

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els primers estudis sobre GST de pell els van realitzar Mukhtar i col. (135) en rates. En aquests estudis es demostra la presència d'activitat GST en pell sencera de rates recent nascudes, activitat que és 6 vegades inferior respecte a la que es pot trobar al fetge. Aquest enzim de pell no ha estat estudiat en detall en humans: estudis posteriors (46, 98) han identificat nombrosos isoenzims de GST en pell humana sencera, però sense determinar si eren d'origen dèrmic o epidèrmic i per tant encara menys s'han fet estudis per conèixer si dins a la dermis aquest enzim es localitza en la glàndula sebàcia.

Per tècniques d'immunohistoquímica es coneix la localització exclusivament de la GST pi en pell humana, que se situa preferentment a nivell d'epidermis, glàndula sebàcia i glàndula de la suor (195, 91). Raza i col. (159), mitjançant aquestes tècniques identifiquen la GST pi predominantment en glàndula sebàcia i en la beina externa de l'arrel del fol·licle pilós.

Els nostres resultats, conjuntament amb els ja comentats d'altres autors, ens van fer concloure que el més indicat era treballar en les zones de pell amb un elevat contingut de glàndules sebàcies, com són les zones piloses. També vam concloure que, per a posteriors estudis, el més indicat era descartar l'epiteli, per evitar la interferència de la GST pròpia de la pell, així com descartar també el teixit adipós, per tal que els resultats de les anàlisis de contingut de lípids corresponguin realment només als lípids presents a la glàndula sebàcia.

Un estudi similar al nostre pel que fa a la localització de l'activitat GST en dermis, epidermis i pell sencera havia estat ja portat a terme per l'anteriorment esmentat Raza (159), però estava fet en pell de rates. El seus resultats mostraven l'activitat en epidermis (27,59 nmol/min/mg prot.), dermis (44,25 nmols/min/mg prot.) i tota la pell (48,32 nmols/min/mg prot.). Aquest mateix autor indicava, en el mateix estudi, que la màxima activitat estava situada en el citosol i que en el *pellet* microsomal tan sols hi havia un 10% d'activitat.

2.- Conservació de les fraccions solubles

Les mostres s'han conservat a -80°C en tots aquells casos en què això ha estat possible, ja que estudis previs de conservació de l'activitat GST van demostrar que hi ha una pèrdua del 40 % si les mostres es mantenen a -20°C .

Per tant, pensant que hi pogués haver alguna forma enzimàtica de la GST més làbil respecte a la temperatura, totes les mostres que havien de ser utilitzades per cromatoenfoc es van conservar a -80°C .

3.- Estudi de l'activitat enzimàtica de la GST

En aquest apartat fem un estudi de dues de les funcions de la GST, en primer lloc la funció principal de la GST, la de conjugació, que és estudiada utilitzant com a substract CDNB, el qual s'ha mostrat efectiu en totes les formes d'isoenzims (116, 39); en segon lloc la funció isomerasa per esteroides que mostren algunes isoformes de la GST; i per finalitzar l'estudi de l'activitat enzimàtica, fem estudis d'inhibició *in vitro* per esteroides.

3.1.- Activitat GST utilitzant com a substrat CDNB

Km GST glàndula sebàcia

	Homes		Dones
	n=8		n=11
Zona Normal	1,07 ± 0,8	NS	1,69 ± 0,8
	S*		
	n=18		
Zona Alopècica	1,77 ± 0,6	—————	NS

TAULA 12.- Km de la GST de glàndula sebàcia, expressada en $\times 10^{-3}M$ (mitjana \pm desviació estàndard). Les comparacions s'han fet aplicant el test t d'Student. * $p < 0,05$.

La Km de la glàndula sebàcia presenta una distribució normal en tots tres teixits estudiats.

La distribució de freqüències de la Km de la glàndula sebàcia d'homes i dones es pot veure a la figura 10.

Quant als valors que trobem de la Km en els diferents teixits, s'ha pogut observar, pel que fa a la comparació entre sexes, un augment no significatiu en les dones respecte a homes. Si els resultats es comparen entre zona alopecica i zona normal d'homes, aquest augment sí que és estadísticament significatiu (t d'Student, $p=0,0112$), cosa que ens podria indicar una possible inhibició competitiva entre algun factor desconegut i el substrat per l'enzim.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

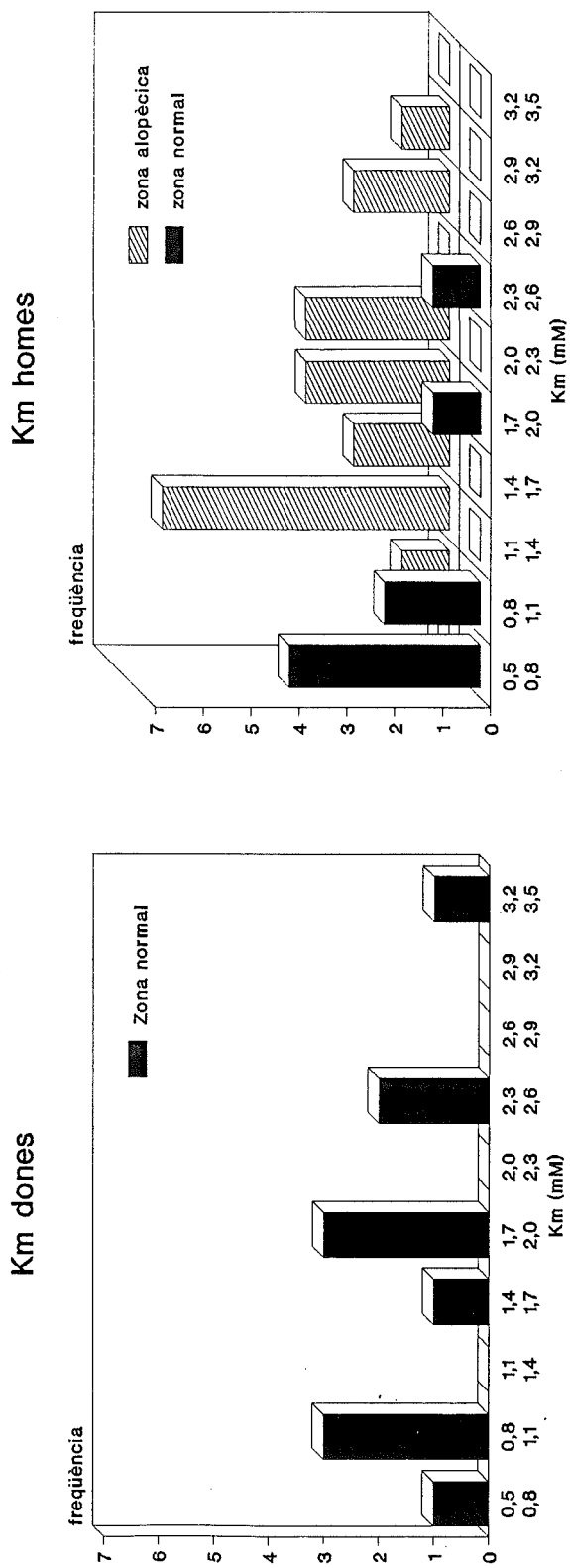


Fig. 10. Histograma de distribució de freqüències de la Km de la GST de la glàndula sebàcia.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Comparant la zona calba d'homes amb la zona normal de dones, no es troben diferències significatives respecte a la Km.

Vmax GST glàndula sebàcia/proteïnes

	Homes		Dones
Zona Normal	n=8 56,51 ± 29,8	S*	n=11 396,97 ± 115,3
Zona Alopècica	n=18 348,33 ± 123,4	—————	NS

TAULA 13.- Vmax de la GST de la glàndula sebàcia, expressada en nmols/min/mg proteïnes (mitjana ± desviació estàndard). Les comparacions s'han fet aplicant el test t d'Student. * p < 0,001.

Aquesta variable presenta una distribució normal en tots els teixits estudiats.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Vmax glàndula sebàcia/g teixit

	Homes		Dones
Zona Normal	n=8 0,89 ± 0,6	S*	n=11 7,33 ± 2,6
Zona Alopècica	n=18 5,93 ± 2,5	—————	NS

TAULA 14.- Vmax de la GST de la glàndula sebàcia, expressada en $\mu\text{mols}/\text{min}/\text{g}$ teixit (mitjana \pm desviació estàndard). Les comparacions s'han fet aplicant el test t d'Student. * $p < 0,001$.

Aquesta variable té una distribució normal en tots els teixits estudiats.

La Vmax/proteïnes presenta diferències significatives en el teixit normal si comparem els dos sexes; així, en la zona normal de dones hi ha un augment significatiu respecte a l'home (t d'Student, $p = 1,5 \times 10^{-7}$). Per altra banda, en l'home hi ha un augment significatiu de la Vmax/proteïnes en la zona alopècica respecte a la zona normal (t d'Student, $p = 4,55 \times 10^{-8}$). No s'observa, en canvi, aquest augment entre la zona normal de dones i el teixit alopècic dels homes.

La figura 11 presenta la distribució de freqüències de la Vmax de la glàndula sebàcia/proteïnes d'homes i dones.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

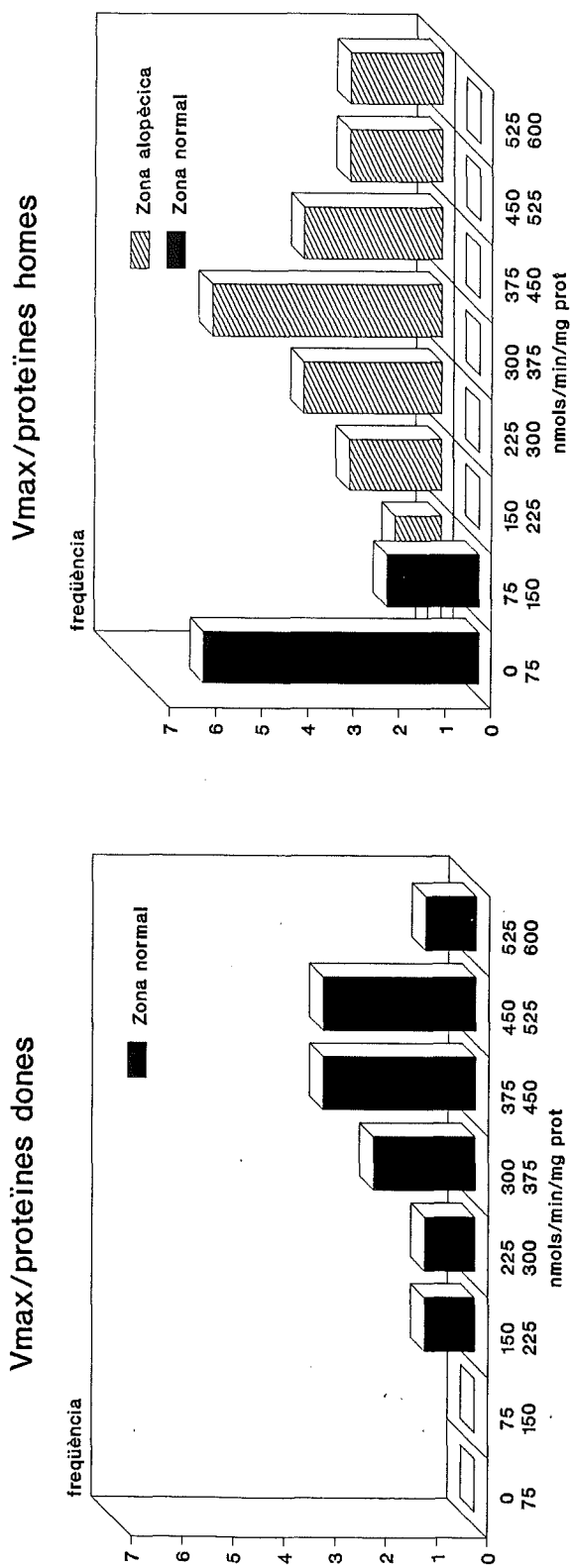


Fig. 11. Histograma de distribució de freqüències de la Vmax de la GST de la glàndula sebàcia/proteïnes.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Respecte a la V_{max}/g teixit, es pot observar també un augment significatiu en la zona normal de dona respecte a la zona normal d'home (t d'Student, $p=2,033 \times 10^{-6}$) i entre la zona calba respecte a la no calba dels homes (t d'Student, $p=7,43 \times 10^{-6}$). No s'observa tampoc diferència significativa entre les dones i la zona calba dels homes.

