

Ana Soares da Silva Rodrigues Neto

Glutationa

*Envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular
programada e destoxificação de drogas*

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto 2010



UFP-FCS

Glutathione: Envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas.



UFP-FCS

Glutationa: Envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas.

Ana Soares da Silva Rodrigues Neto

Glutationa

Envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto 2010



UFP-FCS

Glutationa: Envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas.

Glutationa

Envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas

Discente:

Ana Soares da Silva Rodrigues Neto

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre (mestrado integrado) em Ciências Farmacêuticas

Orientadora:

Professora Doutora Anabela Castro



Sumário

A glutathione (GSH) está profusamente distribuída em tecidos animais, vegetais e em microorganismos. Encontra-se presente em elevadas concentrações intracelulares (0.1-10 mM) e é conseqüentemente o tiol mais prevalente e o mais abundante péptido de baixo peso molecular. A GSH foi adaptada por processos evolutivos para realizar uma gama diversa de funções. Por exemplo, a glutathione mantém um adequado potencial de oxidação-redução nas células. A glutathione interfere na catálise, metabolismo e transporte; participa em reacções que envolvem a síntese de proteínas e ácidos nucleicos e também em reacções de metabolização de peróxidos e de inactivação de radicais livres. É frequente a formação de conjugados de glutathione com uma grande variedade de compostos de origem endógena e exógena e a glutathione é também um co-factor para diversas enzimas. A GSH é sintetizada intracelularmente e é exportada das células; a sua degradação é iniciada por γ -glutamyl transpeptidase, uma enzima conjugada à superfície externa de certas membranas celulares.

Alterações no metabolismo de glutathione em associação com um aumento do *stress* oxidativo tem sido relacionado com a patogenicidade de diversas doenças. Contudo, é ainda desconhecido se estratégias que tenham como objectivo restaurar a concentração de glutathione e a homeostasia são eficientes na melhoria ou modificação destes estados. Nesta revisão é focado o papel patogénico de alterações no metabolismo de glutathione em diversas doenças.

A apoptose representa um mecanismo fisiológico conservado de morte celular programada, que é essencial ao normal desenvolvimento e à homeostasia dos tecidos em todos os organismos, afirmando-se assim o papel crítico da GSH como modelador-chave das funções celulares. Desta forma, uma alteração da GSH celular para glutathione oxidada (GSSG) leva a que a alteração do balanço redox favoreça a permanência de espécies reactivas de oxigénio. Com isto a glutathione oxidada constitui um marco importante no destino da célula. Esta revisão aborda a descrição das diferentes vias apoptóticas, a compartimentalização celular de GSH e as proteínas redox de sinalização apoptótica assim como o papel dos mecanismos redox nas fases de iniciação e execução da apoptose.



Abstract

Glutathione (GSH) is widely distributed in animal tissues, plants, and microorganisms. It is present in high (0.1-10 mM) levels and is thus both the most prevalent cellular thiol and the most abundant low molecular weight peptide. GSH has been adapted through evolution to perform many diverse functions. Glutathione maintains proper oxidation-reduction potential inside cells. Redox affects the oxidation state of sulfur in enzymes, and thus affects the rates of biochemical reactions in cells. GSH functions in catalysis, metabolism, and transport; it participates in reactions involving the synthesis of proteins and nucleic acids and in those that scavenges peroxides and oxidizing free radicals. GSH forms conjugates with a variety of compounds of endogenous and exogenous origin and is a cofactor for various enzymes. GSH is synthesized intracellularly and is exported from cells; its breakdown is initiated by γ -glutamyl transpeptidase, an enzyme attached to the external surface of certain cell membranes.

Altered glutathione metabolism in association with increased oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of many diseases. However, whether strategies aimed at restoring glutathione concentration and homeostasis are effective in ameliorating or modifying the natural history of these states is unknown. In this review we focus the pathogenic role for altered glutathione metabolism in several diseases.

Apoptosis represents a physiologically conserved mechanism of cell death that is pivotal in normal development and tissue homeostasis in all organisms. As a key modulator of cell functions, GSH, plays a critical role. Thus, a shift in the cellular GSH to oxidized glutathione (GSSG) redox balance in favour of the oxidized species, GSSG, constitutes an important signal that could decide the fate of a cell. This review focus general description of cellular apoptotic pathways, cellular compartmentation of GSH and redox proteins to apoptotic signalling and the role of redox mechanisms in the initiation and execution phases of apoptosis.



Agradecimentos/Dedicatória

Acabar algo que num tempo passado iniciei, independentemente do teor de responsabilidade e importância, é, e será sempre desde de logo uma fulcral motivação. No âmbito do término de um Curso superior, verifica-se uma motivação exacerbada pela importância de um ciclo que se finaliza. A maior ambição não é por certo apenas encerrá-lo, é bem mais encerrá-lo com valor, mérito, credibilidade e com o devido sucesso pelo qual me empenhei e depus confiança. Este documento surge como o culminio de um longo percurso de 5anos de intensa aprendizagem.

Queria agradecer em primeira instância à faculdade por todo o apoio que ao longo destes 5 anos me foi prestado e por nela poder tido a possibilidade de me formar profissionalmente. Foi um longo percurso na qual sem o apoio da faculdade teria sido um trajecto bem mais difícil e com menos vontade de o acabar com sucesso. Obrigado pela oportunidade.

Queria agradecer à minha orientadora, Professora Anabela Castro por todo o apoio, por toda ajuda e por toda a disponibilidade que sempre demonstrou para comigo. Sem dúvida que foi um pilar muito importante para a execução desta dissertação. O meu sincero obrigado pelas horas de trabalho cedidas a esta dissertação.

Gostaria também de agradecer a todos os meus amigos e eternos companheiros de vida, por todo o apoio que ao longo da execução deste documento sempre mostraram disponível e toda a alegria e vivacidade que me dão para ultrapassar todos os obstáculos que se vão colocando ao longo da vida.

Agradeço também a todos que contribuíram directa ou indirectamente para que esta dissertação fosse possível.

Por fim queria dedicar este documento aos meus pais. Não pelo conteúdo do documento mas pela importância associada à dissertação. Sem eles não sou o que sou hoje, sem eles não teria tirado um curso e sem eles era metade de mim. Pelo enorme exemplo que sempre me deram como excelentes seres humanos e educandos, serei eternamente grata pelo facto de ter o privilégio de serem meus pais. Ao meu pai José Neto e à minha mãe Filomena Cunha, dedico esta dissertação.



