions atòmiques, provoquen la formació de grans quantitats de radicals lliures que seran els responsables de les anomalies cromosòmiques lligades al seu efecte sobre l'ADN;

c) les reaccions en presència de ferro tipus Fenton;

d) la cadena de transport mitocondrial d'electrons pot alliberar petites quantitats d'espècies actives de l'oxigen que produeixen alteracions en els lípids i citocroms;

e) els fàrmacs que indueixen proliferació de peroxisomes com el clofibrat i fàrmacs antineoplàstics, en els quals l'eficàcia està lligada a la seva transformació en radical, causant el dany irreversible dels enzims, membranes i ADN de les cèl.lules tumorals (154);

f) els inhibidors de sistemes defensius antioxidants, com l'azida, la hidroxilamina, l'aminotriazol, que inhibeixen les catalases, i l'àcid ditiocarbàmic, que inhibeix la superòxid dismutasa (SOD);

g) els agents actius sobre les membranes cel.lulars i que són importants sota el punt de vista de la carcinogènesi, entre els que tenim lectines, teleodicina,

mezerines, l'alfa toxina B₁, el benzopirè, l'asbest i la sílice (164, 38);

h) les radiacions ultraviolades i les radiacions de l'espectre visible que intervenen com a quants d'energia a nivell de la pell, estimulant la formació de superòxids i d'oxigen singulet. El paper de les irradiacions còsmiques a la capa d'ozó atmosfèrica està igualment involucrada en la formació de radicals lliures, sobretot en la pell (164);

i) nombroses molècules estranyes a l'organisme són l'origen d'una producció indirecta d'O₂^{•-}. Així, durant el metabolisme pulmonar, el paraquat (PQ⁺⁺) és reduït per un enzim a una forma radicalar catiònica (PQ⁺), on la reoxidació en PQ⁺⁺ per O₂ produeix importants quantitats d'O₂^{•-}; origen, via H₂O₂, dels ·OH responsables de la toxicitat pulmonar d'aquest herbicida iniciant la lipoperoxidació (154);

j) les cèl.lules dotades de propietats fagocitàries: polinuclears, macròfags, etc., sota la influència d'estímuls bacterians o proinflamatoris, produeixen fisiològicament els radicals lliures d'oxigen, que els permeten destruir els microorganismes. Al mateix temps, la formació de RLL pot alterar altres molècules i contribuir als processos inflamatoris.

Per tant, es formen en el normal funcionament de les cèl.lules, però aquesta producció pot ser molt incrementada com a resultat de les situacions abans esmentades.

En síntesi, qualsevol substància que pugui patir reduccions podria formar un radical que després reacciona amb l'O₂ i genera O₂^{•-} (164).

La forma d'originar-se les diferents espècies actives d'oxigen (anió superòxid, radical hidroxil, peròxid d'hidrogen i oxigen singulet) a partir d'aquestes situacions es detalla a continuació:

l'anió superòxid, O_2^- , és el RLL més abundantment produït. Particularment és format pels fagòcits: la seva estimulació, per exemple pels pèptids bacterians, condueix a l'activació d'una NADPH oxidasa amb la conseqüència de la producció massiva d' O_2^- i al preu d'un fort consum d' O_2 i NADP reduït, regenerat gràcies a la estimulació concomitant de la via de les pentoses fosfatases.

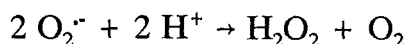
La producció d' O_2^- per aquests fagòcits, com ja s'ha dit, és l'element clau dins el mecanisme de defensa contra les bactèries: per als polimorfonuclears (PMN), per exemple, la conversió successiva d' O_2^- en H_2O_2 per una superòxid dismutasa (SOD), a més d' H_2O_2 en ClO^- per una mieloperoxidasa, proporciona a aquestes cèl.lules aigua oxigenada i hipoclorit, que tenen poder bactericida (44).

La cadena mitocondrial de respiració cel.lular contribueix igualment a produir una quantitat important d' O_2^- per reducció monoelèctrica d' O_2 .

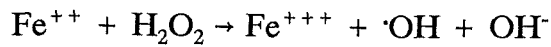
L'activació d' O_2 en la reacció d'hidroxilació citocrom P_{450} -depenent produeix igualment O_2^- , i el mateix passa amb diferents oxidases (per exemple la xantina oxidasa, responsable normalment de la conversió de la xantina en àcid úric) i amb altres sistemes enzimàtics implicats dins el metabolisme oxidatiu de molècules estranyes a l'organisme.

El radical hidroxil, $\cdot OH$, molts milers de vegades més reactiu que l' O_2^- , és igualment format pels nostres teixits secundàriament a la formació d' O_2^- i H_2O_2 , per un mecanisme on participen els cations Fe^{2+} , Fe^{3+} (44).

Es fa en dues etapes successives. La primera consisteix en la seva dismutació catalitzada per la superòxid dismutasa (SOD), donant com a resultat la formació simultània d'un compost oxidat (peròxid d'hidrogen, H_2O_2) i d'un compost reduït (O_2), segons l'equació:



El radical $\cdot\text{OH}$ és seguidament format a partir d' H_2O_2 per la reacció de Fenton:



o per la reacció d'Haber Weiss, que tan sols es desenvolupa ràpidament en presència de traces de ferro, formant-se conjunts de baixa massa molecular, que tenen paper catalitzador (154).

Alguns d'aquests metabòlits d' O_2 tenen una vida molt curta, per exemple de l'ordre de 10^{-9} segons per a l' $\cdot\text{OH}$; altres metabòlits actius, com l' H_2O_2 , són molt més estables (164).

L'oxigen singulet, $^1\text{O}_2$, format sobretot per l'activació fotoquímica d' O_2 , com hem dit abans no és un radical lliure; només sembla tenir un paper mínim dins el conjunt d'efectes tòxics de les diferents formes actives de l'oxigen i els radicals lliures d'oxigen, com $\text{RO}\cdot$ i $\text{ROO}\cdot$ (38).

4.-Efectes dels radicals lliures sobre les estructures cel.lulars

Aquestes espècies reactives d' $\text{O}_2\cdot^-$ comporten importants desordres moleculars: formació de radicals lliures secundaris, unions inter- o intramoleculars, oxidacions, halogenacions i fragmentacions. Els lípids de membrana són un blanc privilegiat per a aquests RLL, a partir de la seva estructura (poliinsaturació d'àcids grassos) i la seva organització particular, que permet el fenomen de "propagació". La seva peroxidació condueix a nombrosos derivats que constitueixen a la vegada una prova instantània de la intensitat acumulada dels fenòmens d'oxidació cel.lular: hidroperòxids lipídics, aldehids (malonildialdehid, MDA, 4-OH nonenal), diens conjugats, hidrocarburs i conjugats fluorescents (lipofucsina). Alguns d'aquests derivats tenen capacitat d'activitat biològica (acció quimiotàctica i efectes sobre la divisió cel.lular).

Altres efectes dels RLL, resulten de la seva acció sobre els polisacàrids (despolimerització de l'àcid hialurònic), les proteïnes (modificacions químiques d'alguns aminoàcids -Met, Trp, His, Cys- crucials per a la funció enzimàtica, unions, fragmentacions de les cadenes peptídiques) o els àcids nucleics (trencaments cromosòmics) (44).

Dins de tot aquest ventall d'efectes que poden produir els RLLO sobre les diferents estructures cel.lulars (taula 3), el fenomen que presenta més significació biològica és el que es produeix sobre els àcids grassos: la lipoperoxidació, que, a part del dany que produeix per si sola, pot ser origen dels diferents efectes sobre la resta d'estructures cel.lulars. Per aquest motiu creiem necessari fer una sipsosi d'aquest procés.

Blanc	Efecte
Lípids	Peroxidació dels àcids grassos, alterant la permeabilitat.
Proteïnes	Oxidació dels grups sulfhidrils, resultant en: activació d'enzims latents; inactivació de α_1 -antitripsina; inactivació d'enzims.
ADN	Trencament, resultant consum de NAD i desaparellament de síntesi d'ATP.

TAULA 3.- Efectes dels radicals lliures en les molècules biològiques (extret de la ref. 187).

4.1.- Lipoperoxidació

La lipoperoxidació es produeix constantment; és un procés que es pot desenvolupar amb l'ajut d'enzims, o també de forma espontània, com a resultat d'un encadenament de reaccions radicalars.

La lipoperoxidació enzimàtica, indispensable per a l'organisme, condueix a la formació d'eicosanoids molts diversos, biològicament molt actius, que contribueixen a l'acció bactericida en el focus infecciós.

En canvi, la lipoperoxidació espontània es revela molt desastrosa. En les condicions fisiològiques normals, reflecteix la toxicitat de l'oxigen. Com a resultat de l'activitat metabòlica normal i també del consum de l'O₂, es formen productes que són inexorablement molt reactius (estat singulet, anió superòxid, radical hidroxil) i que estan fortament implicats en la iniciació d'aquest procés. Si això, a la vegada, s'acompanya de la manca i/o desbordament dels sistemes de defensa, ocasiona una major desorganització cel.lular.