La distribució de freqüències de la V_{max}/g teixit de glàndula sebàcia de dones i homes la podem veure a la figura 12.

3.1.2.- Mostres aparellades

En home s'han obtingut sis casos de mostres aparellades. Els resultats de cada variable - K_m , V_{max}/mg proteïna i V_{max}/g teixit- es poden veure per a cada mostra estudiada en les figures 13, 14 i 15, respectivament.

S'ha vist, igual que en els resultats de les mostres no aparellades, un augment significatiu tant en la K_m ($p=0,042$) com en la V_{max} , ja sigui expressada per mg de proteïnes ($p=1,04 \times 10^{-3}$) com per g de teixit ($p=4,95 \times 10^{-4}$) en les mostres de zona calba del mateix individu.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

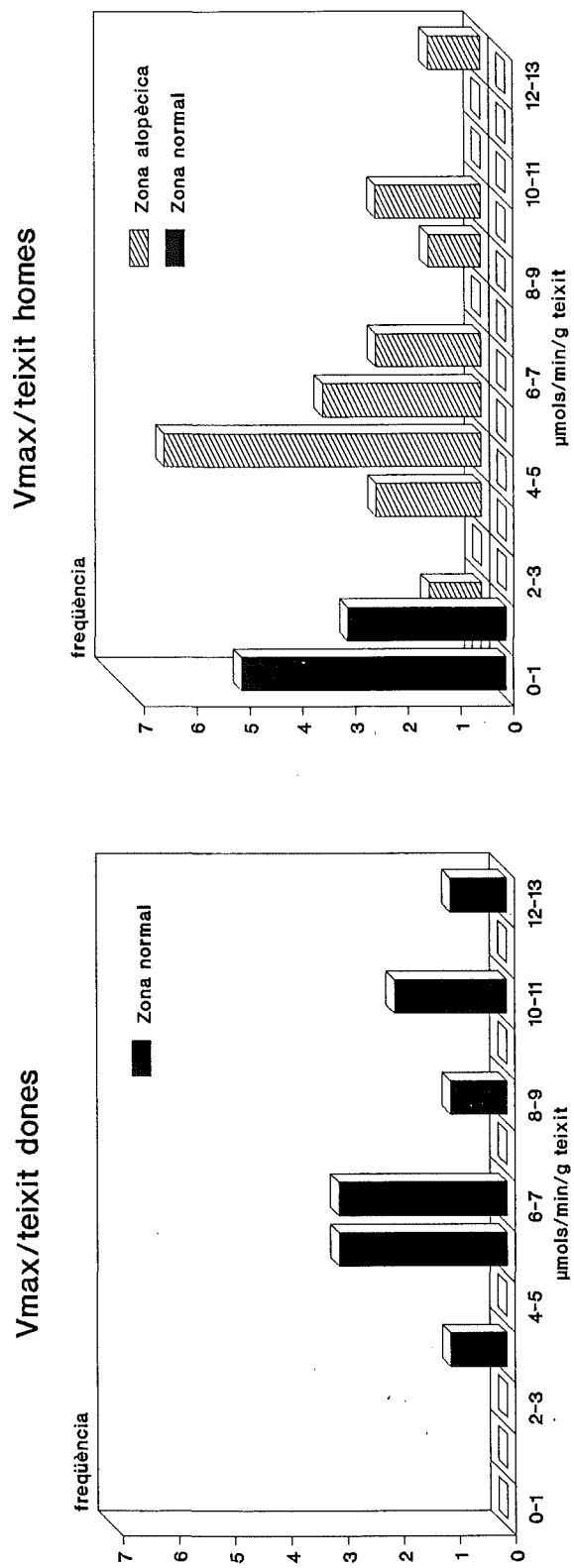


Fig. 12. Histograma de distribució de freqüències de la Vmax de la GST de la glàndula sebàcia/teixit.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

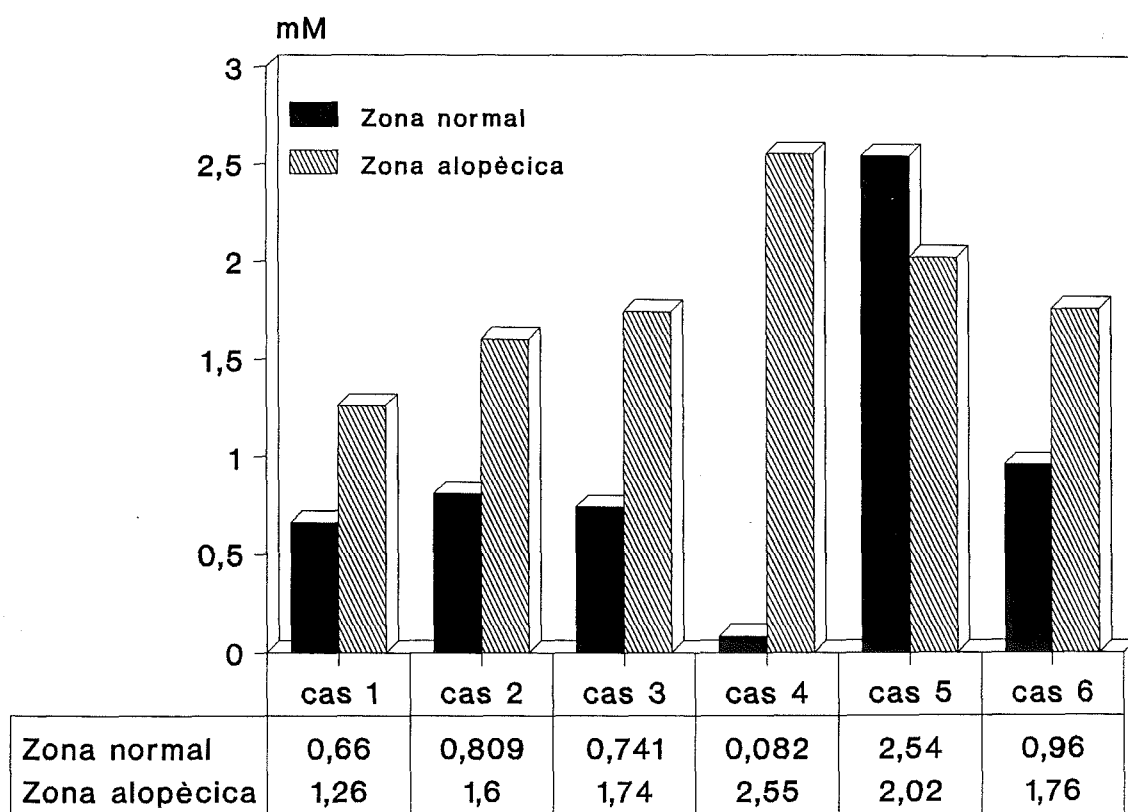


Fig. 13. Km de les mostres aparellades.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