Índice de figuras

Figura 1: Síntese de GSH	4
Figura 2: Fórmula estrutural de GSH e GSSG respectivamente.	6
Figura 3: Representação esquemática das reacções intervenientes da biossíntese da glutatona a partir dos seus aminoácidos constituintes	12
Figura 4: Reacções de biossíntese de GSH: a) γ -glutamylcisteína sintetase; b) glutatona sintetase; c) γ -glutamylciclotransferase; e BSO, inibidor da síntese de GSH	14
Figura 5: Esquematização do ciclo do γ -glutamilo	14
Figura 6: Esquematização do processo de compartimentação e exportação	15
Figura 7: Esquematização metabólica do processo de catabolismo	17
Figura 8: GSH na destoxificação de xenobióticos: via ácidos mercaptúricos	22
Figura 9: GSH na destoxificação de xenobióticos: Exemplos da actuação da glutatona transferase na destoxificação celular de xenobióticos	23
Figura 10: Activação/desactivação metabólica do acetoaminofeno	24
Figura 11: Bioactivação do diclorometano através da GSH	25
Figura 12: 4 mecanismos possíveis de transporte de GSH	27
Figura 13: Vias do estado homeostático da glutatona nas células (Síntese, reacções redox e conjugação)	32
Figura 14: Sequência de eventos apoptóticos	47



Abreviaturas

ABCC – Família de proteínas transportadoras de glutatona; em inglês, *ATP- binding cassette carriers*

ADP – Adenosina difosfato

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

AP – Proteína activadora

Apaf-1 – Em inglês, *apoptosis protease activating-factor 1*

ARE – Em inglês, *antioxidant responsive element*

ATP – Adenosina trifosfato

BSO – Butionina sulfoximina

Ca²⁺ – Ião cálcio

CFTR – Proteína reguladora de condutância de fibrose cística

CH₂Cl₂ – Diclorometano

Cl⁻ – Ião cloreto

Cys-SR – conjugado com a cisteína

Cu⁺ – Ião cobre

DMI – Degeneração macular relaciona com a idade

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crónica

Epre – Elemento de resposta antioxidante; em inglês, *Electrophile response element*

GCS – γ -Glutamilcisteína sintetase

GGT – γ -Glutamiltransferase ou γ -Glutamiltranspeptidase

GPx – Glutationa peroxidase



GR – Glutathione redutase

GS – Glutathione sintetase

GS⁻ – Anião tiolato

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

GST – Glutathione-S-transferase

HIV – Em inglês, *Human immunodeficiency virus*

IAP – Proteínas inibidoras da apoptose

K⁺ – Ião potássio

Mg²⁺ – Ião magnésio

mM – Milimolar

mRNA – RNA (Ácido ribonucleico) mensageiro

MRP – Família de proteínas associadas à resistência a múltiplos fármacos

NAPQI – N-acetil-*p*-benzoquinona imina

NMDA – N-metil-D-aspartato

Nrf2 – Factor de transcrição, em inglês: *NF-E2-related factor 2*

OPA – o-ftaldialdeído

PGHS – Prostaglandina H sintetase

pKa – Constante de acidez

R[•] – Radical livre

XH – Xenobiótico

RLO – Radicais livres de oxigénio

ROS – Espécies reactivas de oxigénio



UFP-FCS

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

Zn²⁺ – Ião zinco

γ-Glu – Resíduo γ-glutamilo

hGSTT1-1 – Em inglês, *Human glutathione S-transferase theta 1-1*

rGSTT5-5 – Em inglês, *Rat glutathione S-transferase theta 2-2*

μM – Micromolar

Capítulo I: Apresentação da Dissertação

1.1) Enquadramento do trabalho e objectivos

O progresso económico e o desenvolvimento de novas técnicas científicas no decorrer das últimas três décadas, e até mesmo a consciência do Homem para uma atenção privilegiada para a saúde, têm demonstrado uma melhoria global na Saúde e na esperança média de vida. Novas doenças surgem e a preocupação para as suas causas bem como o seu comportamento no organismo humano é sempre uma questão prevalente. Tem-se verificado que a incidência de doenças mediadas por espécies reactivas de oxigénio é frequente e notória para que se desenvolvam estudos importantes nesta área.

Como tal, o conhecimento aprofundado dos fenómenos oxidativos e contribuições de substâncias antioxidantes é uma mais-valia, tanto pelo número de anomalias relacionadas, como, no caso da glutaciona, ser uma substância intrínseca e inerente às células.

No Homem, o decréscimo de glutaciona no organismo está relacionado com doenças incluindo cancro, doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares. Os níveis de glutaciona são um indicador muito sensível da funcionalidade e viabilidade celular.

Estudos recentes acerca desta importante molécula têm vindo a ser desenvolvidos, surgindo desta forma dados novos, relevantes e promissores sobre a mesma que vêm despertar um interesse acrescido para o conhecimento mais aprofundado sobre o papel da glutaciona nos processos celulares. O carácter benéfico desta molécula já é de conhecimento geral, no entanto a sua potencial relação com fenómenos apoptóticos, envolvimento em fenómenos oncológicos e prevenção da degeneração celular são assuntos ainda em estudo.

Esta dissertação tem por objectivo fazer uma revisão de carácter geral sobre esta notória e essencial molécula, reconhecendo as características benéficas para o organismo, assim como apresentar informação mais actual sobre o seu envolvimento tanto na apoptose como na destoxificação celular.

Capítulo II: Revisão estrutural, bioquímica e funcional da **Glutationa**

2.1) Glutationa: Introdução à molécula

A importância biológica da glutationa (GSH) tem sido apreciada desde que foi descrita pela primeira vez, em 1888 por Rey-Pailhade, como “philothion”, designando simplesmente algo que continha enxofre (Penninckx, 1999).

Este tripeptídeo linear de aminoácidos foi posteriormente cristalizado por diversos investigadores, onde se verificou a presença relevante de enxofre, sendo assim designada de glutationa (L-gama-glutamil-L-cisteinilglicina) (Tew, 2007).

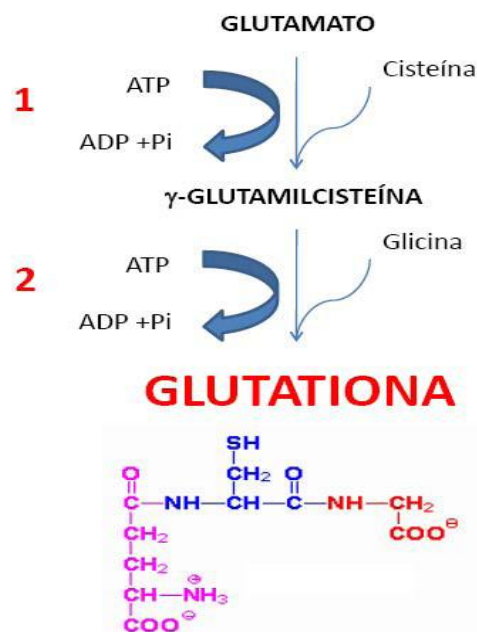


Figura 1: Síntese de GSH; Adaptado de: Misra, I., Griffith, O.W. (1998) Expression and Purification of Human γ -Glutamylcysteine Synthetase., *Protein Expression and Purification*, 13(2), pp. 268-275

Legenda:

A glutaciona é sintetizada em duas etapas consecutivas (Figura 1) (Mary, 1983). A γ -glutamylcisteína sintetase (GCS), também designada de glutamato cisteína ligase, usa o glutamato e a cisteína como substratos formando o dipeptídeo γ -GluCys (1), o qual se combina com a glicina numa reacção catalisada pela glutaciona sintetase (GS) para a geração de GSH (2). A adenosina trifosfato (ATP) é co-substrato para ambas as enzimas. O nível intracelular de GSH é regulado por *feedback*, sendo a actividade da GCS inibida pelo seu produto final (Meister, 1974; Misra, 1998). Assim, a síntese e o consumo de GSH vigoram de uma forma equilibrada.

Esta molécula é sintetizada no interior das células. A sua síntese irá variar de acordo com a biodisponibilidade dos aminoácidos, mais concretamente da cisteína, uma vez que este aminoácido é dos três o mais escasso nos alimentos. Para além desta limitação na sua biodisponibilidade, este aminoácido apresenta na sua estrutura um componente que o caracteriza bioquimicamente, o enxofre, designado de grupo tiol. Este grupo vai conferir à glutaciona a capacidade de desempenhar as funções que lhe são características e de importância vital no organismo (Höehr, 2001).