Pot ser també induïda la lipoperoxidació per espècies químiques de tipus radicalar o per intermediaris radicalars resultants del metabolisme d'alguns xenobiòtics. La lipoperoxidació correspon essencialment als àcids grassos poliinsaturats (AGP) lliures o integrats dins d'estructures lipídiques (AGP de lecitines de membranes cel.lulars, per exemple).

4.1.1.- Lipoperoxidació enzimàtica

La lipoperoxidació enzimàtica engloba les reaccions següents, on els àcids linoleic, araquidònic i linolènic són respectivament l'origen de tres grups d'eicosanoids, incloent totes les prostaglandines (PG) i els tromboxans (Tx), endoperòxids cíclics, així com els leucotriens (LT), conjugats triens.

Sota l'acció d'una dioxigenasa, la 5-lipoxigenasa, dos àtoms d'oxigen són incorporats a l'àcid araquidònic, fent aparèixer una agrupació hidroperoxil (-OOH). Per dues deshidratacions successives, aquest eicosanoid es transforma en leucotriè A₄ i a partir d'aquest en B₄, i tots dos tenen un paper important en les reaccions inflamatòries pel seu poder d'atracció i activació de les cèl.lules fagocítiques, com són els leucòcits polimorfonuclears i els macròfags.

La peroxidació de l'àcid araquidònic per la ciclooxigenasa, en presència d'O₂, acaba en la formació d'endoperòxids: PG G₂ a partir de PG H₂, la qual es transforma també en endoperòxids amb gran activitat biològica, com:

- les diferents prostaglandines amb propietats hormonals molt complexes;
- el tromboxà A₂ (TxA₂) amb poder agregant sintetitzat per les plaquetes;
- la prostaciclina (PGI₂) amb poder antiagregant produït pels endotelis vasculars.

Així, doncs, en les cèl.lules fagocítiques activades, la producció d'anió superòxid, radical hidroxil i hipoclorit tenen un paper essencial en la defensa contra els virus i les bacteries.

Les fagocitosis s'acompanyen d'una "explosió respiratòria" consistent en un fort augment del consum d'O₂, afavorint simultàniament la despolimerització de l'àcid hialurònic, la desnaturalització de l'ADN i del colagen, la inactivació d'alguns enzims i l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats de les estructures lipídiques cel.lulars.

Aquest paper específic de l'O₂⁻ es confirma per l'existència d'una malaltia molt greu als nens, de transmissió recessiva lligada al sexe: la granulomatosi crònica, que es caracteritza per episodis infecciosos evolutius, però no pas per la supuració, sinó per la formació de granulomes. Els radicals bactericides, O₂⁻, H₂O₂ i ·OH, no són produïts pels polimorfonuclears neutròfils, a causa d'un dèficit de NADPH oxidasa.

4.1.2.- Lipoperoxidació espontània

La lipoperoxidació espontània és un procés oxidatiu que afecta essencialment els àcids grassos poliinsaturats. Es tracta d'un encadenament de reaccions radicalars organitzada en 3 fases successives:

- fase limitant d'iniciació,
- fase explosiva de propagació,

- fase d'acabament.

4.1.2.1.- Fase d'iniciació

La fase d'iniciació consisteix en la creació d'un radical d'àcid gras per substracció d'un atom d'hidrogen (H \cdot) amb l'ajut d'una espècie radicalar provinent la majoria de vegades de l'O $_2$, però que també pot ser un metabòlit radicalar de xenobiòtics o una molècula radicalar de la contaminació (NO $_x$, per exemple).

Com ja s'ha comentat, diferents processos (transferència d'electrons en la cadena respiratòria mitocondrial, fagocitosi, catabolisme peroxisomal, metabolisme de fàrmacs, oxigen hiperbàric, etc.) produeixen constantment, per reducció d'O $_2$, un radical lliure, l'anió superòxid O $_2^{\cdot-}$.

L'O $_2^{\cdot-}$ és l'origen de dos dels principals iniciadors de la lipoperoxidació, que són els radicals hidroxil -format a partir d'H $_2$ O $_2$ - i l'hidroperòxid, \cdot OOH, resultant de la protonació d'O $_2^{\cdot-}$.

Ha estat calculat que cada hepatòcit produeix 46 \cdot OH per segon. Això es reconeix com a suficient per produir importants perturbacions si els sistemes de protecció són insuficients.

La fase d'iniciació consisteix, doncs, en la substracció d'un àtom d'hidrogen (H) a un grup metilen (-CH $_2$ -) d'una cadena acetilada d'àcids grassos essencialment poliinsaturats (LH). L'energia necessària per a aquesta operació varia en funció del voltant estructural del grup metilen. La fase d'iniciació condueix a la formació d'un radical lliure d'àcid gras poliinsaturat, estabilitzant-se per un remanent electrònic i conduint a la formació de dos diens conjugats.

4.1.2.2.- Fase de propagació

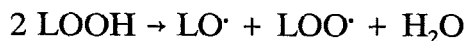
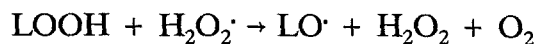
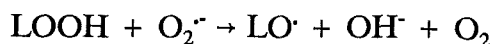
Aquesta etapa explosiva d'amplificació es desenvolupa en presència d'O₂, la concentració del qual en el teixit i la sang és molt superior a la necessària. És aleshores quan assisteix a la formació d'un radical peroxil (LOO·) per combinació de L· amb O₂. El radical LOO· actua a la vegada sobre una altra molècula de LH, formant així un hidroperòxid (LOOH) i un nou L· que assegura la propagació de la cadena de peroxidació.

S'admet generalment que cada radical L· pot ser l'origen d'un centenar de molècules d'hidroperòxids abans que acabi la fase de finalització del procés. Els hidroperòxids (LOOH) són inestables; la seva descomposició implica la presència de formes ionitzades de metalls de transició (ferro, coure) d'estructures hemíniques (hemo, metahemoglobina, citocrom). Es tracta d'un procés complex concernent no només a la formació de radical alcoxil (LO·) i alquilperoxil (LOO·), sinó també a aquella de diferents espècies anomenades "de tall" (alcans, aldehids, àcids) per ruptura d'enllaços covalents.

Sembla ser que tots els complexos de ferro que participen *in vivo* en la formació del radical ·OH són necessaris per al catabolisme dels hidroperòxids. Malgrat això, el ferro lligat a la transferrina i a la lactoferrina no sembla promoure la descomposició d'hidroperòxids lipídics. L'estimulació d'aquests processos de descomposició pel ferro a pH 7 és molt més eficaç amb Fe⁺⁺ que amb Fe⁺⁺⁺. A més, és accelerat paradoxalment per petites quantitats (traces) de vitamina C. En conclusió, els hidroperòxids donen lloc esquemàticament a dos tipus de radicals:

- alguns (LO·, LOO·) tenen un nombre d'àtoms de C idèntic al de l'àcid gras poliinsaturat del qual parteixen (LH);



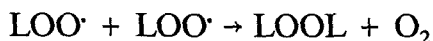


- altres (L[·]), resultants de reaccions de tall, presenten un nombre d'àtoms de C més baix que l'àcid gras poliinsaturat d'origen.

4.1.2.3.- Fase de finalització

Aquesta última etapa consisteix en la formació de compostos estables resultants de l'associació d'espècies radicalars.

La fase de finalització comporta els tres tipus de reacció següents:



No es pot oblidar, al llarg d'aquesta fase d'aturada, la intervenció de captadors (*scavengers*) fisiològics de radicals i en particular d'alfa-tocoferol (vitamina E), que, present en les estructures lipídiques de membrana, es converteix d'un radical fàcilment transformable a una estructura estable, aturant-se així el procés de propagació.

És a dir, els radicals hidroperòxids LOO[·] es formen a partir dels àcids grassos poliinsaturats, d'una manera directa, controlada per efecte de l'activitat enzimàtica (cicloxigenasa, lipoxigenasa), o d'una manera indirecta, espontània,

incontrolada i autoamplificada, per l'acció d' $O_2^{\cdot-}$ sobre els àcids grassos poliinsaturats dels fosfolípids de membrana (154).

Els peròxids lipídics es descomponen i produeixen una varietat de productes, incloent età, pentà i diferents aldehids. El més important aldehyd produït és el malonilaldehyd ($CHO-CH_2-CHO$), el qual forma bases de Schiff amb amines de proteïnes, fosfolípids i àcids nucleics. Els productes d'aquesta reacció són biomolècules amb enllaços extraordinaris, que en moltes ocasions no són digerits en els lisosomes i s'acumulen al llarg de l'edat (105).

5.- Mecanismes de defensa

Els sistemes de protecció contra els processos radicalars de peroxidació lipídica són indispensables en la vida cel.lular (taula 4).

En el medi intracel.lular, aquesta protecció està assegurada:

- pels enzims citosòlics, que catalitzen l'eliminació d' $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 reduint al màxim la formació de $\cdot OH$;
- i per les molècules amb capacitat de fixar i de destruir els radicals lliures: els *scavengers* (netejadors); o els neutralitzants de l'oxigen singulet: els *quenchers* (amortidors), tals com la vitamina E, el glutatió, etc...