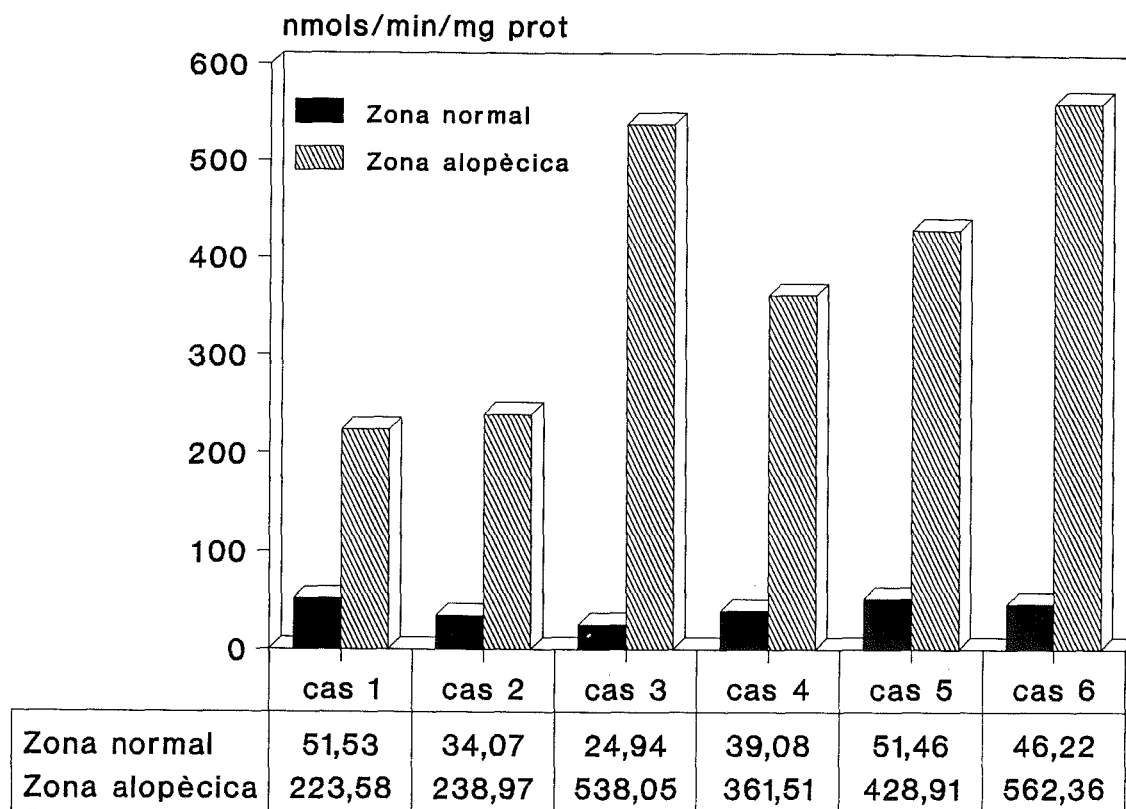


Fig. 14. Vmax/proteïnes de les mostres aparellades

RESULTATS I DISCUSSIÓ

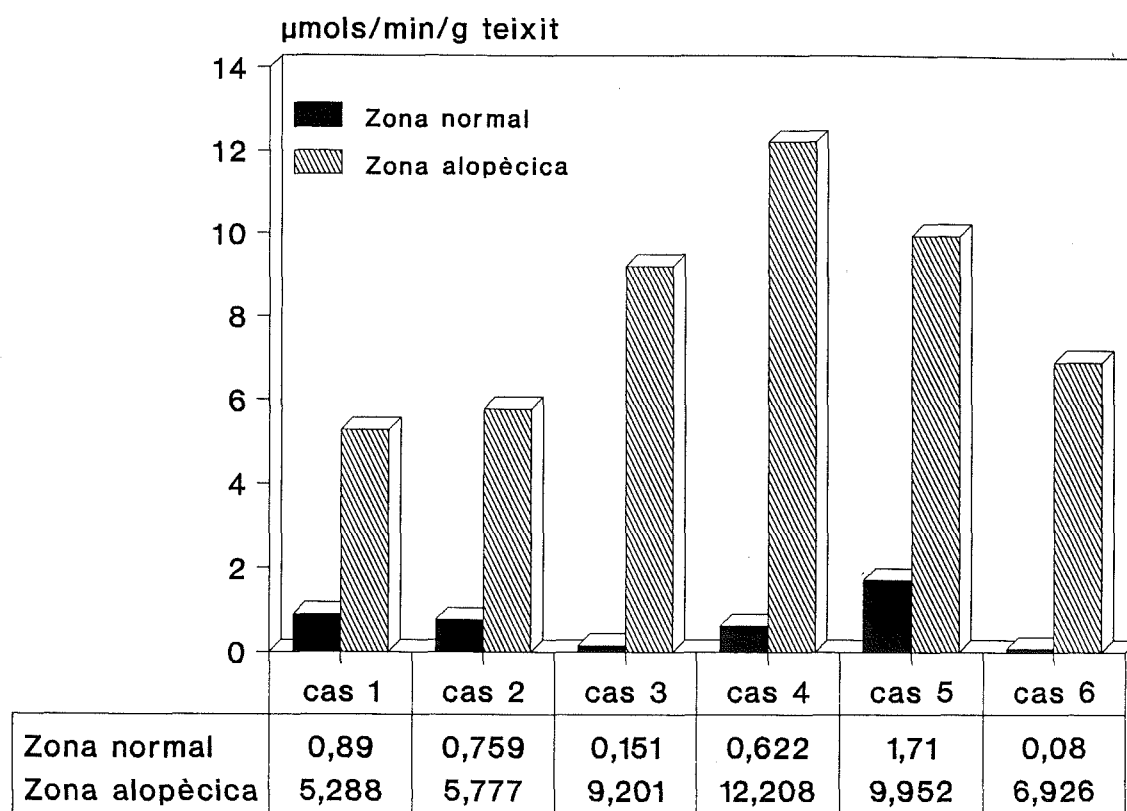


Fig. 15. $V_{\text{max}}/\text{teixit}$ de mostres aparellades.

3.2.- Activitat isomerasa de la GST

3.2.1.- Estudis previs en fracció soluble de fetge de rata

La fracció soluble de fetge de rata mostra activitat isomerasa davant el substrat 5-androsteno-3,17-diona. L'activitat, com es pot veure a la fig. 16A, és lineal en funció del temps fins als dos minuts.

En la fig. 16B, l'activitat isomerasa de la GST s'estudia en funció de la concentració de les proteïnes, mantenint constant la concentració del substrat (68 μM) i sempre en presència de GSH (100 μM).

Un cop conegudes les condicions de temps i de quantitat de proteïnes es va realitzar l'estudi variant la concentració del substrat. A la fig. 17A es pot observar com a 68 μM s'arriba a la saturació; aquesta concentració és la descrita per altres autors per determinar l'activitat isomerasa (16, 15).

De les dades obtingudes en la fig. 17A es van determinar els valors de les constants de Michaelis (K_m i V_{max}) a través de la representació de Lineweaver-Burk (fig. 17B). La V_{max} i la K_m presentaven un valor de 11,62 $\mu\text{mols}/\text{min}/\text{mg}$ prot i 16,14 μM , respectivament.

Tenint en compte aquests punts anteriors es poden definir les condicions òptimes de l'assaig de la següent manera:

GSH = 100 μM

5-androsteno-3,17-diona = 68 μM

temps de reacció = 3 min

concentració de proteïnes = fins a 0,441 mg

RESULTATS I DISCUSSIÓ

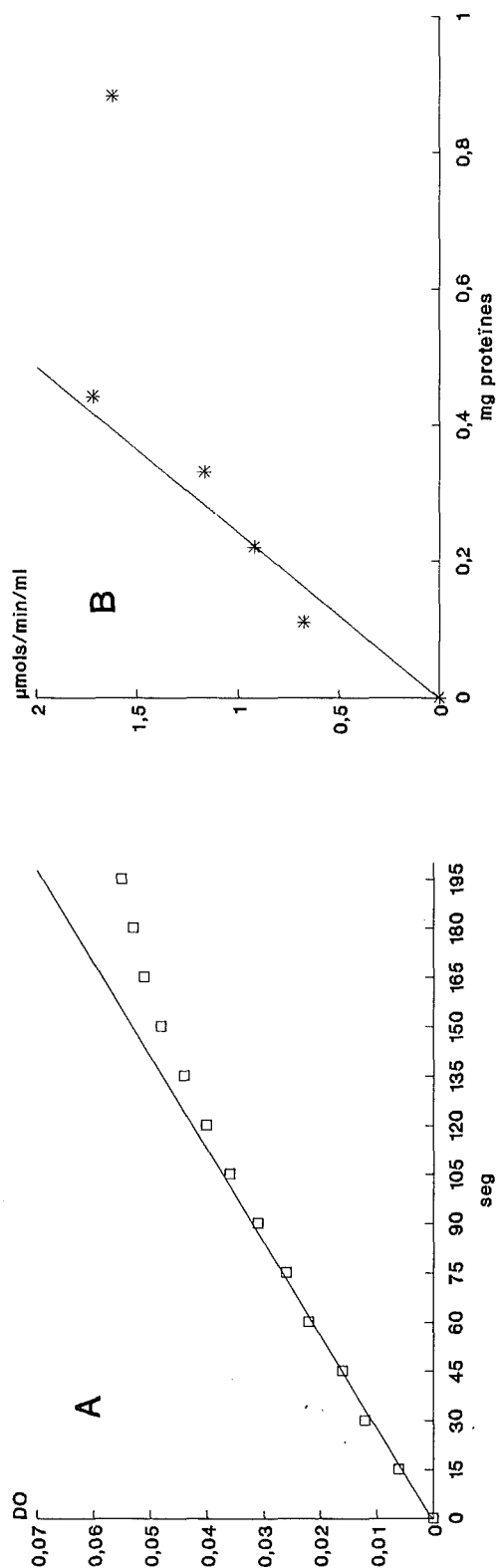


Fig. 16. Linealitat de la reacció isomerasa respecte al temps (A) i al contingut de proteïnes (B). DO: increment de la densitat òptica a 242 nm.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

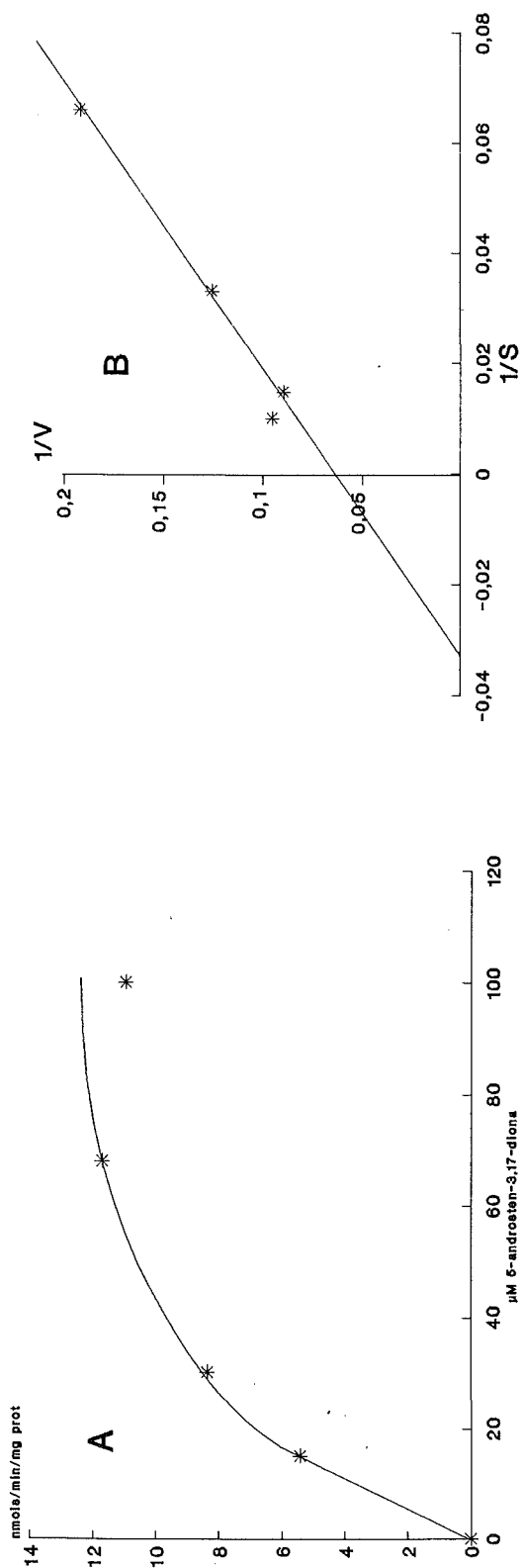


Fig. 17. Estudi enzimàtic de la funció isomerasa de la GST.

A: Representació de Michaelis-Menten (nmols de producte isomeritzat per minut i per mg de proteïna, en funció de la concentració del substrat 5-androsteno-3,17-diona).

B: representació de Lineweaver-Burk. S= concentració de 5-androsteno-3,17-diona; V=velocitat en nmols/min/mg prot.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Aquestes condicions coincideixen amb les descrites per Benson i col. (15, 16), que obtenien una activitat isomerasa en fetge de rata Sprague-Dawley de 0,8 $\mu\text{mols}/\text{min}/\text{ml}$, davant els nostres resultats d'1,7 $\mu\text{mols}/\text{min}/\text{ml}$. La K_m que obtenen coincideix amb la nostra, de 16 μM .