Nas células, a glutaciona pode encontrar-se sob a forma de glutaciona reduzida (também denominada de monomérica), na forma oxidada (também designada de dimérica (GSSG)), e ainda sob a forma de glutaciona conjugada (GS-R) (Glutationa Project [Em linha]).

Nos tecidos saudáveis cerca de 90% da glutaciona existente encontra-se na forma reduzida (Henry Okigami, 2009 [Em linha]).

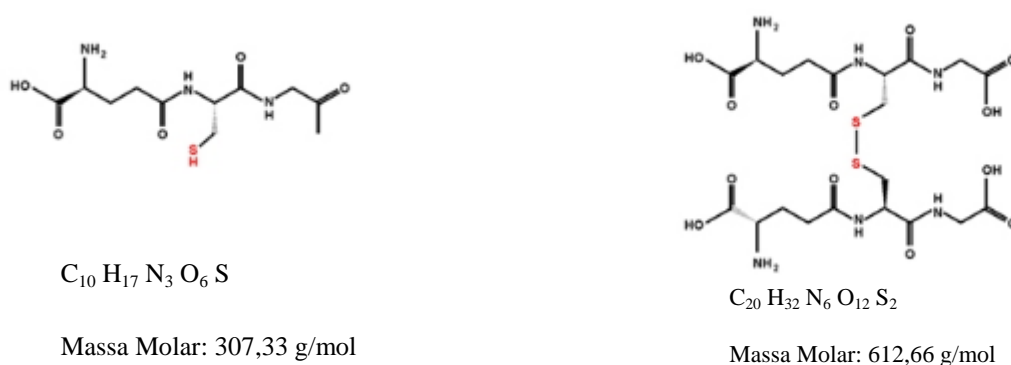


Figura 2: Fórmula estrutural da GSH e GSSG respectivamente. Adaptado de Kronos Science Laboratory – Glutathione [Em Linha] Disponível em <<http://www.kronoslaboratory.com/dotnetnuke/FeaturedAssays/GlutathionePanel/tabid/137/Default.aspx>> [Consultado em Setembro 2010]

A glutaciona na sua forma reduzida protege as células através da remoção de metabolitos reactivos pela sua conjugação com as formas reactivas. A conjugação com a GSH pode ser uma reacção catalisada enzimaticamente ou simplesmente uma reacção química. Existem muitos tipos de substratos para a conjugação da glutaciona incluindo aromáticos, alifáticos, epóxidos, compostos heterocíclicos e alicíclicos, alifáticos halogenados e aromáticos nitrados, compostos alifáticos insaturados e haletos de alquila (Meister, 1974).

A glutaciona na forma reduzida é o tiol não proteico mais prevalente nas células animais. A síntese de GSH associada com a redução de GSSG, promove a manutenção do estado redox intracelular, funcionando este tripeptídeo como co-factor para enzimas citoplasmáticas e indutor de certas modificações translacionais em diversas proteínas (Tapiero, 2003).

A GSH tem um papel importante no armazenamento e transporte de cisteína, na defesa celular contra radicais livres, peróxidos e xenobióticos, actuando em conjunto com as enzimas glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona-S-transferase (GST). Além destas funções, a GSH também participa na modulação da transdução de sinal, regulação da proliferação celular, regulação da resposta imune (Sies, 1999), metabolismo de leucotrienos e prostaglandinas, entre outras (Forman, 2009).

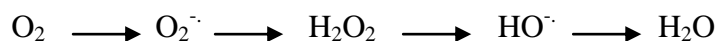
É uma molécula a que se pode chamar de “natural”, estando presente em células animais, vegetais, em cianobactérias e proteobactérias (Anderson, 1998; Arisi, 1998; Ayer, 2010). Está distribuída livremente em cerca de 85-90% no citoplasma, mas pode estar compartimentada em estruturas celulares, após síntese citosólica, como por exemplo mitocôndrias, peroxissomas, núcleo e retículo endoplasmático (Bounous, 1989).

Na generalidade dos seres vivos, a GSH apresenta-se em concentrações entre 0,1-10 mM (Bounous, 1989). Os glóbulos vermelhos, apesar de não conterem a enzima responsável pela síntese de GSH, apresentam concentrações significativas de GSH no seu meio intracelular. No plasma humano, os níveis de glutathione variam entre 10 a 30 μM , com uma taxa de fluxo para o rim 1 L/min \sim 60 μM , sendo verificada a entrada da GSH pelo túbulo proximal (Abraham, 1996). Com uma concentração na urina de 1-3 μM e uma taxa de excreção inferior a 1 nmol/h, implica que 99% da GSH seja reabsorvida (Tew, 2007).

2.2) Espécies reactivas de oxigénio

Define-se como radical livre toda e qualquer espécie que apresenta um ou mais electrões desemparelhados. Como o nome sugere, existe um electrão que se apresenta livre e é característico em átomos como hidrogénio, enxofre, nitrogénio, oxigénio, carbono ou nos metais de transição. No entanto, basicamente existem apenas duas espécies, oxigénio e monóxido de azoto, capazes de no estado fundamental gerar espécies reactivas de oxigénio (Bonney, 2002).

Outra maneira de formação deste tipo de compostos consiste na redução unieletrónica de oxigénio a água, que com a entrada de 4 electrões na molécula de oxigénio faz com que surja o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e do radical hidroxilo (HO^{\cdot}), exemplificado através de reacções (Höhr, 2001):



O peróxido de hidrogénio atravessa as membranas celulares e capta um electrão, podendo originar o radical hidroxilo. Este radical é das espécies mais reactivas (Timbrell, 2000).

Estas moléculas produzem-se por exemplo no processo respiratório e apresentam uma existência independente. De todo o oxigénio que diariamente é consumido, 2 a 5% é convertido em radicais livres, o que não significa que seja inteiramente prejudicial, antes pelo contrário, em doses pequenas e moderadas combatem bactérias e vírus (Carney, 2004). Contudo, devem ser neutralizados quando existam em doses elevadas pois de adjuvantes passam a agentes tóxicos.

2.3) Funções

A GSH é uma molécula que intervêm em diversos processos, como antioxidante e destoxicante, no transporte de aminoácidos, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, manutenção da forma activa de certas enzimas, protecção do organismo contra a exposição a radiações solares e, estudos recentes apontam para uma participação importante da GSH na regulação da morte celular programada (Dringen, 1999; Forman, 2009; Park, 2010).

A glutaciona participa em inúmeros processos metabólicos no organismo. O conteúdo em glutaciona no organismo é um forte indicador do respectivo estado fisiológico (Tapiero, 2003), onde a sua depleção pode ocasionar danos celulares irreversíveis (Forman, 2009).

O nível intracelular de glutaciona pode ser preditivo para a longevidade dessa célula (Park, 2010). Face ao papel da GSH na protecção contra o stresse oxidativo e destoxificação de xenobióticos, a disponibilidade desta na forma reduzida é um factor chave para a manutenção da saúde. Quanto menor o conteúdo em glutaciona numa célula, menor a probabilidade de sobrevivência dessa célula (Forman, 2009).