Scavengers i enzims són principalment endocel.lulars, fet que deixa la pell relativament desprotegida a causa de la important presència d'espai conjuntiu extracel.lular (35).

A la inversa del medi intracel.lular, el compartiment extracel.lular només disposa de febles mitjans de protecció. Així, en la zona inflamatòria l' $O_2^{\cdot-}$ produït per les cèl.lules fagocitàries activades exerceixen localment, d'una manera quasi exclusiva, el seu potencial tòxic envers les membranes plasmàtiques (154).

Sistema	Característiques
No enzimàtics	
α -tocoferol (vitamina E)	Dins la membrana; receptor? regeneració a partir del radical cromanoxil
Ascorbat (vitamina C)	Soluble en aigua
Glutatió (GSH)	
Flavonoids	Antioxidant vegetal
Compostos químics	Additius alimentaris, per exemple, BHA (hidroxianisol butilat), i BHT (hidroxitoluè butilat); compostos tiols (precursors de GSH); enzims mítics (per exemple, ebselè, CuDIPS)
β -caroten	<i>Quenchers</i> de l'oxigen singulet
Urat	<i>Quenchers</i> de l'oxigen singulet, scavenger radical?
Proteïnes plasmàtiques	Ceruloplasmina
Enzimàtics	
Superòxid dismutasa	Enzim CuZn, enzim Mn
GSH peroxidases	Enzim seleni-depenent; no seleni-depenent: algunes GSH S-transferases, per exemple, isoenzims citosòlics B i AA, i matriu mitocondrial
Catalasa	Enzim hemínic; predominant en peroxisomes
Enzims auxiliars	
NADPH-quinona oxidoreductasa	
Epòxid hidrolasa	
Enzims de conjugació	UDP-glucoroniltransferasa Sulfoniltransferasa GSH S-transferasa
GSSG reductasa	
Subministradors NADPH	Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, 6-fosfogluconat deshidrogenasa, isocitrat deshidrogenasa, enzim màlic
Sistemes de transport	Exportació de GSSG i de conjugats

TAULA 4.- Sistemes biològics de defensa antioxidant (extret de la ref. 173).

El nostre organisme disposa, en efecte, de nombrosos sistemes de protecció.

5.1.- Sistemes de protecció enzimàtics

. Les superòxid dismutases (SOD)

Les superòxid dismutases (SOD) catalitzen la reacció de dismutació que transforma dos radicals superòxids en aigua oxigenada i oxigen molecular (veure apartat 3) (56).

És tan gran la seva eficàcia que augmenta la velocitat d'aquesta reacció espontània amb un factor de 10^4 a 10^5 . Són metaloenzims en el si dels quals el metall del lloc catalític és successivament reduït després de ser oxidat per l' $O_2^{\cdot -}$ (44).

Hi ha dues formes de SOD en les cèl.lules eucariotes. La més important és la SOD citosòlica, present en totes les cèl.lules; és un homodímer de 32.500 daltons que conté coure i zinc, on el coure és essencial per a l'activitat catalítica i el zinc contribueix a l'estabilitat de l'enzim. El gen que codifica aquesta estructura es troba al cromosoma 21. La trisomia 21, responsable del mongolisme, es considera un model d'envelliment humà accelerat. Es tradueix en augment de més del 50% de la concentració i de l'activitat SOD coure/zinc, comportant una producció excessiva d' H_2O_2 , que per l'intermediari de $\cdot OH$ serà l'origen d'una intensa lipoperoxidació cel.lular, com sembla confirmar-ho la hiperactivitat de la glutatió peroxidasa i del *shunt* de les hexoses monofosfat.

L'altre enzim és mitocondrial, és un homotetràmer (pes molecular 95.000) que només té el Mn com a cofactor. El seu gen es troba al cromosoma 6 (154, 67).

Aquest mecanisme és particularment avantatjós pel que fa a la qüestió energètica, ja que no requereix ni consumeix cofactors.

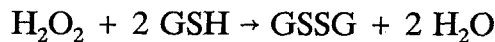
En la dermis no hi ha SOD, i en els queratinòcits és la tioredoxina reductasa la que fa funció SOD (197).

. La glutatió peroxidasa (GPx)

La GPx és un enzim seleni-depenent format per 4 subunitats idèntiques que porten cada una, en el lloc actiu, un àtom de seleni sota la forma de selenocisteïna, és a dir, una cisteïna en la qual l'àtom de sofre és reemplaçat per un àtom de seleni.

Existeixen dues formes, una intracel.lular (citosòlica i mitocondrial) i una extracel.lular rica en ponts disulfurs. Provenen de dos gens diferents situats en el cromosoma 3 (67).

Amb la intervenció del GSH reduït, catalitza la reducció de l'aigua oxigenada (H_2O_2) i dels hidroperòxids (LOOH):



L'eficàcia de la GPx va molt lligada a la de la glutatió reductasa (GR), la qual necessita per a la seva acció el NADPH, que li és subministrat pel *shunt* de les hexoses monofosfat per acció de la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa. La GPx és molt sensible a la inactivació per $O_2^{\cdot-}$. Particularment activa dins l'hepatòcit, la GPx limita en totes les cèl.lules la producció de $\cdot OH$, assegurant la degradació d' H_2O_2 en el seu citosol i les seves mitocondries.

En l'eritròcit, és ella qui assegura l'eliminació d' H_2O_2 ; la catalasa no intervé fins que la concentració d'aquest peròxid és superior a $10^{-6}M$. En els subjectes afectats d'acatalàsia congènita, la duració de la vida de l'eritròcit és normal.

La reducció per la GPx dels hidroperòxids d'àcids grassos de fosfolípids de membrana necessita l'acció de la fosfolipasa A₂. Aquest enzim, l'activitat del qual és funció del nivell de lipoperoxidació, allibera preferentment els àcids grassos peroxidats. Així, participa en la reparació de membranes permetent el reciclatge dels fosfolípids pels àcids grassos no peroxidats (154, 44).

Per tant, sembla ser que la destrucció de l'H₂O₂, i de manera general, de tots els hidroperòxids orgànics (R-OOH), la porta a terme la glutatió peroxidasa seleni-depenent (Se-GPx). Això, entre altres factors, explica la importància nutricional de l'oligoelement seleni.

Contràriament a l'acció de la SOD, energèticament neutra, l'activitat de la SeGPx és metabòlicament "costosa": en efecte, la regeneració del GSH, del qual la cèl.lula només en disposa en quantitats limitades, depèn de la glucosa 6-fosfatasa (44).

. La catalasa

L'acció de la SeGPx ha de ser completada per alguns sistemes eliminadors d'H₂O₂, sistemes que intervenen com a segona línia de defensa. Aquest és per exemple el paper de la catalasa. Tot i això, el seu paper és limitant, ja que aquest enzim només és present en els peroxisomes i presenta una afinitat pel hidroperòxids molt inferior a la SeGPx (154, 67).

Localitzada essencialment, doncs, en els peroxisomes, la catalasa presenta una activitat peroxidasa que li permet de descompondre molt ràpidament el peròxid d'hidrogen.

Aquest enzim homotetràmeric (pes molecular 240.000) està constituït per 4 grups prostètics hemínics, en el si dels quals el ferro està sempre sota la forma fèrrica (154).

. La glutatió transferasa

Alguns hidroperòxids poden engendrar epòxids i endoperòxids que no són substrats de la glutatió peroxidasa. La primera etapa de descomposició d'aquests compostos és catalitzada per una glutatió S-transferasa, família d'enzims dimèrics que catalitzen la conjugació de glutatió reduït amb una àmplia varietat de compostos electrofílics, incloent drogues, carcinògens i productes de la lipoperoxidació (116). Les glutatió S-transferases són més àmpliament distribuïdes i representen al voltant del 5% de les proteïnes citosòliques dels hepatòcits i de les cèl.lules renals. Aquests enzims que catalitzen la formació de compostos d'addició amb el glutatió reduït, condueixen a la formació d'hidroperòxids glutationils i epòxids glutamils. Aquests derivats, després de l'acció de la τ -glutamil transferasa (τ -GT) i d'una peptidasa, alliberen, successivament l'àcid glutàmic i la glicina, i són transformats en tiol-éster-S-cisteïnils, en els quals l'acetilació per l'acetil CoA condueix a la formació de productes de detoxificació que són els àcids mercaptúrics (fig. 2) (154).

Altres reaccions enzimàtiques estan involucrades indirectament en la formació del tripèptid glutatió (GSH), com per exemple la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa i la glutatió reductasa, que són necessàries per a la producció de NADPH i per a la reducció del glutatió oxidat (GSSG) en reduït (GSH).

L'objectiu és mantenir molt baixa la concentració intracel.lular de O_2^- (10^{-11} - 10^{-12} M) i H_2O_2 (10^{-7} - 10^{-9} M) (89).

5.2.- Antioxidants. *Scavengers* i *quenchers*

L'acció protectora dels enzims citosòlics és completada pels diferents reactius presents en les estructures lipoproteiques de membrana (α -tocoferol, i en menor mesura vitamina A i carotenoides) i en el citosol (àcid úric, glutatió reduït, cisteïna).