3.2.2.- Activitat isomerasa de la GST en glàndula sebàcia

Un cop conegudes les condicions de treball, es van aplicar a les fraccions solubles de glàndula sebàcia. De les mostres estudiades, en cap cas es van obtenir resultats que poguessin indicar la presència de funció isomerasa, ja que els valors estaven dintre dels límits que es consideren activitat espontània i per tant en un principi podríem dir que no hi ha activitat isomerasa en glàndula sebàcia.

L'activitat isomerasa de la GST és preferentment desenvolupada pels isoenzims bàsics; hem trobat poques referències on s'indiqui una activitat isomerasa en les formes neutres i àcides (114, 113), i en tots els casos s'obtenia nivell molt baix amb alta concentració de l'enzim. Per tant, el fet que nosaltres no trobem aquesta activitat isomerasa ens indicaria que estem davant d'un enzim àcid o neutre, o, en tot cas, que el percentatge d'isoenzims bàsics és baix.

Dibbelt i col. (49) descriuen activitat isomerasa en GST placentària. La placenta té majoritàriament GST pi i en un petit percentatge GST bàsiques (182). Aquesta activitat isomerasa de placenta s'obté després de la purificació de l'enzim; per tant, sembla probable que sigui deguda a les GST bàsiques presents en el teixit. Si nosaltres eluïssim les nostres mostres a través de columnes d'afinitat de GSH, aconseguiríem segurament obtenir activitat isomerasa si a la pell hi hagués isoformes bàsiques com sembla demostrar els nostres resultats de purificació de l'enzim que comentarem a l'apartat 4.

3.3.- Inhibició de la GST per esteroides

Aquest estudi s'ha portat a terme inicialment en fracció soluble de fetge de rata, per tal de poder fer un estudi complet de la influència dels esteroides en la GST i conèixer el tipus d'inhibició i si va acompanyada de consum de GSH.

3.3.1.- Mostres de fetge de rata

Es van provar diferents esteroides; com a pas previ es va estudiar la solubilitat, comprovant que eren solubles la testosterona, androstenodiona (4-androsteno-3,17-diona) i parcialment l'androstanodiona (5 α -androstandiona), per a concentracions compreses entre 0,1 i 1 mM.

No es va aconseguir solubilitat amb la dihidrotestosterona (5 α -androstandiol-3ona), 5 α -androstandiol-3 β ,17 β -diol, 5 α -androstandiol-3 α ,17 β -diol.

A la fig. 18 es pot veure com disminueix l'activitat de la GST per a una concentració determinada de CDNB al llarg de la variació de la concentració de l'esteroides (0,1- 1mM).

Com es pot apreciar, la disminució de l'activitat és més important per a la testosterona, amb una descens d'activitat per a la concentració alta del 73,7% de l'activitat inicial.

Per a la androstanodiona tan sols s'ha pogut fer fins a una concentració de 0,5 mM, per problemes de solubilitat. La inhibició és menor que amb la testosterona, ja que la pèrdua d'activitat és del 33% davant el 43,4% de la testosterona per a aquesta concentració d'esteroides.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

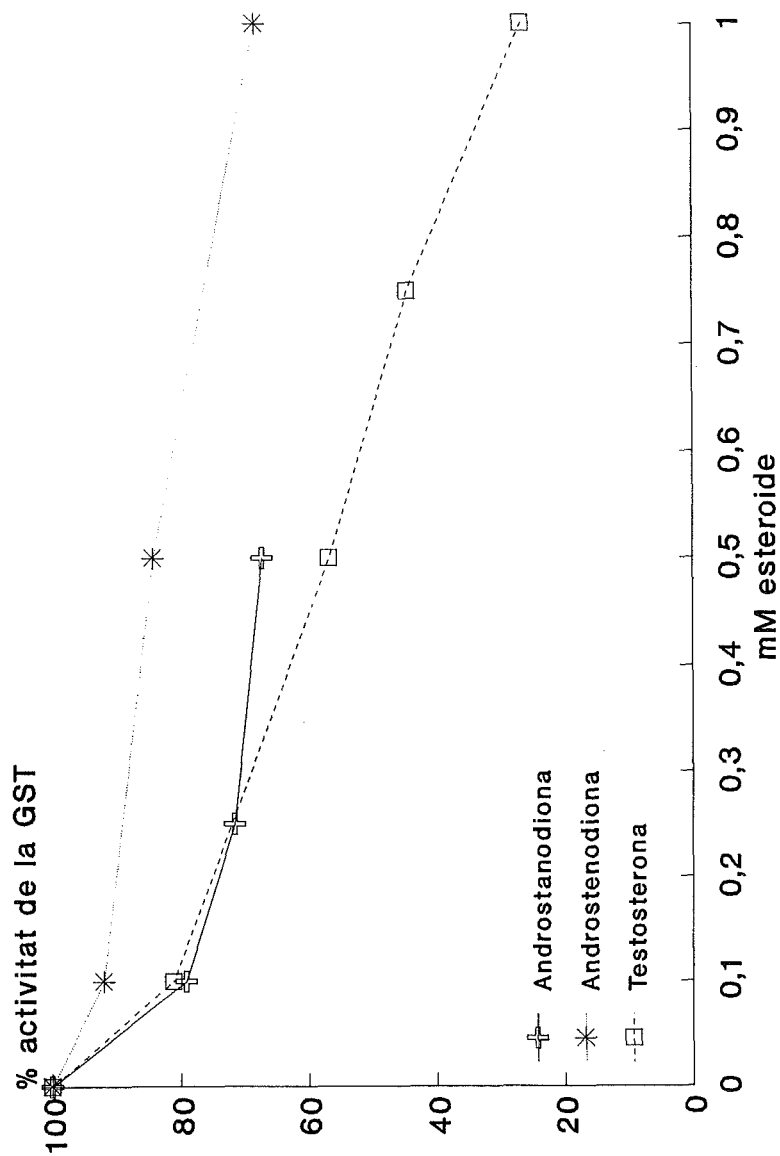


Fig. 18. Activitat residual de la GST en presència d'esteroïdes.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

L'androstenediona és el producte de la reacció de l'isomerasa i mostra el menor grau d'inhibició dels tres esteroides provats. Així, a la concentració màxima provada (1 mM), tan sols trobem una pèrdua d'activitat del 32%.

Un cop comprovada la disminució de l'activitat, es va estudiar la K_i de la testosterona i androstenediona.

A les taules 15 i 16 estan representats els diferents paràmetres enzimàtics - K_m , V_{max} i K_i - de la testosterona i androstenediona, respectivament. A la fig. 19, la representació de Lineweaver-Burk per a aquests paràmetres.

	V_{max} $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$	K_m	K_i
TESTOSTERONA			
etanol	2,17	$0,10 \times 10^{-3} \text{ M}$	$0,6 \times 10^{-3} \text{ M}$
0,1 mM	1,19	$0,12 \times 10^{-3} \text{ M}$	
0,25 mM	1,25	$0,23 \times 10^{-3} \text{ M}$	
0,5 mM	0,98	$0,12 \times 10^{-3} \text{ M}$	
0,75 mM	0,60	$0,10 \times 10^{-3} \text{ M}$	

TAULA 15.- Valors de V_{max} ($\mu\text{mols}/\text{min}/\text{mg prot}$), K_m (mM) i K_i (mM) de la GST de fetge de rata amb presència de testosterona en la reacció *in vitro*.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

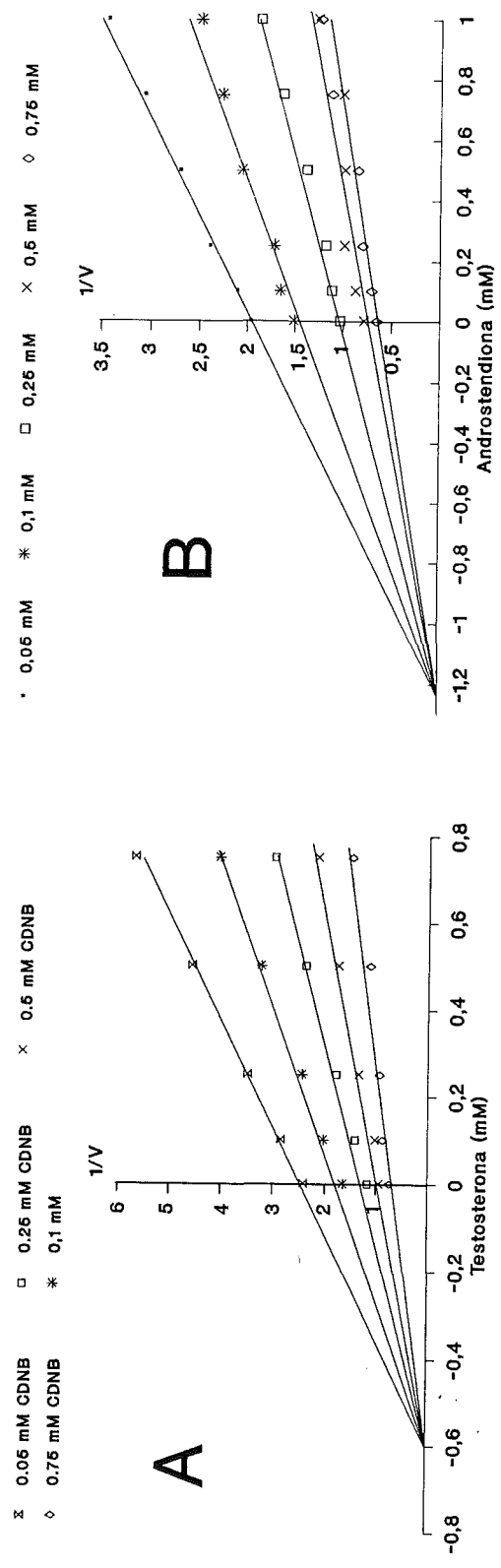


Fig.19. Inhibició de l'activitat GST amb testosterona (A) i androstenodiona (B).
 Gràfica semirecíproca per a diferents concentracions de CDNB.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

ANDROSTENODIONA	Vmax $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$	Km	Ki
etanol	1,01	$0,15 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,21 \times 10^{-3} \text{ M}$
0,1 mM	0,75	$0,19 \times 10^{-3} \text{ M}$	
0,25 mM	0,72	$0,19 \times 10^{-3} \text{ M}$	
0,75 mM	0,55	$0,18 \times 10^{-3} \text{ M}$	

TAULA 16.- Valors de Vmax ($\mu\text{mols}/\text{min}/\text{mg prot}$), Km (mM) i Ki (mM) de la GST de fetge de rata amb presència de androstenodiona en la reacció *in vitro*.