Voltando ao conceito primordial, a glutathione é o principal antioxidante produzido pela célula, sendo esta a sua função principal – poder antioxidante – protegendo-a de radicais livres. Estes radicais livres são compostos extremamente reactivos podendo danificar ou destruir componentes celulares importantes (membranas, DNA, entre outros) em microsegundos (Lomaestro, 1995). A glutathione age como agente neutralizador, desactivando-os, mantendo em simultâneo a funcionalidade de antioxidantes exógenos como por exemplo as vitaminas C e E. Esta propriedade só é possível de ser concretizada num enquadramento enzimático, onde regem ciclos funcionais enzimáticos que as células desenvolveram contra espécies reactivas de oxigénio (ROS), na qual é crucial a presença de enzimas como GPx e glutathione reductase (GR) (Penninckx, 1999).

Para que melhor se possa proteger, a própria célula tem estratégias de combate à agressão por parte dos ROS, nomeadamente organelos, como mitocôndria e núcleo, que têm a sua própria reserva de GSH, protegendo individualmente estas estruturas contra a acção destas espécies. Esta protecção é fulcral pois a alteração do estado redox intracelular pode implicar processos pré-mutagénicos no DNA (Lu, 2009).

A previsão quantitativa da molécula permite correlacionar a diminuição da actividade de enzimas antioxidantes, como a GPx, e o aumento dos níveis de bases de DNA lesadas devido ao dano oxidativo, confirmando a hipótese de que as reacções que levam à formação de radicais livres podem induzir aparecimento de células malignas (Carney, 2004).

O par redox GSH/GSSG poderá ser um importante indicador do estado redox celular (Ballatori, 2009) e, alterações neste par redox demonstram estar relacionadas com a proliferação celular, diferenciação e/ou apoptose (Park, 2010). Como tal, a glutathione desempenha assim um papel crucial na manutenção de um equilíbrio normal entre espécies oxidantes e antioxidantes, regulando muitas das funções vitais da célula, tais como síntese e reparação de DNA, síntese de proteínas e activação e regulação de enzimas (Tapiero, 2003). A título de exemplo, Newsholme e Leech em 1995, verificaram que na córnea a GSH pode ter um papel relevante para a manutenção de

grupos sulfidrilo reduzidos em proteínas, na remoção do H_2O_2 , reparação de lípidos peroxidados por radicais superóxido e hidroxilo (Bonney, 2002).

A existência de patologias associadas a radicais livres demonstra que este tipo de espécies não apresenta nenhuma componente etiológica na globalidade das doenças mas sim uma responsabilidade directa na alteração fisiopatológica dos mecanismos que determinam a proliferação da anomalia.

Outra funcionalidade de extrema relevância da glutatona é o facto de participar como agente fulcral na destoxificação do organismo face a tóxicos orgânicos e inorgânicos (Anderson, 1998). Actua na desintoxicação de uma multiplicidade de xenobióticos que vão-se associar ao tripeptídeo e são excretados na urina e nas fezes. Forma-se um composto solúvel juntamente com o tóxico, de forma que este seja passível de ser excretado face a solubilidade do intestino. Desta forma, é plausível que os rins e o fígado sejam órgãos que apresentam altos níveis em glutatona uma vez que têm uma elevada incidência de exposição a xenobióticos. Os pulmões também revelam índices elevados de glutatona com o intuito de combater as espécies reactivas que através da respiração se formam. Assim, muitos produtos resultantes da presença de um tumor, metais pesados, metabolitos e xenobióticos, são eliminados por esta via (Almeida, 2001).

A glutatona tem também um papel determinante na resposta imune. A título de exemplo, ela é necessária para a ocorrência da proliferação linfocitária conducente a uma resposta imunológica capaz de eliminar células indesejáveis, tais como células cancerígenas ou células infectadas por vírus (Carolis, 2009). A glutatona na relação que estabelece entre a sua forma oxidada e reduzida, vai ditar a entrada de linfócitos na fase de síntese do ciclo celular. Existem mecanismos propostos para melhorar a resposta imune que assentam na optimização das funções dos macrófagos, compensando danos oxidativos associados com a expansão monoclonal de linfócitos, e estabilização da membrana mitocondrial, para assim diminuir o processo de apoptose em linfócitos (Lu, 2009).

A glutaciona está também relacionada com o metabolismo do ácido ascórbico, manutenção da comunicação das células, prevenção da oxidação de grupos tiol presentes nas proteínas e no transporte do cobre intracelular (Sies, 1999). A glutaciona é importante para a síntese de DNA, síntese proteínas, síntese de prostaglandinas, para o transporte de aminoácidos, e activações enzimáticas (Park, 2010). Diversos estudos descrevem o decréscimo dos níveis de glutaciona com o aumento da idade de uma pessoa, estando assim implicado com o aparecimento de certas doenças associadas ao envelhecimento (Forman, 2009).

2.4) Síntese

A glutaciona nas células está presente maioritariamente na sua forma reduzida, que é a sua forma biologicamente activa. Em condições de stresse oxidativo, a GSH converte-se em GSSG, o que leva a uma diminuição da razão GSH/GSSG.

A síntese de GSH ocorre no citosol em duas reacções enzimáticas principais. Em células de mamíferos, existem três mecanismos que sustentam a manutenção da homeostasia da GSH, nomeadamente, síntese *de novo*, a captação de fontes exógenas através da membrana plasmática e redução de GSSG catalisada pela GR (Chen, 2007).

A primeira reacção que sustenta a biossíntese da GSH é a formação de uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutamato e a cisteína. Entre estes dois primeiros resíduos de aminoácidos estabelece-se uma ligação do tipo gama. Esta ligação estabelece-se entre o grupo carboxílico do glutamato e o grupo amina da cisteína. A ocorrência desta ligação é fundamental para que não se verifique a degradação da glutaciona através de peptidases intracelulares (Chang, 1987). A enzima interveniente é a γ -glutamilcisteína sintetase, gerando-se a γ -L-glutamil-L-cisteína. Por sua vez este dipeptídeo liga-se à glicina pela acção da glutaciona sintetase (Anderson, 1998).

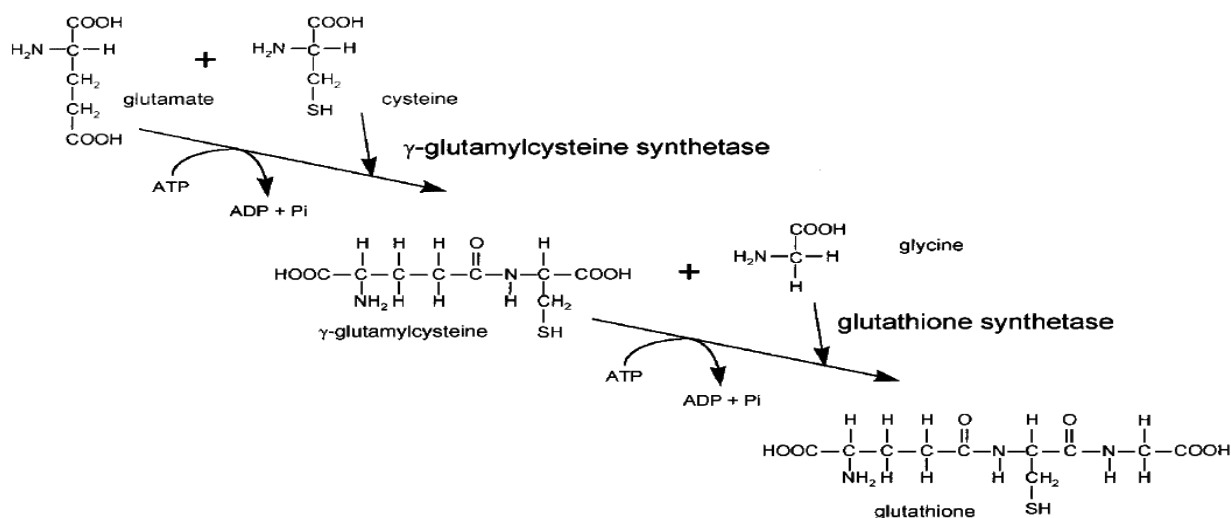


Figura 3 - Representação esquemática das reacções intervenientes na biossíntese da glutathione a partir dos seus aminoácidos constituintes. Adaptado de Arisi *et alii* (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany*, 49 (321), pp.623-647