Els *scavengers* (terme anglès que significa, com ja hem esmentat, "netejadors") són les molècules, presents en les cèl·lules, que tenen la propietat de bloquejar i de destruir els radicals lliures oxigenats, essent ells mateixos modificats o destruïts.

Scavengers i *quenchers* són principalment endocel·lulars; participen, doncs, poc a la defensa extracel·lular. Són consumits immediatament quan actuen, la qual cosa significa que poden ser esgotats.

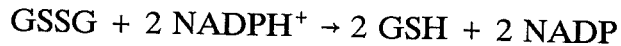
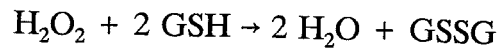
Els líquids extracel·lulars disposen d'escassos mitjans de defensa. Són pobres en superòxid dismutasa i glutatió peroxidasa. Els seus constituents, igual que la fase externa de les membranes plasmàtiques cel·lulars, són, en les zones inflamatòries, plenament exposats al flux de O_2^- i H_2O_2 provinent dels fagòcits actius. En el plasma, sembla admès que els antioxidants, per ordre decreixent d'eficàcia, són l'àcid ascòrbic, l'urat, l'alfa-tocoferol i l'albúmina que ja comentarem.

Aquestes molècules són entre altres el glutatió, la vitamina E o alfa-tocoferol (que posseix una acció estabilitzant de membrana), l'ascorbat de sodi, el beta-caroté, l'interferó beta produït pels fibroblasts i, en menor grau, les "-oses" simples tals com la glucosa, la manosa i el manitol.

. El glutatió (GSH)

El glutatió és un tripèptid que estudiarem en detall més endavant, però cal ja tenir en compte que en mig de les defenses no enzimàtiques de la cèl·lula, el GSH probablement juga un paper de *pivot*.

El GSH (glutatió reduït) redueix peròxid d'hidrogen a H_2O amb la presència de $NADPH^+$ (8, 64), a part d'altres funcions que s'estudiaran a l'apartat 8:



. La vitamina E

És un potent captador biològic de radicals, ja que la seva estructura li permet captar RLLO tant en la zona lipofílica com hidrofílica. Es localitza a la membrana, a raó d'una molècula per aproximadament 2.100 d'àcids grassos poliinsaturats. També és troba en el plasma. Es presenta sota 8 formes isomèriques, les quals tenen totes un grup polar. La forma més predominant i la més activa és l' α -tocoferol. Quan aquesta molècula s'excita, es transforma -per substracció d'un àtom d'hidrogen- en un radical α -cromanoxil (TH \cdot) d'estructura semiquinònica, a partir del qual el tocoferol (TH 2) pot ser regenerat per la vitamina C (67).

Pot ser que la interrupció de la fase de propagació estigui també lligada a la formació de l'estructura quinònica estable (T) del tocoferol, que per captació de 2 H es retransforma en tocoferol TH $_2$. La interacció TH \cdot /vitamina C pot semblar paradoxal; ja que una espècie hidrofòbica, la vitamina E, es localitza en l'estructura lipídica de la membrana, mentre que la vitamina C es troba en la fase aquosa citosòlica. Aquesta compartimentació no exclueix la interacció entre aquestes dues. En efecte, el lloc actiu de la vitamina E està enclavat en la cara interna de la membrana i per tant es troba en contacte amb el citosol.

Estudis epidemiològics han demostrat que els malalts afectes de càncer tenen concentracions sèriques baixes de vitamina E, així com també suplementes de vitamina E poden inhibir la lipoperoxidació observada després de l'exercici físic (67).

. La vitamina C

Apareix com a un antioxidant major intervenint en tots els òrgans, particularment en els de la visió. La riquesa de l'humor aquós en àcid ascòrbic protegeix el cristal·lí contra els processos radicalars de l'envelliment que condueixen a la cataracta.

L'acció de la vitamina C és molt controvertida quant al seu efecte protector o activador de la toxicitat de l'oxigen. Segons el pH, la vitamina C pot tenir una forma reduïda o oxidada; el pas d'una a l'altra forma es fa mitjançant un radical lliure, el radical ascorbil i en presència de GSH/GSH reductasa. La vitamina C forma, doncs, un complex redox, amb una forma intermèdia radicalar, amb capacitat de captar l'oxigen singulet i altres espècies radicalars. És així com protegeix la pell de la toxicitat induïda pels raigs UV.

En conclusió, l'acció de l'àcid ascòrbic es presenta com a molt complexa. Pot, en funció de la seva concentració i de la d'altres antioxidants (tocoferol, per exemple), ions metàlics i O_2 , comportar-se com a un antioxidant o com a un prooxidant, ja que a concentracions altes, la vitamina C pot ser un oxidant generador de radicals lliures com el $\cdot OH$.

. Els beta-carotens

En el si de la membrana, els carotens i la vitamina A són generalment considerats els *scavengers* dels radicals hidroxil i peroxil, així com dels estats singulets de l'oxigen (154). Són molt nombrosos i representen la principal font alimentària de retinol, que es comporta per tant com a provitamina A (67).

S'acumulen a altes concentracions en les membranes d'alguns teixits tals com la retina.

L'eficàcia dels β -carotens com a antioxidants va lligada a la concentració d' O_2 ; així, a altes concentracions d' O_2 són més eficaços.

. Proteïnes

Algunes proteïnes plasmàtiques transportadores de metall (transferrina, ceruloplasmina) poden contribuir a la protecció global del nostre organisme fixant certs cations (Fe^{++} , Fe^{+++}) implicats en l'activació de l'oxigen o en la reacció d'Haber-Weiss, generadora de $\cdot OH$ (44).

Les proteïnes que tenen un grup $-SH$ no saturable poden ser considerades com a les veritables protectores; l'oxidació dels seus grups tiols comporta una modificació de la seva estructura espacial i, per tant, la seva inactivació més o menys marcada des del punt de vista biològic (154).

La transferrina i la ceruloplasmina segresten, respectivament, el ferro i el coure, impedit l'efecte catalitzador d'aquests metalls de transició en els processos de lipoperoxidació.

L'haptoglobina i l'hemopexina es lliguen a l'hemo de l'hemoglobina prevenint la descomposició dels lipoperòxids.

. L'àcid úric

L'urat es produeix pel catabolisme de les purines, i interactua directament amb els RLLO, com el $\cdot OH$. També s'ha demostrat que protegeix de l'oxidació la vitamina C del plasma. Serà, per tant, un bon antioxidant fisiològic, actuant a la vegada com a *scavenger* de radicals oxigenats i com a quelant d'ions de metalls de transició.

L'estudi de la desaparició plasmàtica de diferents antioxidants endògens mostra, quant a l'aparició de lipoperòxids:

- que la disminució més precoç de concentració és la de l'àcid ascòrbic;
- que, posteriorment, per esgotament d'aquest antioxidant es pot observar el desenvolupament de la lipoperoxidació dels fosfolípids, triglicèrids, colesterol, ésters portats per les lipoproteïnes fins i tot si el tocoferol és present a una alta concentració;
- que els àcids grassos lliures -el únics lípids vehiculitzats per l'albumina- semblen estar protegits de la peroxidació per aquesta proteïna (154).

6.-Origen de la patologia relacionada amb radicals lliures

Si bé l'acció de la superòxid dismutasa, la catalasa, el glutatió i el tocoferol és prevenir el dany de les cèl·lules, és inevitable que alguns radicals s'escapin dels sistemes de defensa, perjudicant alguns components cel·lulars en el procés de detoxificació. Aquests danys es veuen especialment augmentats quan els radicals són generats bruscament (excessiva exposició UV). Tres components moleculars són particularment susceptibles a l'atac de radicals lliures: biomembranes, proteïnes i ADN (8).

En les condicions fisiològiques normals, i a causa de l'eficàcia dels sistemes de defensa, la lipoperoxidació presenta un efecte nociu reduït. Passa tot el contrari quan hi ha intoxicació per alguns xenobiòtics i el metabolisme genera importants quantitats de radicals, i/o quan el metabolisme de substàncies endògenes generadores de RLL (com per exemple els andrògens) desborda la possibilitat de protecció enzimàtica i esgota el *pool* de *scavengers*. Aleshores apareixen plenament els efectes tòxics i irreversibles d'aquests processos.

Qualsevol desequilibri entre l'increment de producció de metabòlits d'O₂ i el nivell de defenses antioxidants pot potencialment resultar en dany cel·lular. El

desordre, ja sigui local (en reaccions inflammatòries) o molt generalitzat (efecte de drogues) està generalment associat a un increment de la càrrega oxidativa, però pot també ser causat pel dèficit d'alguns factors: activitat de la glutatió peroxidasa, per exemple, depenent de la disponibilitat del seleni. La vitamina E també depèn de la ingesta. Per altra part, algunes drogues poden induir selectivament una disminució de GSH amb un bloqueig de la glutatió reductasa i un increment, com a conseqüència d'això, de la vulnerabilitat a l'estrès oxidatiu (89, 164).