Paral·lelament, es va estudiar el consum de GSH de la reacció enzimàtica a través de la reacció d'Ellman. S'observa que existeix una disminució del consum de GSH conjuntament amb la menor formació del conjugat (fig. 20).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

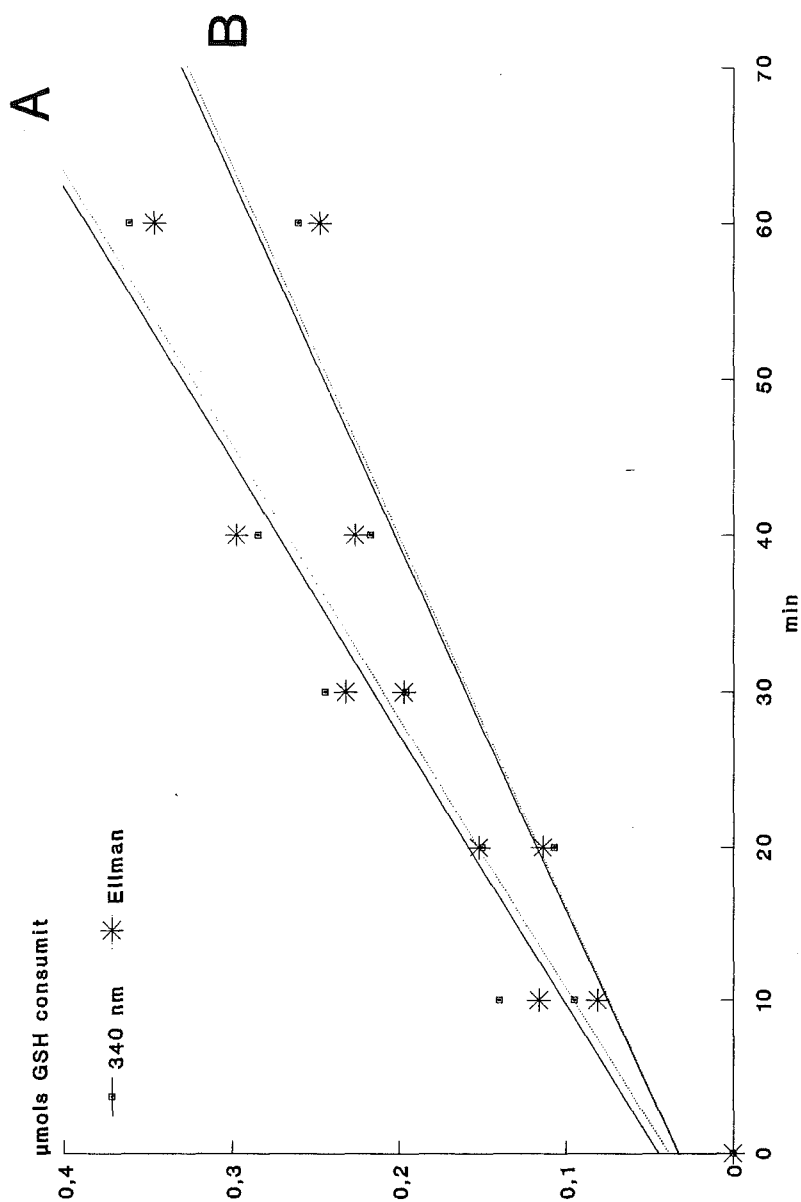


Fig.20. Consum de GSH al llarg de la reacció de la GST.

A: activitat GST sense esteroide, B: amb testosterona.

3.3.2.- Mostres de glàndula sebàcia humanes

En les mostres humanes, l'estudi de la inhibició s'ha mostrat més complex. S'ha obtingut solubilitat en el cas de: androstenodiona, testosterona, dihidrotestosterona (5α -androstandio-17 β -ol-3ona), 5α -androstandio-3 β ,17 β -diol i 5α -androstandio-3 α ,17 β -diol. D'aquests esteroides, s'ha obtingut inhibició amb androstenodiona i testosterona. Els altres esteroides han mostrat una reacció molt complexa ja que no disminuïa l'activitat GST per al CDNB, sinó que aquesta mostrava un increment (fig. 21). Per estudis espectrals s'ha vist que aquests esteroides no eren estables a 340 nm i mostraven un increment que podia ser secundari a la formació d'un metabòlit de l'esteroides.

En aquells esteroides que ha estat possible estudiar la inhibició, hem obtingut resultat contradictoris, ja que s'observa inhibició però és difícil de distingir si és competitiva o no competitiva a les diferents concentracions dels esteroides provats.

A través de la representació de Michaelis-Menten (fig. 22) es pot observar la dificultat d'obtenir una reacció saturada, i per tant de veure la forma d'inhibició; amb les altres possibles representacions es pot entreveure una inhibició competitiva per a les concentracions baixes de l'esteroides i no competitiva per a la concentració alta (1 mM) de l'esteroides (fig. 23).

Estudis d'inhibició de la GST en esteroides s'han portat a terme per altres autors en fetge de rata (141) i, per tant, principalment sobre GST bàsiques i neutres. La inhibició que presenten és no competitiva per a la GST B de rata i *acompetitiva* per a les GST A (bàsica) i GST C (neutra).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

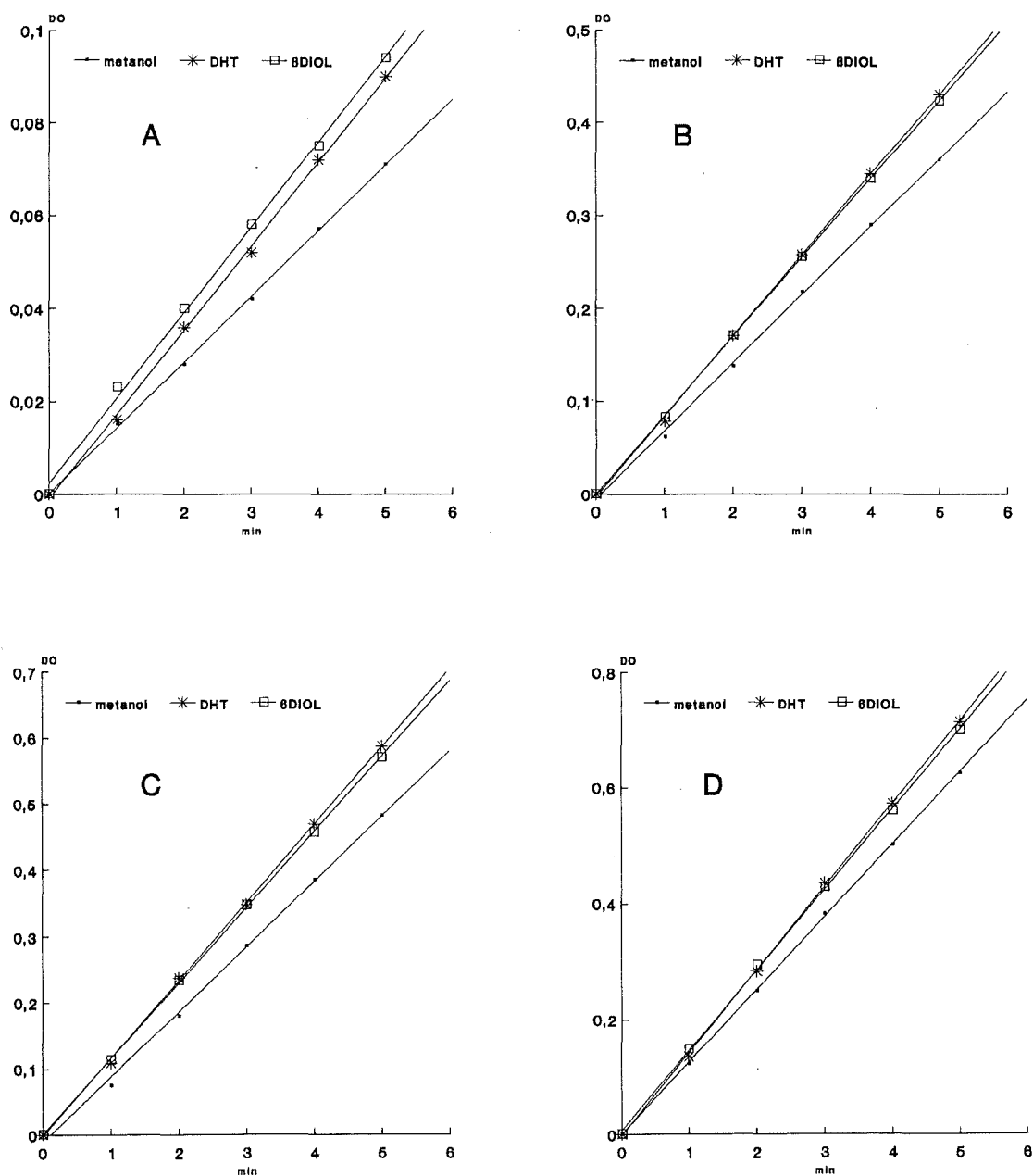


Fig. 21. Activitat de la GST de la glàndula sebàcia sota l'efecte de la dihidrotestosterona (DHT) i 5α -androstano- 3α , 17β -diol (8DIOL). A: 0,07 mM CDNB, B: 0,5 mM CDNB, C: 0,75 mM CDNB, D: 1 mM CDNB.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