A síntese *de novo* ocorre exclusivamente no compartimento citosólico, em duas etapas sequenciais dependentes de ATP. A GCS catalisa a formação de γ -glutamilcisteína que surge como o primeiro factor limitante durante o processo de síntese de GSH, sendo um processo fulcral para a regulação das concentrações celulares de GSH (Chen, 2007). Esta limitação surge no seguimento da cisteína ser um factor limitante para a síntese *de novo* de GSH. Este aminoácido pode ser obtido através da degradação de GSH extracelular através da acção da γ -glutamyltransferase (GGT), e/ou através da via de conversão cistationina, ou a partir de metionina (Lu, 2009). Esta via de conversão é característica de células hepáticas, ao contrário da clivagem da GSH que ocorre na superfície externa de membranas plasmáticas de certas células epiteliais, como, por exemplo, rins, pâncreas, vias biliares e intestino delgado (Chen, 2007).

A enzima GCS sofre então uma regulação pela GSH através de um *feedback* negativo. Este facto faz com que se evite a acumulação excessiva do produto de reacção ou do intermediário γ -glutamilcisteína. Em contrapartida, a enzima responsável pela segunda reacção não está sujeita à inibição por *feedback* de GSH.

Face ao facto da γ -glutamilcisteína se encontrar em concentrações extremamente baixas na presença da enzima GS, conclui-se que GCS é um factor limitante para a síntese de GSH. Outro dado que sustenta esta conclusão, é a observação de que quando se aumenta a concentração em GS, os índices de GSH não se elevam. Em contrapartida, acontece o inverso quando se aumenta a concentração de GCS, os níveis de GSH aumentam (Lu, 2009). Contudo, uma deficiência em GS nos humanos pode levar, de uma forma geral, a níveis baixos de GSH resultando em danos metabólicos de consequências comprometedoras, uma vez que ao ocorrer uma acumulação em γ -glutamilcisteína, esta pode ser convertida a 5-oxoprolina (Forman, 2009). Este último pode causar acidose metabólica grave, anemia hemolítica e danos no sistema nervoso central (Nishimura, 1999).

A GS apesar de não ter um papel determinante na biossíntese de GSH, a sua acumulação está associada a situações de stresse. A título de exemplo, no trauma cirúrgico, os níveis de GSH e a actividade da enzima GS no músculo-esquelético declinam enquanto os valores de GCS se mantêm. Como tal, é pertinente considerar a GS na regulação da síntese de GSH, como também em situações de stresse oxidativo e (Lu, 2009).

Desta forma a glutathione é sintetizada por duas etapas principais na qual os seus aminoácidos constituintes interagem e se ligam para formar uma nova molécula. Este processo pode ser inibido pela butionina sulfoximina (BSO) que a nível estrutural apresenta-se idêntico a um intermediário na reacção catalisada pela GCS, provocando assim um decréscimo na concentração em GSH (Almeida, 2008).

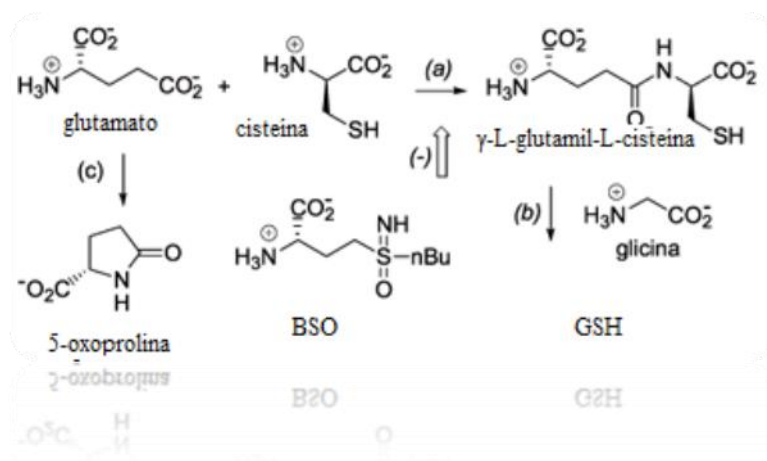


Figura 4: Reações de biossíntese de GSH. a) γ -glutamilcisteína sintetase; b) glutaciona sintetase; c) γ -glutamilciclotransferase; e BSO, inibidor da síntese de GSH. Adaptado de Almeida, P., Fátima, A., Huber, P.C. (2008) Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31, pp.1170-1179

2.5) Ciclo do γ -glutamilo

A síntese e a degradação de GSH têm lugar num conjunto de reacções, designado de ciclo do γ -glutamilo, que inclui a presença de 6 enzimas. Durante o ciclo verifica-se duas etapas importantes: exportação de glutaciona celular e incorporação do resíduo γ -glutamilo em aminoácidos mediado por transpeptidases. Este ciclo vem suportar a ideia de que uma das finalidades da GSH é proporcionar a formação de γ -glutamil aminoácidos, constituindo uma forma de transporte de aminoácidos (Larsson e Ristoff, 1998).

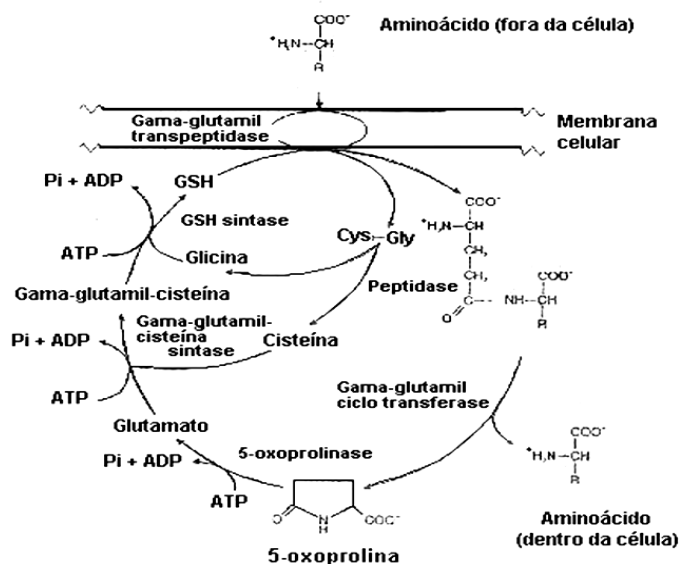


Figura 5 – Esquemática do ciclo do γ -glutamilo Adaptado de Portal bioquímica04-Metabolismo de aminoácidos [Em linha] Disponível em <http://www.ufpe.br/dbioq/portalbq04/metabolismo_de_aminoacidos.htm> [Consultado em Setembro 2010]

2.6) Compartimentação e exportação

Após a síntese, parte da GSH sintetizada é encaminhada para compartimentos intracelulares específicos, incluindo mitocôndrias e retículo endoplasmático, mas muita da GSH é enviada para espaços extracelulares, inclusive o plasma sanguíneo, secreções exócrinas, fluido de revestimento do pulmão e fluido cefalorraquidiano. Em células polarizadas, o transporte de GSH e dos seus conjugados é realizado em toda membrana apical, e é mediado essencialmente por transportadores específicos: MRP1, MRP2 e Oatp1 que podem contribuir para o efluxo através da membrana plasmática basolateral para o plasma sanguíneo. Apesar da exportação e compartimentação intercelular ser mediada por proteínas específicas, tais fenômenos ainda não estão totalmente esclarecidos (Forman, 2009).