Els RLLO i espècies actives de l'oxigen es troben involucrats en l'envelliment, en la mutagènesi, en la carcinogènesi i en la producció de mutàgens. A més, una gran part de la patologia de diversos òrgans i sistemes, com cervell, cor, fetge, budell, múscul, pell, pulmó, retina i ronyó, es relaciona amb els RLLO.

En els individus adults, la menor eficàcia dels sistemes de protecció es tradueix en una amplificació dels processos de lipoperoxidació, que se sap que són un dels factors essencials per a l'envelliment. Aquesta citotoxicitat és imputable a les espècies radicalars que generaran i als seus aldehids, que són resultat de les reaccions "de tall".

La toxicitat d'un radical depèn de 5 paràmetres essencials, que són: la concentració, la mitja vida, la velocitat de difusió, la acció específica i les característiques físicoquímiques del medi en el qual és produït. La mitja vida dels principals radicals oxigenats, establerta a 37°C i en condicions molt precises de concentració de substrats, és de l'ordre de 10^{-9} i 10^{-6} segons per a $\cdot\text{OH}$ i $\text{LO}\cdot$ respectivament, i de 7 segons per a $\text{LOO}\cdot$.

Tot i la seva relativament baixa reactivitat en medi aquós, $\text{l'O}_2\cdot^-$ és l'origen de perturbacions biològiques importants. Quan es produeix en gran quantitat, la seva dismutació en H_2O_2 -molècula estable i difusible- li permet d'actuar indirectament a distància. És un bon inhibidor de la glutatió peroxidasa; per

tant, quantitats importants d' H_2O_2 estan disponibles per ser transformades en $\cdot\text{OH}$. Així, per aquesta seqüència, l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ pot exercir a distància, sota la forma d' $\cdot\text{OH}$, una acció més nociva que aquella que pot produir en el medi del seu lloc de producció.

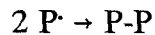
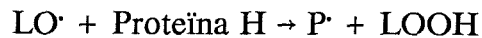
A part de la seva curta mitja vida, el radical $\cdot\text{OH}$ té una possibilitat de recorregut molt reduïda, menys de 3 nm, és a dir de l'ordre d' $1/2000^{\text{e}}$ del diàmetre de l'eritròcit humà. Aquest radical tan reactiu és una trampa específica per a nombroses estructures (glucosa, sorbitol, manitol, etanol, proteïnes) que limiten lleugerament els efectes nocius. L'albumina és un bon captador de $\cdot\text{OH}$. El domini que en resulta es limita a aquest lloc i és insignificant. Malgrat això, el seu efecte nociu pot ser molt gran. És notable el cas en el qual es formen, a partir d' H_2O_2 , i es fixen directament sobre l'ADN o els ions de metalls de transició. El radical $\cdot\text{OH}$ així format és precisament per això més tòxic que els que no són accessibles als seus propis *scavengers*.

Els radicals lliures exerceixen la seva toxicitat simultàniament sobre les membranes cel·lulars, els àcids nucleics i les proteïnes. La peroxidació d'àcids grassos poliinsaturats dels fosfolípids de membrana és l'origen d'importants modificacions de l'organització de membranes, que es tradueix en una disminució de la seva fluïdesa i de l'activitat enzimàtica que suporten, i en un augment de la permeabilitat per a H^+ i altres ions.

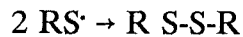
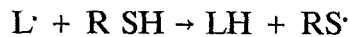
En les mitocondries, la lipoperoxidació es tradueix en un inflament i una lisi de les organel·les, i el mateix ocorre en el cas dels lisosomes.

Els efectes nocius dels lipoperòxids sobre les proteïnes van ser descrits el 1966 per Roubal i Tappel, que van indicar que aquests efectes consisteixen en una desnaturalització més o menys marcada que es tradueix en una disminució de solubilitat. Els radicals alcoxil i alquilperoxil extreuen els H^{\cdot} de les proteïnes, preferentment a nivell de $-\text{OH}$ de les tirosines, de $-\text{SH}$ de les cisteïnes i de les

metionines, de $-\text{NH}_3^+$ de les lisines, de $-\text{NH}$ de les histidines dels triptòfans i de les arginines (8, 154).



Els tioenzims són molt sensibles a la inactivació radicalar per formació d'un radical thiyl (RS^\cdot) seguit d'un pont disulfur (R-S-S-R).



Així, la lipoperoxidació pot inactivar nombrosos enzims cel.lulars (105).

La desnaturalització de l'ADN pels radicals acaba amb la seva fragmentació. És responsable de les perturbacions en la transmissió del patrimoni genètic. El radical $\cdot\text{OH}$, molt implicat en aquest procés, és l'origen de l'oxidació de la timina i la guanina, respectivament, en timina-5,6-glicol i 8-hidroxiguanina. Els radicals alquiloxil i alquilperoxil produeixen oxidacions similars.

La citotoxicitat de la lipoperoxidació està també, per altra banda, lligada a la presència dels diferents aldehids resultants de la lipoperoxidació disruptiva dels àcids grassos insaturats. Els més importants quantitativament són els 4-hidroxi-alquenals, que són els agents alquilants molt potents que reaccionant espontàniament i formen:

- compostos d'addició amb els residus cisteïnil de les proteïnes i del glutatió;
- bases de Schiff amb els grups amino de les proteïnes, de les fosfatidil etanolamines i de les fosfatidil serines.

El bloqueig dels grups tiols comporta inhibició de diferents enzims, com la 3-fosfogliceraldehid deshidrogenasa, la lactat deshidrogenasa, l'hexoquinasa, l'ADN polimerasa i l'adenilat ciclase, que condueix notablement a una reducció de la síntesi de les nucleoproteïnes, de les proteïnes i de la glicolisi anaeròbica (154, 162).

En les membranes, les condensacions aldehydiques amb els grups amina indueixen modificacions importants de la seva permeabilitat i poden comportar la seva lisi. En aquest context, la membrana plasmàtica eritrocitària ha estat particularment estudiada. A concentracions micromolars, el malonilaldehid, pels ponts que crea, augmenta molt significativament la rigidesa de la membrana, la qual cosa comporta una menor diformitat de l'eritròcit i un escurçament de la seva mitja vida en la circulació. En el curs de shocks circulatoris, s'ha observat un augment molt important de la concentració eritrocitària de malonildialdehid, que pot tenir un paper important en l'aterogènesi.

Quan reaccionen amb ADN, els aldehids i els hidroxi-alquens provoquen els efectes mutagènics, carcinogènics i citotòxics. L'acció mutagènica del malondialdehid ha estat demostrada en el ratolí, en el qual es coneix que el 4-hidroxi-2-transnonenal forma un compost cíclic d'addició amb la guanina de l'ADN.

La citotoxicitat dels hidroxialquens és limitada pel potent sistema enzimàtic de detoxificació que constitueix la glutatió S-transferasa, que catalitza la formació amb el glutatió de compostos menys tòxics, eliminables probablement sota la forma d'àcids mercaptúrics.

En conclusió, sembla ser que els radicals i els aldehids resultants de la lipoperoxidació danyen totes les membranes -i per tant les organel·les subcel·lulars-, així com les proteïnes (enzims principalment) i el genoma. L'acció sobre les membranes dels lisosomes té conseqüències desastroses, ja que pot

conduir a la seva ruptura i l'alliberament d'enzims que catalitzen la hidròlisi de les proteïnes, dels àcids nucleics i dels polisacàrids cel·lulars (despolimerització de l'àcid hialurònic).

La lipoperoxidació apareix, doncs, com un procés localitzat, implicat en situacions patològiques molt diferents: envelliment, lesions isquèmiques i post-isquèmiques (cor, budell, cervell) síndromes inflamàtores, toxicitat d'alguns xenobiòtics (fàrmacs, per exemple), afeccions malignes, etc. Així, l'acumulació de productes de la lipoperoxidació ha estat observada principalment en les biòpsies cardíques de pacients amb patologia miocàrdica, en el teixit còlon-rectal tumoral, en els cristal·lins de cataractes d'etiologia diversa (154, 44, 209, 105, 38).

Aquest risc radicalar és màxim a nivell de la pell per raons de la seva exposició als estímuls fotobiològics generadors de radicals lliures d'oxigen (35).

En condicions normals, la presència d'un equilibri entre prooxidants i *scavengers*, impedeix que les delicades estructures cel·lulars (membranes, ADN, enzims, etc.) pateixin lesions oxidatives per aquests radicals, però en situacions en les que els sistemes antioxidants no poden eliminar aquestes espècies actives, es produeix el radical hidroxil, que és capaç d'oxidar per exemple lípids i incrementar la producció de nous RLLO, en la cadena de lipoperoxidació. El radical hidroxil origina ràpidament la formació de metabòlits tòxics addicionals, descompensant encara més la pèrdua de l'estat d'equilibri entre prooxidació i antioxidantació.

Els problemes de la pèrdua d'equilibri entre l'oxidació i l'antioxidació poden donar lloc a nombrosos processos patològics. S'han descrit uns criteris pels quals una determinada patologia pot tenir el seu origen en els mecanismes radicalars (taula 5) (18).

En la taula 6, s'enumeren algunes de les reaccions biològiques i de les situacions patològiques que semblen estar relacionades amb els radicals lliures i espècies actives d'oxigen. Com podem veure, són molts els òrgans i sistemes afectats.