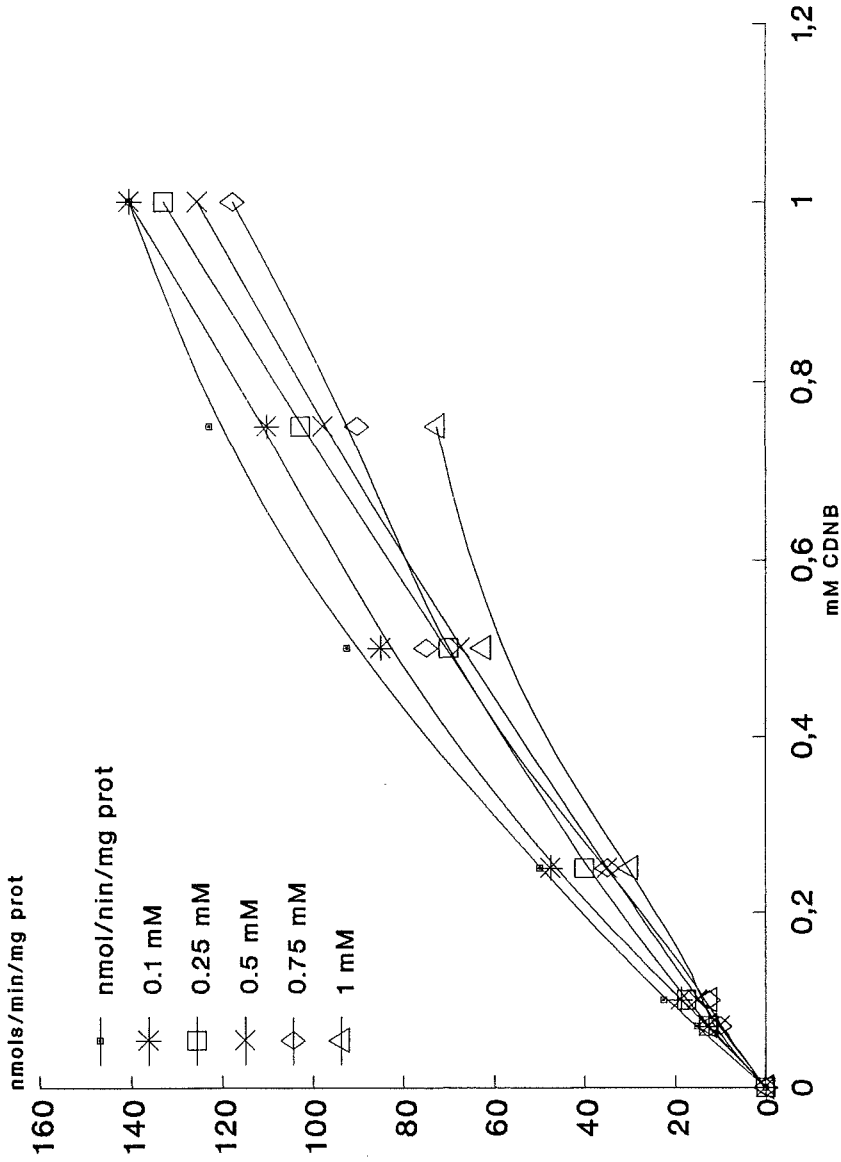
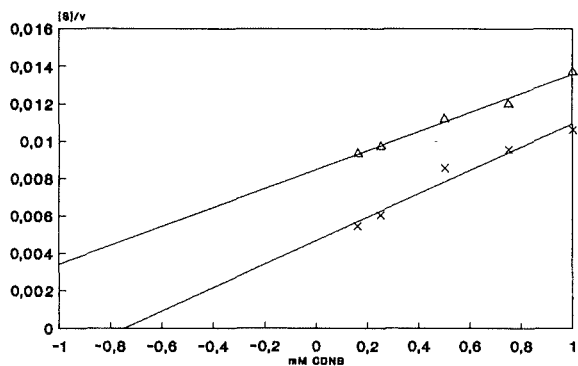
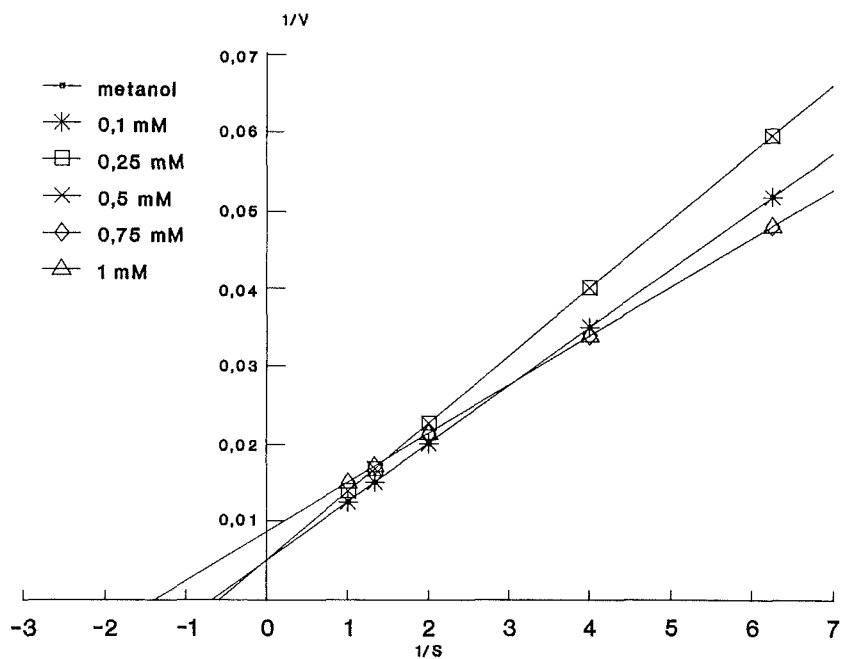
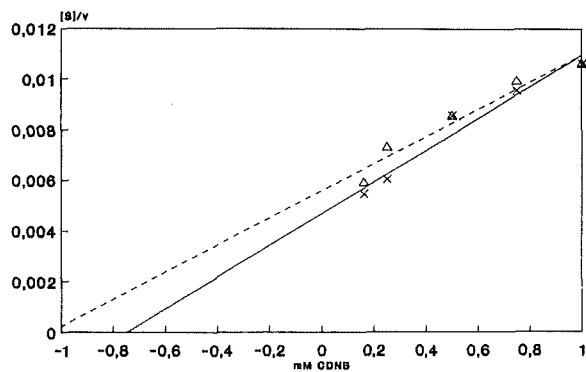


Fig. 22. Representació de Michaelis-Menten per a l'activitat GST de la glàndula sebàcia sota l'efecte de l'androstenedion a.

RESULTATS I DISCUSSIÓ



—x— metanol —△— 1 mM



—x— metanol —△— 0,1 mM

Fig.23. Diferents representacions gràfiques de la inhibició de la GST de la glàndula sebàcia per l'androstenodiona.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

En humans s'ha fet un estudi d'inhibició de l'activitat GST en placenta i, per tant, principalment sobre GST pi (49). En aquest treball han estudiat, com nosaltres, a part d'altres esteroides, la 5-androsteno-3,17-diona, que presenta una inhibició no competitiva amb una K_i de 3,2 mM. Altres esteroides mostren inhibició competitiva, com per exemple l'estradiol i diferents metabòlits de l'estriol. Veuen, a més, que la testosterona, la DHT i la 4-androsteno-3,17-diona no mostren influència sobre l'activitat enzimàtica.

Els resultats confirmen els efectes d'inhibició dels esteroides en la reacció de la GST amb el CDNB i el GSH. Aquesta inhibició és diferent a la que hem pogut observar en fetge de rata possiblement perquè ens trobem davant de diferents formes d'isoenzims; així, en el cas del fetge hi ha un predomini de les formes bàsiques i per tant major activitat isomerasa i en la glàndula sebàcia com veurem en l'apartat següent hi ha un predomini de GST àcides amb poca activitat isomerasa.

Podríem dir doncs que la GST és veu influenciada pels esteroides, possiblement les hormones esteroïdals en el fetge s'uneixin a la GST en un locus relacionat amb la funció isomerasa d'aquest enzim (16, 15) i l'ocupació de la GST per esteroides nadius o bé pels seus derivats electrofílics representa una pèrdua potencial del seu paper protector.

En la glàndula sebàcia l'afectació pot ser més complexa perquè ens trobem davant de diferents formes de GST -petit percentatge de bàsiques- i metabolisme diferent dels esteroides, per tant tenim la presència d'enzims en el citosol amb capacitat de metabolitzar els andrògens que utilitzem per a la reacció d'inhibició de la GST. Així, potser hagués estat necessari treballar amb formes de GST purificades o haver fet l'extracció dels altres enzims del citosol i possibles metabòlits endògens del medi per tal d'evitar aquestes interferències.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Així i tot, podem pensar que en la glàndula sebàcia de les zones alopeciques on el metabolisme d'andrògens està augmentat, la GST pot veure alterada les seves funcions, ja sigui perquè bloquegen el petit percentatge de GST bàsiques -funció isomerasa- o perquè un major estrès oxidatiu -secundari al metabolisme esteroïdal- pugui alterar l'estructura de la GST pi -funció de conjugació-.

S'ha de tenir en compte que altres autors apunten la possibilitat que la GST tingui funció en la formació, transport, metabolisme i potser fins i tot en l'acció de les hormones esteroïdals (84, 124, 121). Aquest fet conjuntament amb la inhibició més complexa de la GST en glàndula sebàcia ens podria indicar que aquest enzim juga un paper important en el metabolisme d'andrògens en la glàndula sebàcia; un millor coneixement d'aquests mecanismes podria comportar un aclariment dels aspectes etiopatogènics d'algunes alteracions hormonals.

Podem, per tant, pensar que la GST de glàndula sebàcia està involucrada en el transport i metabolisme d'esteroides o que l'activitat de l'enzim és regulada per esteroides *in vivo*.

4.- Purificació de la GST

4.1.- Cromatografia d'intercanvi iònic

Un primer pas en la purificació de l'enzim va ser la cromatografia d'intercanvi iònic. Els resultats es poden veure a la taula 17 i ens mostren que, quan s'utilitza una matriu per a proteïnes aniòniques com és el Sephacel DEAE (veure Material i Mètodes), aconseguim retenir l'enzim quasi totalment. En el cas contrari, en utilitzar columnes amb matriu per a proteïnes catiòniques (Sephadex CM), l'enzim queda adsorbit a la matriu en un 36% aproximadament.

Això indicaria que la GST de glàndula sebàcia és principalment una isoforma àcida, encara que hi podria haver-hi presència d'altres formes minoritàries de naturalesa catiònica.

Les mostres que es van utilitzar per a aquesta experiència van ser mostres de zona normal de dona.

Cas nº	CM SEPHADEX	DEAE SEPHACEL		
	1	2	3	4
Inicial	364,58	754,68	575	4320
Mostra	104,16	15,62	0	0
Tampó	156,25	0	0	16,4
NaCl	130,20	604,16	581,2	3655,2

TAULA 17.- Activitat de la glàndula sebàcia (Δ /min/volum total) de la zona normal de dona utilitzant com a substrat CDNB (1 mM), després d'eluir la mostra a través d'una columna d'intercanvi iònic. Els valors corresponen a: inicial (mostra abans d'eluir a través de la columna), mostra (les fraccions recollides un cop s'ha passat la mostra per la columna), tampó (activitat de les fraccions després de passar tampó per la columna) i NaCl (activitat de les fraccions recollides després d'elució amb NaCl).

4.2.- Cromatoenfoc

El cromatoenfoc s'ha utilitzat per conèixer la presència dels diferents isoenzims de la GST present en glàndula sebàcia. Per aquest motiu s'ha realitzat aquesta tècnica en 15 mostres, de les quals quatre corresponien a zona occipital d'autòpsies d'homa, tres de zona retroauricular de dona i vuit corresponien a mostres d'homes procedents d'autotrasplantaments de zona alopècica.

L'activitat GST mesurada amb CDNB i GSH com a substrats elueix en diferents pics, els quals es poden agrupar en tres grups per al seu estudi:

a) el primer grup correspondria a un pI bàsic, ja que elueix en entrar a la columna, a pH entre 7,7 i 6,8. No elueix d'una forma definida, és a dir, no elueix com a un únic pic. Aquest primer grup d'isoformes bàsiques s'expressa en totes les mostres estudiades, a excepció d'una de les mostres de zona alopècica.