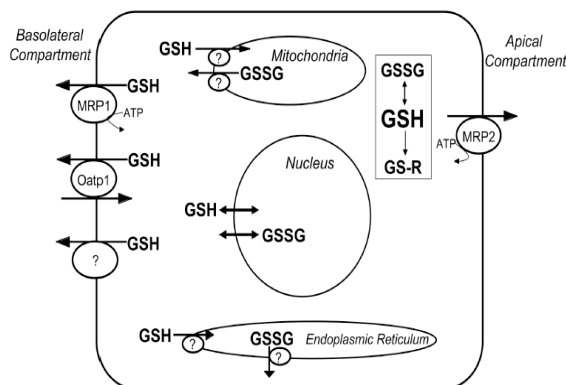


Figura 6: Esquemática do processo de compartimentação e exportação. Adaptado de Ballatori *et alii* (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 390, pp. 191-214

2.7) Catabolismo: degradação da GSH

A degradação da GSH ocorre exclusivamente no meio extracelular por reconhecimento da ectoenzima γ -glutamyltranspeptidase (GGT), que se encontra à superfície das células. Esta enzima está presente na membrana apical de muitas células epiteliais (Bertini, 2003). Após a exportação do conteúdo das células, existem intra e inter ciclos de degradação e de utilização da GSH e dos conjugados da GSH, que consistem em:

- 1) Catabolismo extenso dentro dos espaços apicais (por exemplo, bile e líquido tubular renal), bem como no interior de compartimentos sinusoidais de algumas espécies (Ballatori, 2009);
- 2) Recaptação celular de alguns produtos de degradação (Bertini, 2003);
- 3) Utilização intracelular destes produtos de degradação, ou conversão de S-conjugados de cisteína (Cys-SR) em ácido mercaptúrico (Bonney, 2002). Como se pode visualizar na Figura 7, o catabolismo de conjugados de glutathione leva à formação de conjugados com a cisteína (Cys-SR). Estes conjugados, Cys-SR, são transportados de novo para as células, onde podem funcionar como substrato para as N-acetiltransferases, com o intuito de gerar conjugados com a N-acetilcisteína (N-Acetil-Cys-SR), ou ácidos mercaptúricos. Estes ácidos são depois exportados a partir de células com o objectivo de serem eliminados através da urina ou fezes (Anderson, 1998).

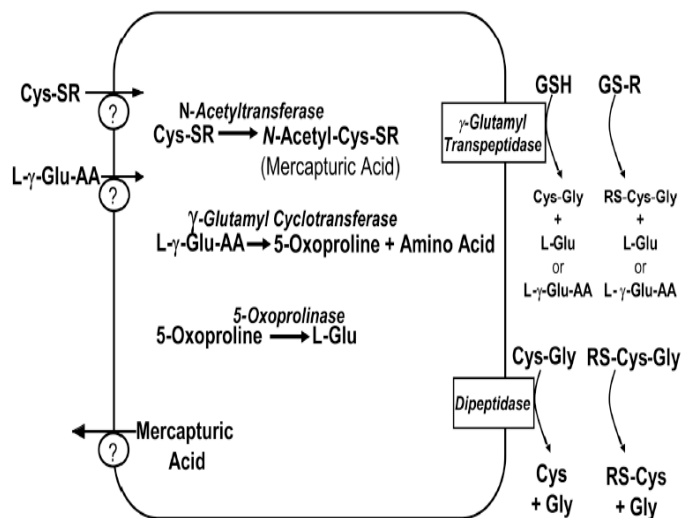


Figura 7: Esquematização metabólica do processo de catabolismo. Adaptado de Ballatori *et alii.* (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 390, pp. 191-214.

Capítulo III: Destoxificação: papel da GSH

3.1) Destoxificação

Em condições fisiológicas, o rim é o principal órgão excretor do organismo. Excretam preferencialmente substâncias polares e hidrófilas, onde a afinidade e compatibilidade facilitam a eliminação (Flanagan, 2007).

Xenobióticos lipofílicos que se encontram fortemente ligados a proteínas dificultam a absorção e, conseqüentemente, a excreção glomerular fica comprometida. Mesmo que sofram filtração, vão ser prontamente reabsorvidos ao nível do túbulo renal. Desta forma, este tipo de substâncias devem ser devidamente metabolizadas em compostos polares para que possam ser excretadas (Bertini, 2003). Em determinadas moléculas a metabolização faz com que a substância perca a sua actividade. Noutras moléculas, como por exemplo fármacos, apresentam acção farmacológica após a metabolização e, por último, existem compostos em que se verifica que a metabolização potencia o seu efeito podendo mesmo tornar-se tóxicos, como o caso do metabolito do paracetamol, N-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI) (Alberts, 1994).

O fígado é o principal órgão de metabolização de xenobióticos, no entanto a maioria dos tecidos tem a capacidade de metabolizar drogas por hidrólise através de esterases plasmáticas, o que em determinadas situações é uma solução eficiente, bem como o metabolismo efectuado ao nível da flora intestinal que muitas vezes é crucial para a biodisponibilidade oral de muitos fármacos (Kaplowitz, 1981).

O metabolismo de xenobióticos manifesta-se em duas categorias reactivas: reacções de fase I e fase II (Timbrell, 2000). Nas reacções de fase I, o componente a ser excretado sofre uma acção que visa a alteração química da molécula. Essa alteração pode ser provocada por oxidação, redução ou hidrólise (Flanagan, 2007). Nas reacções de fase II, a molécula vai ser “preparada” de forma a poder sair do organismo. Como tal, copula-se à molécula um “meio de transporte” para que seja possível ao componente ser expelido do organismo. Neste caso intitula-se de reacções de conjugação em que há uma segunda molécula (por exemplo, o ácido D-glucorónico), de carácter hidrófilo, que é adicionado à molécula a excretar, tornando-a passível de se difundir para ser eliminada. A fase II só se torna funcional caso haja um grupo reactivo adequado para a

conjugação. Esse grupo reactivo necessário à fase II é adquirido com a fase I. As alterações estabelecidas à molécula na fase I, configuram-na para que seja possível acontecer a fase seguinte. Assim, seguindo a mesma lógica pela qual se designa “conjugação” à fase II, pode-se designar de “funcionalização” ao processo de fase I (Flanagan, 2007).

3.1.1) Conjugação com a GSH

A glutathione é uma molécula que estabelece reacções de conjugação com vários tipos de compostos. Este tipo de reacções são fundamentais durante o processo de destoxificação do organismo. Ela intervém de uma forma activa e fundamental para a protecção do organismo contra xenobióticos. No entanto, em alguns casos, discutidos mais à frente, um conceito dúbio permanece, destoxificação ou bioactivação? Algumas substâncias revelam, interessantemente, um potencial mais elevado ou mesmo toxicidade até então inexistente, após da conjugação com a GSH (Alberts, 1994).