I.- És conegut que la malaltia s'associa a una producció anormal de radicals lliures o d'intermediaris.

II.- Demostració d'espècies de radicals lliures específiques, o dels seus productes de reacció, al lloc de la lesió.

III.- Demostració *in vitro* del fet que espècies de radicals lliures estan involucrades en mecanismes importants referents a l'entitat patològica en concret.

IV.- *Test del Síntoma Comú*: producció de lesions similars per agents d'altres etiologies que donen lloc a les mateixes espècies de radicals lliures.

V.- Capacitat per modular la patogènesi mitjançant l'administració d'antioxidants o *quenchers* de radicals lliures.

TAULA 5.- Criteris per involucrar els processos mitjançats per radicals lliures en la patogènesi (extret de la ref. 18).

Fets biològics

- Activitat fagocítica
- Activitat de la xantín-oxidasa
- Amiloidosi
- Autooxidació del colesterol (factor de risc coronari)
- Biosíntesi de prostaglandines
- Càncer i metàstasi
- Envelliment (normal i prematur)
- Fenòmens de detoxificació oxidativa
- Funcionament de la "natural cell activity"
- Hipòxia-reoxigenació
- Inflamació
- Mutacions (alteracions en l'ADN i en la reparació)
- Oxidacions biològiques
- Peroxidacions lisosomals
- Toxicitat per l'oxigen i per l'ozó
- Lesions cel·lulars i hístiques induïdes per tetraclorur de carboni
- Fum dels cigarrets
- Endotoxines i neurotoxines
- Toxicitat de l'oli tòxic
- Toxicitat de la bleomicina
- Toxicitat de la hidroxidopamina
- Toxicitat dels aminoglucòsids (nefrotoxicitat)
- Toxicitat de les benzantraquinones, quinones heterocícliques i naftaquinones
- Toxicitat dels metalls pesants (cadmi, mercuri, plom)
- Aspiració de meconi
- Contaminants oxidants
- Furosemida
- Sobrecàrregues d'alumini
- Toxicitat de l'adriamicina
- Toxicitat del cisplatí
- Radiacions ionitzants i solars
- Toxicitat del paracetamol

Patologia mèdica

a-beta lipoproteïnèmia
 Artritis reumatoide
 Arrítmies induïdes per H_2O_2
 Cardiopatia isquèmica (hipòxia-reoxigenació)
 Colagenosis i connectivopaties (LES, esclerodèrmia)
 Colitis ulcerosa
 Demència senil
 Dermatitis de contacte
 Diabetis induïdes per al·loxà i estreptozotocina
 Displàsia broncopulmonar
 Distrès respiratori de l'adult (endotoxines)
 Malaltia d'Alzheimer
 Malaltia de Keshan
 Malalties pancreàtiques
 Malaltia de Parkinson
 Malaltia pulmonar obstructiva crònica
 Fibroplasia retrolental (toxicitat de l'oxigen)
 Glomerulonefritis (malaltia antimembrana basal)
 Isquèmia cerebral i lesió vascular hipertensiva
 Isquèmia hística (hipòxia-reoxigenació)
 Kwashiorkor
 Miocardiopaties (incloent l'alcohòlica i la de Keshan)
 Mort sobtada cardíaca
 Peroxidació lipídica i intoxicació digitàlica
 Porfíries
 Prevenció del distrès respiratori del nounat prematur amb dexametasona
 Síndrome d'atàxia-telagiectàsia
 Síndrome de Bloom
 Síndrome de Down
 Síndrome de distrès respiratori de l'adult
 Síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz
 Síndrome de l'alcoholisme fetal
 Úlcera pèptica
 Variacions hemodinàmiques per leucotriens
 Iatrogenia que indueixen processos fibrosants.

TAULA 6.- Fets biològics i situacions mèdiques almenys relacionats en part amb radicals lliures d'oxigen (extret de les ref. 164, 75).

7.- Glutatió S-transferases (GST)

Les GST són una família multifuncional d'enzims que catalitzen la conjugació del GSH amb un gran nombre de xenobiòtics, així com també subtrats endògens donant lloc a la formació d'àcids mercaptúrics, que és un important camí d'eliminació de citotòxics potencials o compostos mutagènics del cos.

La majoria de GST s'han trobat al citosol però també s'han descrit isoenzims localitzats al nucli cel·lular (195, 91) i microsomes (130, 131).

Les GST citosòliques són enzims dimèrics i s'han identificat en homes (139), rates (142), ratolins (178) i en gran quantitat d'espècies animals (80, 104, 163) així com en plantes (174).

Donat que el nostre treball s'ha desenvolupat en l'home, l'estudi posterior tan sols està centrat en els diferents isoenzims de la GST humanes.

7.1.-Nomenclatura de les GST citosòliques

Els isoenzims humans de GST es poden classificar en tres classes: alfa, mu i pi, segons Mannervik (114, 113), tenint en compte les propietats estructurals, immunològiques i enzimàtiques, amb punts isoelèctrics bàsics, neutre i àcid, respectivament.

La classe alfa conté varies formes que originàriament es van creure codificades pel locus GST2, però treballs posteriors suggereixen que comprèn monòmers separats, B1 i B2, que són producte de diferents gens (184) situats al cromosoma 6 (21). Els monòmers es poden combinar per donar lloc a homodímers B1B1 i B2B2 i a heterodímers B1B2. Aquests dos gens s'expressen majoritàriament al fetge, mentre que un tercer gen, també situat al cromosoma 6, s'expressa en pell (90).

Els isoenzims de classe mu semblen ser el producte d'un locus polimòrfic, el GST1, que es creu situat als cromosomes 1, 6 i 13. Combinant tres al·lels s'obtenen quatre possibles fenotips: GST1 0, GST1 1, GST1 2 i GST1 2-1. Els individus amb fenotip GST1 0 no tenen isoenzims de classe mu, mentre que el fenotip GST1 1 expressa l'isoenzim ψ i el fenotip GST1 2 expressa el μ . El fenotip GST1 2-1 expressarà l'isoenzim ϕ (20, 22, 186). El gen, l'expressió del qual és polimòrfica en la població humana, sembla estar localitzat en el cromosoma 13 i ser resultat d'una transposició o recombinació al llarg de l'evolució; per tant, el fenotip nul seria degut a una manca de transposició de l'ADN davant una delecció genètica (45).

Els isoenzims de classe pi van ser inicialment descrits en eritròcits i placenta (118), però després s'han anat trobant formes similars en tots els teixits humans, incloent la pell (98). Els estudis immunològics indiquen que tots ells són producte d'un sol locus, el GST3 (73, 47, 143), que es troba situat al cromosoma 11 (102), encara que en el cas de la pell recentment s'ha insinuat un segon possible locus en el cromosoma 12 (98). També s'ha determinat recentment l'estructura i la seqüència de nucleòtids del gen de la GST π humana (41).

Recentment s'ha purificat i caracteritzat una GST que probablement correspondria a un nou locus: GST4. Aquest isoenzim es troba al múscul humà i es pot diferenciar clarament de les altres isoformes de GST del múscul (classes alfa, mu i pi) per diverses tècniques (175).

La taula 7 recull, en síntesi, les diverses nomenclatures.

Respecte a la GST bàsica major (ϵ , B_1B_1 , GST 1-1, GST 2-tipus 1 o $\alpha_x\alpha_x$), originàriament descrita en fetge humà, podria ser anomenada glutatió transferasa humana alfa 1-1, abreujada GSTA1-1. El corresponent locus genètic es podria denominar GSTA1. Un segon homodímer de la classe alfa (τ , B_2B_2 ,

CLASSE	ISOENZIM	ALTERNATIVA	PES MOLEC. SUBUNITATS	PUNT ISOELÈCTRIC	NOVA NOMENCLATURA
ALFA	B1B1	ε	25.900	8,9	GSTA1-1
	B1B2		25.900	8,75	-
	B2B2	δ	25.900	8,4	GSTA2-2
	α,β	τ	-	-	-
	Skin ^{9,9}	-	27.000	9,9	-
MU	μ	neutra	26.700	6,1	GSTM1a-1a
		neutra	26.600	5,5	-
	φ	neutra	26.700	4,6	GSTM1b-1b
		ψ			
PI	π	acídica, aniònica	24.800	4,8	GSTP1-1

TAULA 7.- Nomenclatura de les GST citosòliques a l'espècie humana (extret de les ref. 132, 117)

GST 2-2, GST 2-tipus 2 o $\alpha_y\alpha_y$) es designaria com a glutatió transferasa alfa 2-2 o GSTA2-2, i la proteïna heterodimèrica prèviament anomenada com a glutatió transferasa δ o B₁B₂ o GST 2-tipus 2-1 és referida ara com una glutatió transferasa alfa 1-2 o GSTA1-2.

Les glutatió transferases μ i ϕ són generalment considerades com a variants al·lèliques del mateix locus genètic, i ambdues poden ser designades com a glutatió transferasa humana Mu 1-1. Les formes enzimàtiques al·lèliques poden ser distingides per lletres minúscules.