Quant al percentatge d'activitat d'aquest grup bàsic respecte al total d'activitat eluïda, com podem veure a les taules 18, 19 i 20 està al voltant del 10-30 %. No s'observen diferències entre els tres diferents tipus de mostres, si bé en el cas de les zones alopèciques d'homes apareix una major dispersió de resultats, arribant a un màxim del 44,4% de l'activitat, enfront del 22,2% en les zones normals d'homes i 19,35 % en les zones normals de dones. Aquest fet ens podria indicar una major activitat alfa en la zona alopècica d'homes; possiblement, si s'hagués disposat d'un nombre més elevat de casos, haguéssim pogut arribar a una significació estadística entre les zones normals i les zones alopèciques.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Cromatoenfoc Zona Normal home

	I	II	III
pI	7,7 - 7,30	6,5 - 5,50	4,90 - 4,70
nmols/min/ml			
A	4,9 - 6,61	0,0 - 4,37	16,62 - 75,80
B	5,35 ± 0,93	3,82 ± 0,71	34,27 ± 27,80
%			
A	2,8 - 17,61	0,0 - 6,11	73,30 - 94,60
B	14,56 ± 8,28	3,65 ± 2,12	82,63 ± 9,62
n	4	3	4

TAULA 18.- Pics del cromatoenfoc de quatre mostres de glàndula sebàcia de la zona normal d'homes (autòpsia), amb els corresponents pI, activitat GST/ml, % del total d'activitat que representa cada pic, nombre de mostres que els han presentat (A: mínim - màxim, B: mitjana ± desviació estàndard).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Cromatoenfoc Zona Normal dona

	I	II	III
pI	7,5 - 6,90	6,6 - 5,80	4,70
nmols/min/ml			
A	3,8 - 8,69	3,1 - 15,11	18,82 - 34,90
B	6,18 ± 2,44	7,8 ± 6,4	20,91 ± 13,1
%			
A	13,8 - 19,35	4,5 - 19,93	66,24 - 73,31
B	21,1 ± 8,4	10,6 ± 8,1	68,19 ± 4,46
n	3	3	3

TAULA 19.- Pics del cromatoenfoc de tres mostres de glàndula sebàcia de la zona normal de dones, amb els corresponents pI, activitat GST/ml, % del total d'activitat que representa cada pic i nombre de mostres que els presenten (A: mínim - màxim, B: mitjana ± desviació estàndard).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Cromatoenfoc Zona Alopèica

	I	II	III
pI	7,6 - 6,80	6,5 - 5,40	4,80 - 4,50
nmols/min/ml			
A	0 - 24,11	0 - 7,66	6,64 - 28,03
B	9,42 ± 7,05	5,79 ± 1,0	17,58 ± 6,6
%			
A	0 - 44,43	0 - 29,30	26,26 - 94,90
B	20,2 ± 15,5	13,5 ± 12,1	75,44 ± 24,4
n	7	4	8

TAULA 20.- Pics del cromatoenfoc de vuit mostres de glàndula sebàcia de la zona alopèica d'homes, amb els corresponents pI, activitat GST/ml, % del total d'activitat que representa cada pic i nombre de mostres que els presenten (A: mínim - màxim, B: mitjana ± desviació estàndard).

b) El segon grup de pics que ha eluït del cromatoenfoc estaria entre pH 6,6 i 5,5, i podria ser catalogat com a neutre. En la gran majoria dels casos ha eluït en forma de dos pics: un al voltant de pH 6,5 i l'altre, més àcid, a pH 5,5. S'ha de tenir en compte també que aquest grup de pics en algunes mostres no s'ha vist; així, en el cas dels homes, en zona normal hi ha hagut un cas on no ha aparegut i en la zona alopècica quatre casos. D'aquests últims, un correspon al cas on tampoc apareixien els isoenzims bàsics.

El percentatge d'activitat d'aquest grup respecte al total varia del 5% al 10 %, però a l'igual que en el grup dels isoenzims bàsics trobem una major dispersió en els valors que corresponen a la zona alopècica.

c) El tercer grup correspon a un sol pic i és el majoritari en tots els teixits estudiats. Elueix a un pH quasi bé sempre fix de 4,7; per tant, correspondria a un isoenzim àcid de les GST. És present en totes les mostres.

El percentatge d'activitat d'aquest últim pic respecte al total correspondria a un 70-80%, i a l'igual que en els altres dos grups hi ha una major dispersió de resultats en les zones alopèciques.

Comparant els resultats obtinguts, es pot veure que la zona normal d'home presenta major percentatge d'activitat àcida respecte a la zona de dona i la zona alopècica. Aquest fet ens indicaria que en els homes no hi ha tanta presència d'activitat GST a càrrec d'isoformes bàsiques i neutres com la que s'observa en la dona i en la zona alopècica.

En definitiva, podem dir, doncs, que a la pell hi ha un grup de GST bàsiques, amb un grau de dispersió important en les zones alopèciques d'home pel que fa al percentatge d'activitat. També s'observa un grup de GST que nosaltres hem indicat com de zona neutra però que probablement correspondria a dos

RESULTATS I DISCUSSIÓ

isoenzims diferents: un neutre (pI 6,5) que podria correspondre a una forma de classe mu, i un altre ja més àcid (pI 5,5) que podria correspondre a l'isoenzim que s'ha identificat en fetge i cervell i que s'ha anomenat GST 5-5 (189). I, finalment, hem obtingut un grup de GST àcides, que correspondria a la GST pi que ja ha estat identificada en pell i glàndula sebàcia per tècniques d'immunohistoquímica (91, 135, 98, 195).

En les figures 24-26 es podem veure tres dels cromatoenfocs obtinguts.

Del Boccio i col. (46) descriuen, analitzant tres mostres de pell humana sencera (extremitat inferior) per tècniques d'isoelectroenfoc, la presència de sis formes de GST, de pI 4,6, 5,9, 6,8, 7,1, 8,5 i 9,9, essent la majoritària, com en el nostre cas, l'àcida de pI 4,6 i les bàsiques de pI 8,5 i 9,9; aquestes formes les identifica per tècniques immunològiques, l'àcida com de classe pi i les bàsiques com de classe alfa. Dins d'aquestes últimes, la forma de pI 9,9 no es corresponia a les GST bàsiques hepàtiques estudiades fins a aquell moment. Les altres formes no les identificava per no disposar de suficient quantitat de mostra. Això concordaria amb els nostres resultats.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

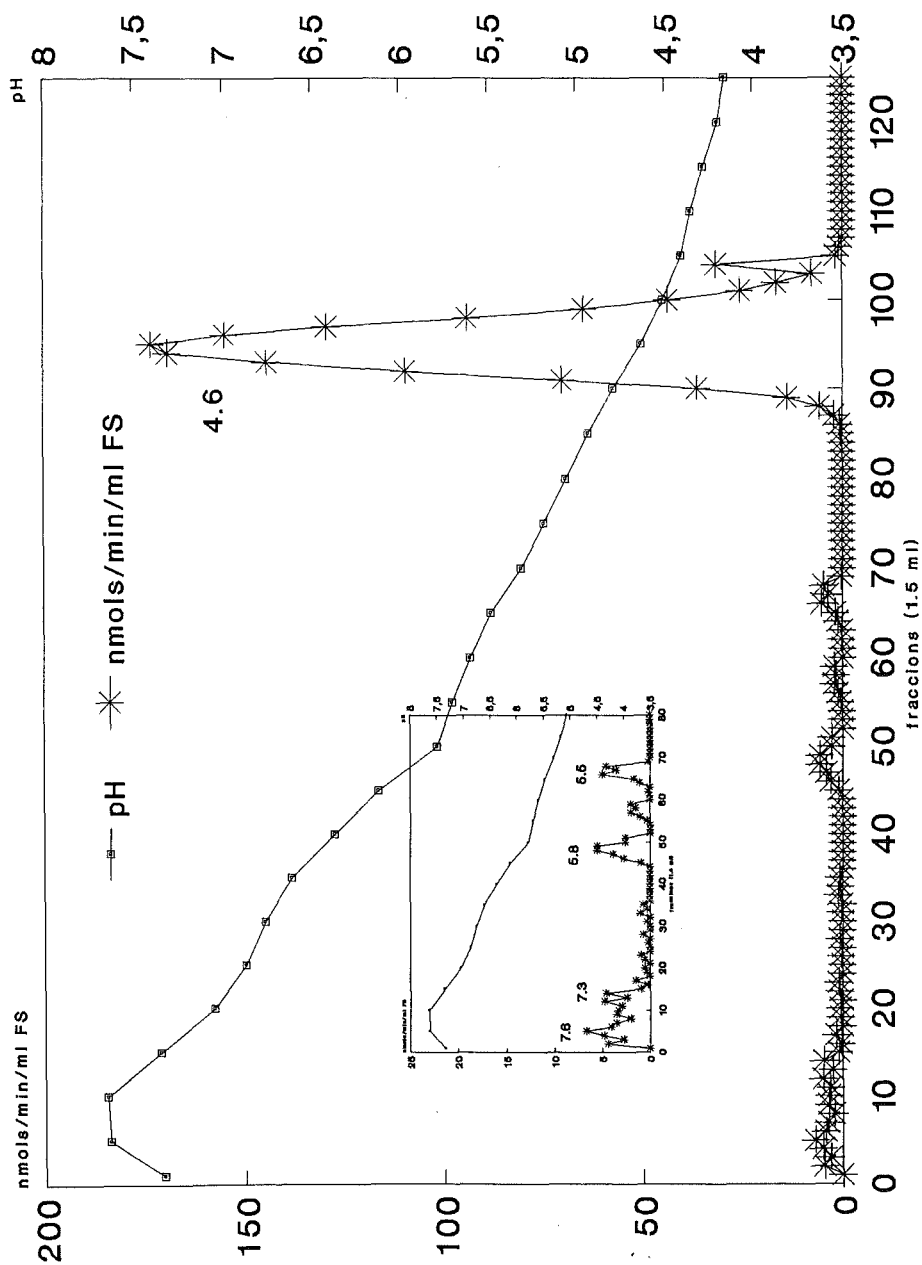


Fig. 24. Cromatofoc de la fracció soluble de la glàndula sebàcia de la zona normal d'home.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