A conjugação com aminoácidos e dipéptidos estabelece-se de uma forma completamente diferente no que se refere à conjugação com xenobióticos. Os substratos para a conjugação com a glutathione englobam uma enorme série de xenobióticos electrofílicos ou xenobióticos que podem ser biotransformados em electrófilos. Em oposição ao que sucede com as amidas formadas pela conjugação de xenobióticos com outros aminoácidos, os conjugados de glutathione são tioéteres, que se formam pelo ataque nucleofílico do anião tiolato da glutathione (GS^-) a um átomo de carbono electrofílico no xenobiótico. A glutathione pode também conjugar os xenobióticos contendo heteroátomos electrofílicos (O, N, S) (Dickinson, 2002).

A conjugação dos xenobióticos com a glutathione é catalisada por uma família de GST. Estas enzimas estão presentes na maioria dos tecidos, embora em concentrações mais elevadas no fígado, intestino, rim, testículos, glândula supra-renal e pulmão, onde se localizam no citoplasma numa percentagem de 95%, e no retículo endoplasmático cerca de 5%.

Os substratos da GST apresentam 3 características em comum: são hidrofóbicos, contêm um átomo electrofílico e reagem não enzimaticamente com a glutatona a uma taxa mensurável. O mecanismo pelo qual a GST aumenta a taxa de conjugação com a GSH envolve a desprotonação de GSH para GS^- através de um tirosinato ($Tyr-O^-$) do centro activo, que funciona como a base geral catalítica (Arisi, 1998). Quando a concentração de GSH é extremamente elevada, a conjugação não enzimática de alguns xenobióticos com GSH pode ser um processo significativo. Contudo, alguns xenobióticos são conjugados com a GSH estereosseletivamente, mostrando que a reacção é largamente catalisada pela GST (Dringen, 1999). Esta enzima, tal como se verifica com a GSH, encontra-se também em quantidades abundantes constituindo mais de 10% da totalidade das proteínas celulares. Este tipo de enzimas não só liga/reage como também armazena e transporta um número de componentes que não são de carácter catalítico, isto é, não são substratos na qual se estabelecem uma reacção enzimática (Arisi, 1998). Por sua vez, os substratos para as reacções de conjugação com a GSH podem ser divididos em dois grupos distintos. O primeiro grupo consiste em substratos que são suficientemente electrofílicos para a biotransformação em metabolitos electrofílicos antes de serem submetidos à conjugação. O segundo grupo de substratos para a conjugação com a GSH inclui intermediários reactivos produzidos durante a fase I ou a fase II da biotransformação, e incluem oxiranos (óxidos areno e epóxidos alceno), iões nitrenium, iões carbónio e radicais livres. As reacções de conjugação também podem ser divididas em dois tipos diferentes: reacções de transferência, em que a GSH desloca um grupo de electrões removíveis, e as reacções de adição, em que a GSH é adicionada a uma ligação dupla activada, ou a um sistema em anel aberto (Höehr, 2001).

O deslocamento de um grupo de electrões removíveis pela glutatona ocorre tipicamente quando o substrato contém grupos sulfato, sulfonato, fosfato ou de nitro, isto é, bons “grupos abandonantes”, ligados a um átomo de carbono alílico ou benzílico. A adição de glutatona a uma ligação dupla de carbono-carbono é facilitada pela presença de um grupo próximo de electrões removíveis. Consequentemente, os substratos para esta reacção contêm tipicamente uma ligação dupla fixa a $-CN$, $-CHO$, $-COOR$, ou $-COR$ (Forman, 2009).

Os conjugados da glutationa formados ao nível do fígado, têm a particularidade de poderem ser excretados totalmente intactos através da bÍlis, ou então, serem convertidos a ácidos mercaptúricos, mas neste caso falamos a um nível de excreção renal e não hepática. Posteriormente estes ácidos formados serão excretados pela urina (Höehr, 2001).

Para que ocorra a conversão de GSH a ácido mercaptúrico é necessário que ocorra a clivagem sequencial do ácido glutâmico e glicina a partir do grupo glutationa, seguido da N-acetilação do conjugado de cisteína resultante. As duas primeiras etapas da síntese do ácido mercaptúrico são catalisadas pelas γ -glutamiltanspeptidase e aminopeptidase M (Almeida, 2008).

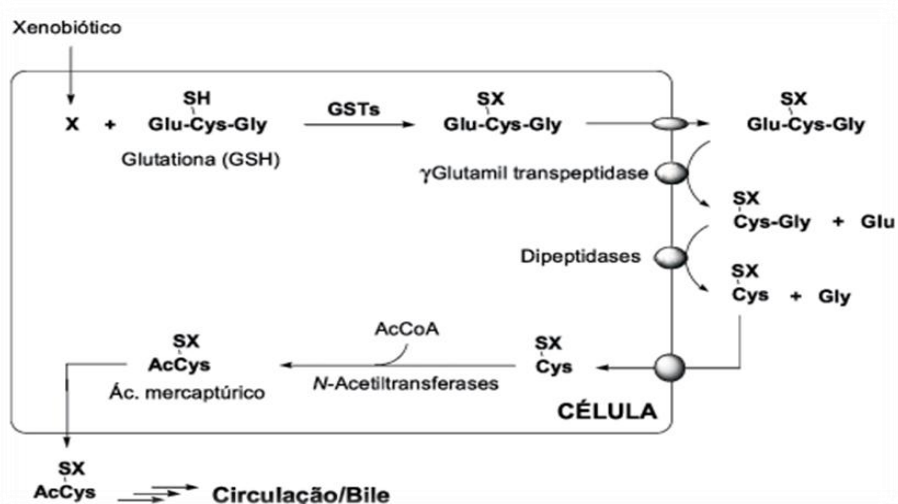


Figura 8- GSH na destoxificação de xenobióticos: via ácidos mercaptúricos. Adaptado de Almeida, P., Fátima, A., Huber, P.C. (2008) Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31, pp.1170-1179

A conjugação com a GSH representa uma reacção de destoxificação bastante importante, uma vez que os electrófilos são espécies potencialmente tóxicas. Estes podem-se ligar a nucleófilos críticos intracelulares, tais como proteínas e ácidos nucleicos, podendo provocar lesões celulares e mutações génicas. Por outro lado, todas as enzimas responsáveis da biotransformação dos xenobióticos têm o potencial de gerar

intermediários reactivos, que vão ser são destoxificados pela conjugação com a glutatona. A glutatona é também um co-factor para a sua respectiva peroxidase. Esta desempenha um papel importante na protecção das células contra a peroxidação lipídica. A resistência a compostos tóxicos é diversas vezes associada a uma expressão exacerbada da GST (Bertini, 2003).