Pel que fa a les GST àcides en aquesta nova nomenclatura tan sols s'ha tingut en compte la GST π i pot ser anomenada GSTP1-1 (117).

7.2.-Distribució de les GST pels teixits

Les GST estan distribuïdes àmpliament per tot l'organisme, iniciant-se el seu

desenvolupament en el fetus molt aviat (144). Això serà important per metabolitzar ràpidament el compostos estranys, sobretot en aquells teixits que es troben en llocs d'entrada o sortida de l'organisme, com són els pulmons, el fetge, etc.

El fetge conté molt poca quantitat de GST π , la qual és la fonamental en gairebé bé tots els òrgans estudiats, com són principalment la placenta, el ronyó i el budell.

El pulmó conté relativament poca quantitat de la subunitat α (66).

Les GST hepàtiques tenen una activitat enzimàtica clarament superior a la d'altres teixits, com per exemple pulmó, ronyó, pell, budell, suprarenal, melsa, placenta, sang total i plasma (31, 71, 72, 185), encara que això dependrà també del substrat emprat en la reacció enzimàtica *in vitro*.

D'altra banda, estudis cromatogràfics i immunològics mostren clarament una certa expressió "cèl.lula-específica" dels isoenzims de GST. Per exemple, tots els isoenzims observats en les cèl.lules sinusoïdals hepàtiques es detecten també en el parènquima hepàtic, però a les cèl.lules de Kupffer i a les endotelials els manquen molts dels isoenzims presents en el parènquima. La importància d'aquest fet radica en què, quant un compost xenobiòtic entra en la circulació hepàtica, les primeres cèl.lules amb què es troba són les sinusoïdals; per tant, la presència de molts isoenzims de GST capaços de detoxificar una gran varietat de compostos en les cèl.lules de Kupffer o en les endotelials -totes dues formen part de les sinusoïdals- podria ser crucial per protegir al fetge del dany provocat per substàncies potencialment hepatotòxiques (181).

A part d'aquesta expressió "cèl.lula específica" dels isoenzims de GST, existeix també l'expressió "teixit-específica", que en la rata s'ha suggerit que podria tenir lloc pretranslacionalment, donats els resultats d'estudis fets amb traslació *in*

vitro de poliRNAs i posterior purificació de proteïnes (198).

També recentment s'ha observat per tècniques immunohistoquímiques que la GST π es pot localitzar en el nucli. No es coneix el perquè d'aquesta localització, però en algun cas s'ha observat associada a la resistència a l'adriamicina (195) i possiblement relacionada amb una nova funció enzimàtica reparadora d'ADN (91).

Molts teixits expressen diversos isoenzims de GST (encara que sovint en predomina un -o bé una família-), com és el cas de budell prim i còlon, on hi ha presència d' α , π i en algun cas μ , i sempre amb predomini de la π (147, 37). Malgrat això, en alguns teixits s'ha aïllat únicament un isoenzim (54).

La raó per a la diferència en l'expressió dels isoenzims de la GST en els teixits no és clara, però s'especula que no reflectiria la necessitat per detoxificar els xenobiòtics, sinó una adaptació al paper variable en la biosíntesi dels compostos endògens. Malgrat això, sobre aquestes funcions es coneix molt poc actualment (202).

En el cas de la pell humana, s'han identificat en el citosol 6 formes diferents amb pI de 4,6, 5,9, 6,8, 7,1, 8,5 i 9,9. Les tres més abundants són una àcida de classe pi (pI 4,6), una bàsica classe alfa (pI 8,5) i una molt bàsica de classe alfa (pI 9,9). Aquesta última representa 10-20 % del total de les GST de pell, és similar a la GST 2-2 de rata, amb alta activitat glutatió peroxidasa per als hidroperòxids linolènics i hidroperòxids cumènics (46), i s'expressa també en pròstata humana.

7.3.-GST: diferències segons el sexe

En l'espècie humana s'han fet estudis de comparació d'activitat GST en cervell, eritròcits d'home i de dona, i no s'han trobat diferències (185, 34, 43).

7.4.-Mecanisme de catàlisi de les GST

Per entendre el mecanisme d'acció de les GST, s'ha de tenir en compte en primer lloc que les reaccions que aquests enzims catalitzen són possibles també, en petita proporció, en absència de l'enzim. Això es deu a l'activitat de l'ió glutatió tiolat (GS^-), l'espècie nucleofílica del GSH que sembla ser la responsable de la reacció amb cada un dels compostos electrofílics (86).

La base de la força catalítica de l'enzim pot ser l'incrementar, a pH fisiològic, la nucleofilicitat del grup tiol de GSH, és a dir, la interacció del GSH amb la GST podria facilitar la ionització del GSH a ió tiolat (86).

Les reaccions catalitzades per les GST semblen implicar, doncs, la generació de l'anió tiolat del glutatió en el lloc actiu de l'enzim. La meitat tiolada reactiva participa després en l'atac nucleofílic a substrats hidrofòbics en centres electrofílics com carbonis o oxígens. En algunes d'aquestes reaccions, els substrats electrofílics formen conjugats estables amb el glutatió, que més tard són metabolitzats i excretats com a mercapturats i altres compostos químics. En altres conversions catalitzades per GST, com les reaccions seleni-independent glutatió peroxidasa, s'han identificat intermediaris del glutatió no estables (132).

Fins ara, el mecanisme postulat per a l'acció de les GST és bastant primitiu; depèn només de la juxtaposició dels substrats que interactuen, és a dir, que tot tindria lloc per un simple efecte de proximitat. El lloc actiu de l'enzim es podria considerar com una àrea d'unió discreta i específica per al GSH que estaria molt relacionada amb un segon lloc caracteritzat per la seva lipofilicitat. Quan un reactiu suficientment electrofílic està present en el lloc adjacent a l'ió glutatió tiolat, la reacció tindrà lloc (86).

Més recentment, s'ha suggerit que cada família d'isoenzims de GST (alfa, mu, pi) tindria un "G-site" (és a dir, un lloc de fixació del GSH) (2). El lloc de

reconeixement més important és el grup carboxilat de la cadena γ -glutamil lateral, el qual seria del tot imprescindible: és l'únic grup funcional de la molècula de glutatió (a part, evidentment, del grup tiol) la delecció del qual comporta una pèrdua total d'activitat.

D'altra banda, la facilitat amb la qual electrofílics i nucleofílics reaccionen uns amb els altres està en funció de la densitat de càrrega de cada un d'ells. Els compostos químics que tenen centres amb alta densitat de càrrega, són anomenats electrofílics o nucleofílics "durs", mentre que els compostos amb baixa densitat de càrrega s'anomenen "tous". La barrera potencial d'energia que s'ha de superar per a la conjugació és baixa quan reaccionen compostos de similar duresa o flongesa. El glutatió és un nucleofílic tou, i per tant reaccionarà més ràpidament amb electrofílics tous. Així, doncs, les reaccions amb electrofílics durs és més probable que requereixin catàlisi per GST, mentre que els electrofílics tous és més probable que reaccionin espontàniament amb el GSH.

Tanmateix, la catàlisi enzimàtica de la reacció del GSH amb electrofílics tous té lloc i predomina a baixes concentracions de GSH quan gairebé tot el GSH està unit a la GST (48).

L'altre determinant per a la rapidesa de la reacció, i per tant per a l'increment potencial per la catàlisi enzimàtica, és la concentració de GSH i de l'electrofílic. Sota circumstàncies en les quals el GSH ha estat depleccionat a nivells baixos o l'electrofílic està present a baixes concentracions, la catàlisi per GST assumeix un paper més important (48).

Més recentment, s'ha suggerit que determinats residus de l'aminoàcid arginina podrien tenir una gran importància funcional, ja que estan presents en la mateixa posició en les tres classes de GST. Provocant mutacions i canvis d'aquests aminoàcids, s'ha arribat a la conclusió que aquests residus poden

contribuir a la afinitat de les GST pel GSH, potser neutralitzant la càrrega negativa dels grups carboxilat del GSH o bé contribuint a l'estabilitat de l'estat conformacional de l'enzim (183).

Un factor important en l'activitat de la GST π és la molècula de cisteïna pròxima al lloc d'acció de l'enzim, de forma que, si aquests aminoàcid té el residu -SH oxidat, no produeix l'acció. Això s'ha pogut veure en diferents estudis en els quals el glutatió oxidat inhibeix la reacció de forma competitiva, suggerint, per tant, que és important la relació -SH/-SS per tal que la GST π actuï plenament (137, 170).

En estudis realitzats en GST de placenta humana (GST π), s'ha vist que aquest enzim mostra diferències cromatogràfiques i comportament electroforètic d'acord amb la concentració de GSH, suggerint un possible canvi en les xarxes de càrrega de la molècula i un canvi conformacional en la zona de la unió del lligand. Estudis cinètics utilitzant àcid etacrínic, han mostrat una resposta bifàsica segons la concentració de GSH: es pot dir que aquest enzim assumeix una forma altament aniònica en presència de concentracions baixes de GSH, mentre que és convertida en una forma aniònica relativament dèbil quan a l'entorn immediat hi ha una alta concentració de GSH. Així, doncs, *in vivo* pot predominar l'alta o baixa afinitat segons el contingut de GSH en el teixit del voltant (157).