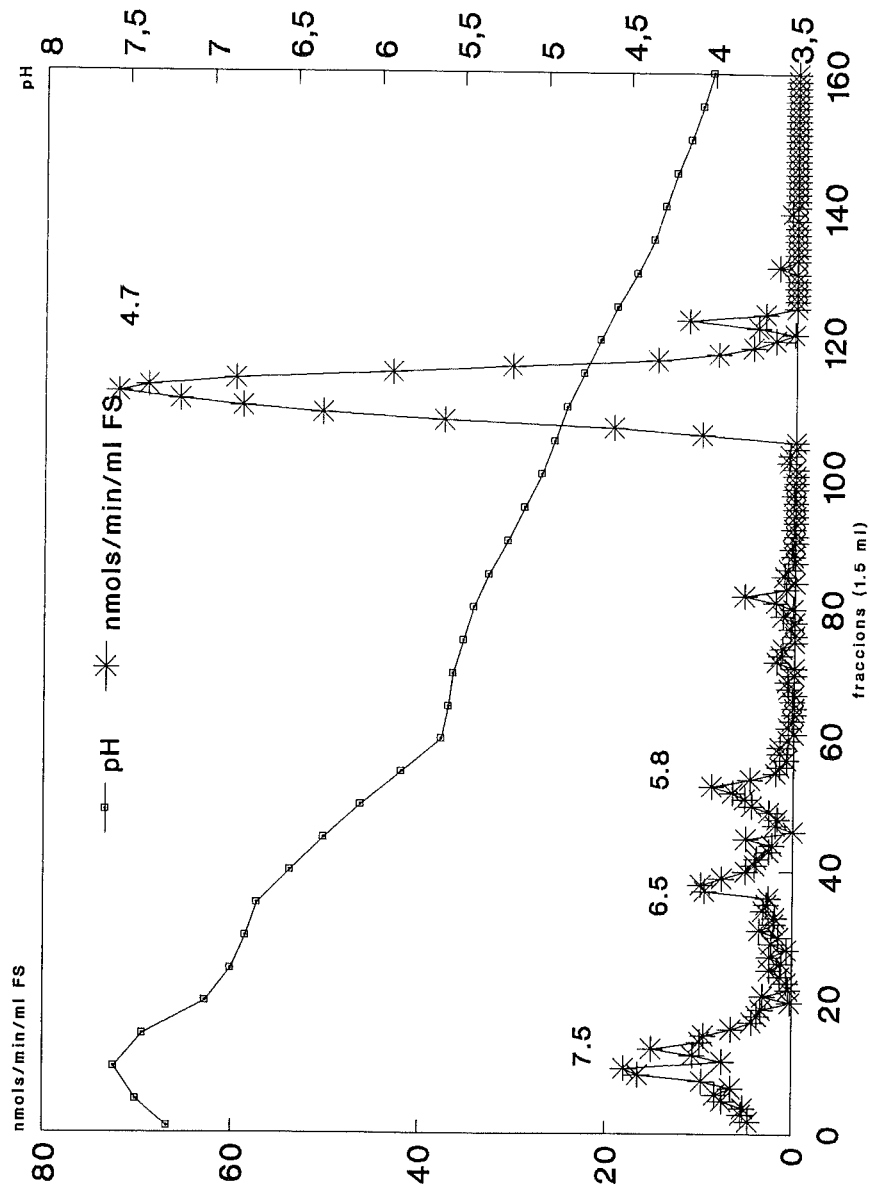


Fig. 25. Cromatofoc de la fracció soluble de la glàndula sebàcia de la zona normal de dona.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

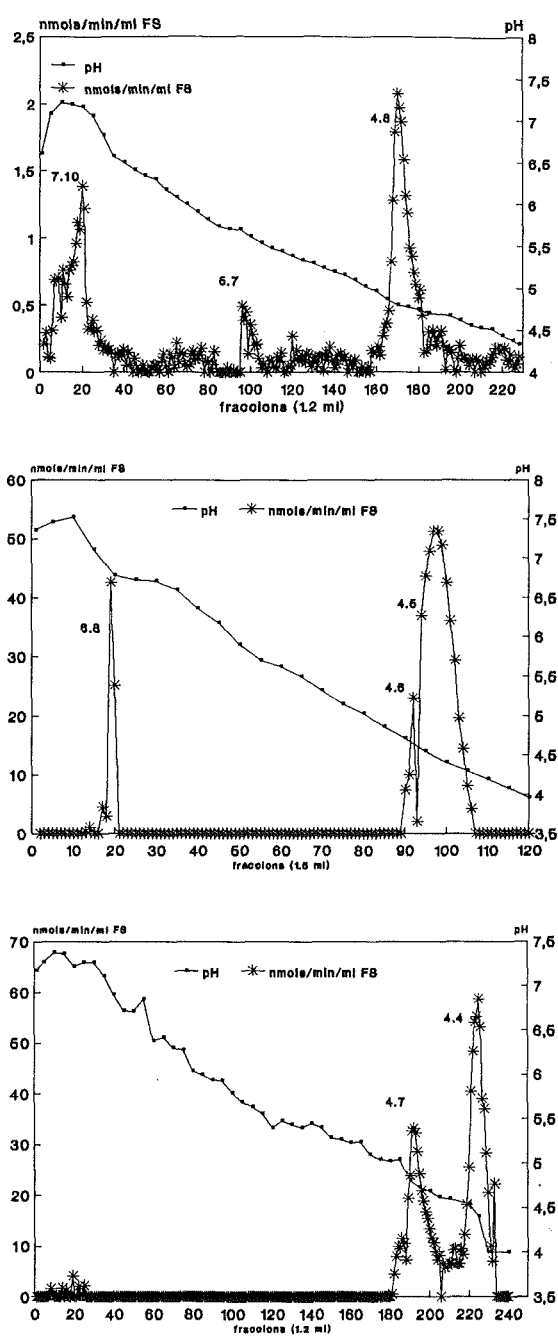


Fig. 26. Cromatoenfoc de la fracció soluble de la glàndula sebàcia de la zona alopèica d'home.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.- ELISA

Per tal de poder identificar els isoenzims dels diferents pics que havien eluït del cromatoenfoc, es van realitzar tècniques immunològiques d'ELISA. Així, els tres grups de pics aïllats van ser enfrontats a anticossos anti-GST alfa i anti-GST pi, obtenint-se com a resultat les dades que observem a la taula 21.

	Anticòs anti- α	Anticòs anti- π
Pics bàsics	+	-
Pics neutres 6,6 5,5	- -	- -
Pics àcids	-	+++

TAULA 21.-Resultats obtinguts en la tècnica d'ELISA, enfrontant les fraccions eluïdes del cromatoenfoc de l'apartat 5.2 a anticossos anti-GST pi i anti-GST alfa.

Per tant, podem considerar que les fraccions del pic àcid correspon a una GST pi, el grup de GST neutres no és ni alfa ni pi, i el grup de GST bàsiques ha mostrat un resultat positiu davant els anticossos anti- α , però presentant una reacció no tan específica com la que hem trobat en el cas del grup àcid enfrontat a l'anticòs anti- π , probablement perquè es tracta d'unes GST bàsiques no idèntiques a les GST bàsiques del fetge humà, com ja s'ha fet esment en l'apartat de cromatoenfoc (46). En tot cas, però, no es tracta de GST π .

RESULTATS I DISCUSSIÓ

6.- Contingut de GSH

GSH/mg proteïnes

	Homes		Dones
Zona Normal	n=7 0,066 ± 0,03	NS	n=15 0,065 ± 0,03
Zona Alopècica	n=15 0,042 ± 0,02	—————	S*

TAULA 22.- Contingut de GSH a la glàndula sebàcia en nmols -SH/mg proteïna (mitjana ± desviació estàndard). Les comparacions s'han fet aplicant el test t d'Student.* p < 0,001; + p < 0,05.

GSH/g teixit

	Homes		Dones
Zona Normal	n=7 1,123 ± 0,85	NS	n=15 0,903 ± 0,45
Zona Alopècica	n=15 0,426 ± 0,19	—————	S*

TAULA 23.- Contingut de GSH a la glàndula sebàcia en nmols -SH/g teixit (mitjana ± desviació estàndard). Les comparacions s'han fet aplicant el test t d'Student. * p < 0,001.

El GSH/mg proteïna i el GSH/g teixit presenten una distribució normal en els grups estudiats.

La distribució de freqüències d'aquestes mostres es pot veure en les figures 27 i 28.

El contingut de GSH de la glàndula sebàcia, mesurat pel mètode d'Ellman, no mostra diferències estadísticament significatives entre sexes. En canvi, el contingut de GSH/mg proteïna presenta una disminució estadísticament significativa en la zona alopecica respecte a la zona normal d'home (t d'Student, $p=0,037$). Si aquest paràmetre s'expressa per g de teixit, la significació encara és més marcada (t d'Student, $p=3,06 \times 10^{-3}$).

Si comparem el contingut de GSH/mg de proteïna de la zona alopecica amb el de dona, hi ha també una disminució estadísticament significativa en la zona alopecica (t d'Student, $p=9,96 \times 10^{-3}$). Quan s'expressa per g de teixit, la disminució és més important (t d'Student, $p=3,96 \times 10^{-4}$).

No hi ha dades a la literatura consultada sobre el contingut de GSH en glàndula sebàcia, però es coneix la manca de sistemes de defensa de radicals lliures a la pell, cosa que la fa més vulnerable.

Per altra banda, es coneix que el malondialdehid és un inhibidor de la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa, enzim que participa en la regeneració del NADPH necessari per reduir la forma oxidada del glutatió. Per tant, podríem pensar que existeix una inhibició d'aquest enzim secundària a l'augment de malondialdehid que veurem en la zona alopecica (apartat 8.1), i com a conseqüència el glutatió oxidat no es pot regenerar. S'ha de tenir en compte que el GSH és una defensa enfront de xenobiòtics electrofílics i oxidants intracel·lulars (radicals lliures, espècies reactives d'oxigen). Per això, el GSH també és un regulador del potencial redox cel·lular. De forma fisiològica, el consum d'aproximadament el

RESULTATS I DISCUSSIÓ

2-5% d'O₂ de la mitocòndria genera hidroperòxids d'hidrogen; per tal de poder-los eliminar, és necessari un *turn-over* en el cicle redox del GSH d'un 10% per min. Si l'hidroperòxid d'hidrogen no és reduït, es formen radicals hidroxils que inicien la cadena radicalar, donant lloc als lipoperòxids que poden danyar les membranes cel.lulars, els àcids nucleics, proteïnes i altres estructures cel.lulars. Una deplecció del GSH al voltant del 20-30% pot perjudicar la defensa cel.lular i pot conduir al dany i mort cel.lular (160). En aquest sentit, els nostres resultats ens indiquen que en la zona alopèica dels homes existeix una disminució del 36 % en el contingut de GSH quan expressem els resultats en funció de les proteïnes. Per tant, podríem pensar que aquesta disminució comporta un greu compromís en la defensa de la cèl.lula davant la generació de radicals lliures del metabolisme normal. Si a això s'hi afegeix que, com s'ha descrit, en aquesta zona hi ha un augment del metabolisme d'esteroides generadors de triols, responsables d'epòxids intermedis, encara és més greu aquesta situació.

Així, ja s'han descrit altres situacions patològiques que es poden veure afectades per la disminució de la concentració del GSH; en el cas de la síndrome d'immunodeficiència humana adquirida (SIDA), s'ha observat que està disminuït en el plasma, en l'epiteli de recubriment del pulmó i en els limfòcits T. Aquest dèficit pot potenciar la replicació del virus i accelerar la progressió de la malaltia (179).

En la diabetis s'ha vist una disminució de glutatió reduït en eritròcits i un augment de malondialdehid en molts teixits (99).

En el cas de la pell, el cicle redox després d'una afectació per substàncies al·lèrgiques com són alquilbenzens, inicialment deplecciona els nivells locals d'equivalents endògens reductors tals com el GSH i NADH (166). En estudis *in vitro* s'ha vist que la deplecció de GSH comporta un increment de la lipoperoxidació en el fetge després d'una inhibició del cicle de les pentoses (17).