7.5.-Funcions de les GST

Les GST s'associen normalment amb la detoxificació per conjugació de compostos electrofílics, xenobiòtics, genotòxics i citotòxics procedents de fàrmacs, carcinògens, metabòlits de substàncies endògenes i contaminants ambientals. Aquests substrats són extremadament electrofílics, de manera que fins i tot poden reaccionar espontàniament amb el GSH. Per exemple, respecte al càncer aquests enzims poden:

- protegir les cèl.lules normals de la iniciació per carcinògens químics;
- si estan augmentats durant la preneoplàsia, ofereixen a les cèl.lules preneoplàstiques un avantatge selectiu sobre les cèl.lules veïnes;
- si estan augmentats durant la progressió de la malignitat, donen a les cèl.lules resistència als agents quimioteràpics electrofílics.

La conjugació del glutatió també té un paper important en la fisiologia, ja que és un pas essencial en la biosíntesi de leucotriens, principalment portat a terme per les GST bàsiques (112).

Tanmateix, el nom d'aquests enzims es refereix a només una de les moltes activitats enzimàtiques que posseeixen. Altres activitats són, per exemple (veure taula 8), l'activitat Δ^5 -3-cetoesteroide isomerasa GSH-dependent, l'activitat peroxidasa seleni-indepenent -funcions lligades a la GST alfa majoritàriament- i la biosíntesi de prostaglandines catalitzada per la GST μ (26, 94, 201).

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1.- Detoxificació de xenobiòtics electrofílics/hidrofòbics via conjugació amb GSH.2.- Unió/transport de lligands no substrats.3.- Isomerització d'esteroides.4.- Síntesi endògena de prostaglandines/leucotriens.5.- Glutatió peroxidasa seleni-indepenent.6.- Proteïnes estructurals en cristal.lins de algunes espècies animals. |
|---|

TAULA 8.- Resum d'algunes de les funcions de la GST (extret de la ref. 100)

A més de les funcions enzimàtiques, s'ha suggerit que les GST poden servir també com a transportadors intracel.lulars de proteïnes per a determinades molècules orgàniques, fent a dins de la cèl.lula la mateixa funció que l'albumina en el plasma sanguini. La proteïna que té aquesta capacitat d'unió reversible i transport de diversos lligands, es va anomenar "ligandina" (116). Quan es va comprovar l'activitat GST de la "ligandina" i quan es va testar en les GST la reactivitat amb l'anticòs contra la "ligandina", es va trobar que la "ligandina" era

idèntica a la GST B de rata (86).

Dins dels lligands de la GST que no són substrats, hi trobem l'hemo, bilirrubina, biliverdina, bromosulfoftaleïna (BSP), àcids biliars, esteroides, agents de contrast iodat i algunes molècules no polars. S'ha comprovat *in vitro* que alguns d'aquests lligands inhibeixen l'activitat enzimàtica de la GST catiònica prioritària al fetge adult humà, encara que aquesta inhibició és pH-depenent. A pH 6,5, la inhibició és completa, mentre que a pH 9,1 es manté una considerable proporció d'activitat catalítica, atribuïble a què el substrat no lligand s'uneix a un lloc diferent del lloc actiu, amb la qual cosa s'obté un complex enzim-substrat-inhibidor que encara té activitat enzimàtica. A pH 7, que és el fisiològic de l'hepatòcit, la GST humana és totalment inhibida per concentracions saturants dels lligands no substrats. Tanmateix, és improbable arribar a concentracions saturants de substrats electrofílics *in vivo*. En canvi, les condicions que causen colestasi intrahepàtica sovint s'associen amb un acúmulo de substrats no lligands fins a un grau que es pot esperar que inhibeixin les GST catiòniques humanes hepàtiques. Això suggereix que, durant la colestasi, el fetge humà pot ser més susceptible que habitualment el dany provocat per tòxics electrofílics. De totes maneres, el fetge humà conté molts altres isoenzims no catiònics, i el comportament de cèl.lules intactes i *in vivo* podria ser diferent del trobat *in vitro* (25, 48).

Curiosament, quan aquests mateixos estudis s'han fet en fetge de rata, s'ha comprovat que hi ha isoenzims de GST catiònics i pH-sensitius que en presència de concentracions saturants de lligands no substrats mantenen un grau d'activitat enzimàtica significatiu (de 30 a 60% respecte al control) a pH 7 (24).

Les GST, a causa de la seva propensió a unir-se a altres molècules, podrien servir de magatzem o sistema de transport de proteïnes en els hepatòcits. La necessitat d'emmagatzemar és evident en casos com el de la bilirrubina, un

compost tòxic molt poc soluble en solucions fisiològiques i que es produeix a raó de 250 mg/dia en l'home. A la circulació, la bilirrubina pot ser transportada per l'albumina, però en l'hepatòcit -la cèl.lula en la qual té lloc la conjugació amb el glucurònid- l'albumina no està disponible i la bilirrubina podria sedimentar si les transferases no estiguessin a punt per unir-s'hi (86).

El fet que la classe pi estigui expressada en la glàndula adrenal humana, tiroides, placenta, pròstata i úter suggereix la possibilitat d'un paper de transport i segrestament d'hormones (195). Tambè s'ha suggerit, respecte a la mateixa GST π i a causa de la seva distribució tissular àmplia, que aquest enzim seria essencial en la fisiologia cel.lular normal, encara que el principal paper biològic respecte a substrats endògens encara està per resoldre (91). En estudis recents de la presència de GST en pròstata, s'ha vist que per la seva distribució estaria involucrada en processos prostàtics endògens tals com el metabolisme d'esteroides, i addicionalment participaria en l'eliminació dels metabòlits tòxics (52).

Probablement, les GST tenen també altres funcions encara poc conegudes. Estudis fets en cervell de rata emprant sondes d'ADN mostren que en aquest òrgan s'hi expressen múltiples isoformes de GST, la qual cosa ha fet suggerir als autors que aquests enzims podrien estar implicats en altres processos fisiològics, a part del metabolisme de xenobiòtics (107).

7.6.-Substrats de les GST

La majoria dels substrats de la GST que s'utilitzen experimentalment són productes de la indústria química moderna. Encara que estan relacionats amb tòxics ambientals, aquests compostos es van escollir per la seva utilitat en els estudis enzimològics més que per la seva importància biològica. De totes maneres, l'ús d'aquests substrats ha ajudat a definir l'activitat GST, distingir

entre diversos isoenzims i identificar classes específiques de GST.

Molts dels substrats són compostos que podrien reaccionar amb radicals nucleofílics de les proteïnes i àcids nucleics i causar així efectes tòxics, mutacions i càncer. Originàriament, es va considerar que l'atac nucleofílic catalitzat per les GST només podria anar dirigit a un àtom electrofílic de carboni. Més endavant es va establir que el nitrogen electrofílic dels esters de nitrat, el sulfur dels tiocianats o dels disulfits orgànics i l'oxigen dels hidroperòxids orgànics podien servir també de dianes alternatives en les reaccions catalitzades per GST (86).

S'ha vist que les GST catalitzen la conversió biosintètica d'alguns substrats fisiològics; per exemple, han estat implicades en el metabolisme dels derivats de l'àcid araquidònic, incloent el leucotriè A₄, que transformen en leucotriè C₄, i moltes prostaglandines (42, 87, 132, 29). A la taula 9 es poden observar alguns dels substrats biològicament importants de les GST, com per exemple lípids cel·lulars i alguns antineoplàstics.

El substrat més emprat per demostrar l'existència de múltiples formes de GST en diverses espècies biològiques és l'1-cloro-2,4-dinitrobenzè (CDNB). És un bon substrat per a la GST microsomal i per a moltes GST de fracció soluble (116, 132), encara que és el substrat menys idoni en el cas de la recentment purificada GST theta de fetge humà i de rata (125). A la figura 3 es pot observar la reacció catalitzada per la GST amb GSH i CDNB com a substrats.

Les GST de classe alfa tenen una gran activitat envers l'hidroperòxid de cumè, mentre que les de classe mu són més actives amb els epòxids -com l'òxid de trans-estilbè o el benzo(a)pirè-7,8diol-9,10-epòxid (205)- i les de classe pi amb l'àcid etacrínic (55, 116). L'activitat isomerasa està a càrrec majoritàriament de les GST bàsiques.

Derivats de l'àcid araquidònic

Leucotriè A₄ metil éster

Prostaglandina H₂

Carcinògens

Aflatoxina B₁-8,9-òxid

Anti-benzo(a)pirè-7,8-diol-9,10-epòxid

Agents antineoplàstics

Mostasses nitrogenades

Clorambucil

Melfalan

Ciclofosfamida

Nitrosourees

1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU)

Antroquinona

Mitoxantrona (activada als microsomes)

Productes de membrana i d'oxidació de l'ADN

Àcids grassos hidroperòxids

4-hidroxi-alquenals

ADN hidroperòxids

TAULA 9.- Alguns dels substrats biològicament importants de les GST (extret de la ref. 132).