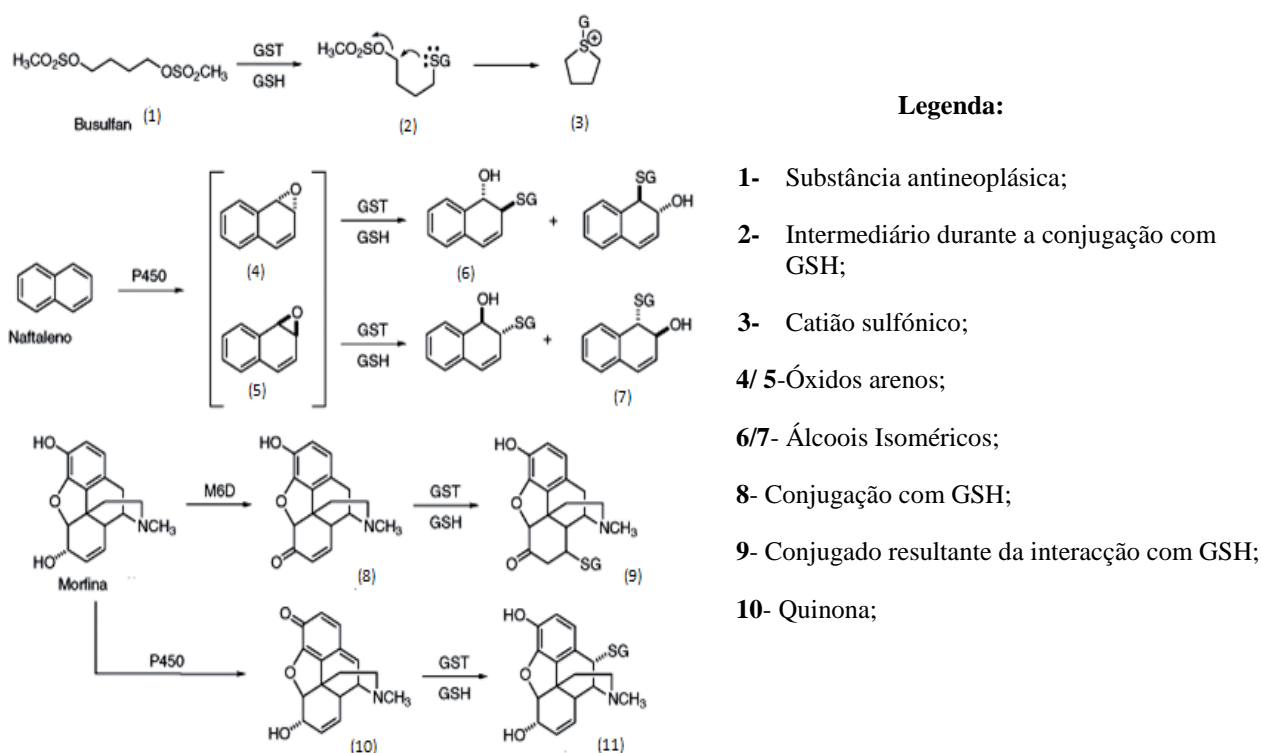


Figura 9- GSH na destoxificação de xenobióticos: Exemplos da actuação da glutatona transferase na destoxificação celular de xenobióticos. Adaptado de Almeida, P., Fátima, A., Huber, P.C. (2008) Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31, pp.1170-1179

O acetoaminofeno (ou paracetamol) é um analgésico usado em grande escala por toda a faixa etária populacional, sendo um fármaco seguro quando usado em doses terapêuticas. Em sobredosagem, o seu uso pode causar danos a nível hepático e renal. Este componente é metabolizado de acordo com a figura 10, gerando um metabolito tóxico designado de N-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI) (A8) (Flanagan, 2007). Isto advém da descoberta de concentrações elevadas da enzima prostaglandina H sintetase (PGHS) a nível renal, que actuando sobre o acetoaminofeno em situações de sobredosagem, gera a principal contribuição para a toxicidade do respectivo componente sobre o órgão em questão. Esta toxicidade atribuída, deve-se ao facto de quando ocorre a redução da prostaglandina PGG₂ à PG₂, catalisada pela PGHS, ocorre em simultâneo a oxidação do acetoaminofeno a NAPQI. A GSH entra nesta fase metabólica do processo no sentido de destoxificar o metabolito formado (NAPQI), através da conjugação deste metabolito reactivo com a GSH, originando um conjugado (B8) desprovido de toxicidade (Almeida, 2008).

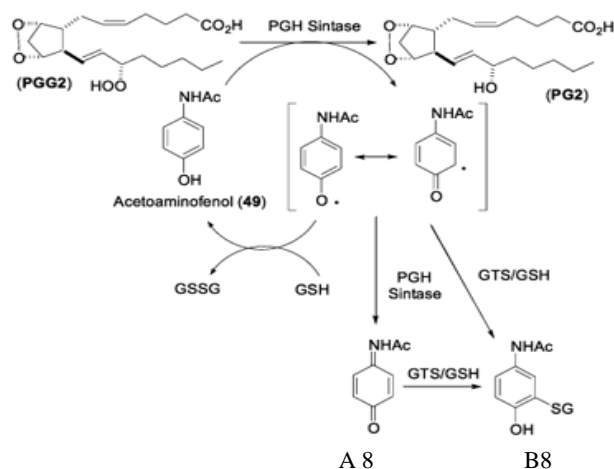


Figura 10 - Bioativação/destoxificação do acetoaminofeno. Adaptado de Almeida, P., Fátima, A., Huber, P.C. (2008) Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31, pp.1170-1179

Em determinados casos, a conjugação com a GSH leva ao aumento da toxicidade do xenobiótico de partida. É o caso de haloalcanos e alil, benzil e feniletil-isocianatos. O diclorometano (CH_2Cl_2), haloalcano, é um potente genotóxico, levando ao aparecimento de cancro de pulmão e hepático em ratos. Esta genotoxicidade é atribuída à bioativação deste composto por meio de GST citosólicas (*hGSTT1-1* e *rGSTT5-5*). Inicialmente ocorre uma substituição nucleofílica, “sai” um átomo de cloro e “entra” GSH, gerando-se o conjugado S-clorometilglutationa reactivo e instável, que ataca locais nucleofílicos intracelulares como as bases nitrogenadas do DNA, provocando a despurinação da molécula de DNA. Desta forma o DNA fica comprometido podendo mesmo levar à morte da célula em causa (Almeida, 2008).

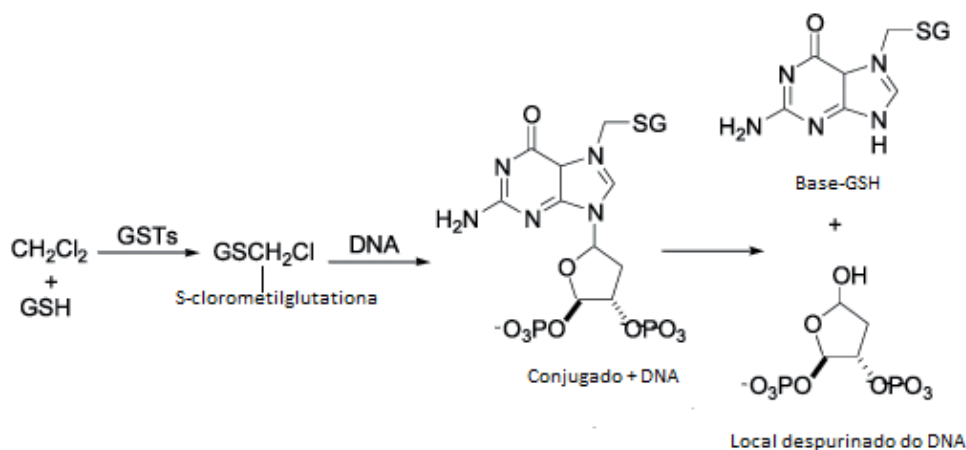


Figura 11- Bioativação do diclorometano através da GSH. Adaptado de Almeida, P., Fátima, A., Huber, P.C. (2008) Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31, pp.1170-1179

Relativamente à activação de conjugados, foram identificados quatro mecanismos de activação dependentes da glutatona:

- 1) Formação de conjugados com a glutatona de haloalcanos, tiocianatos orgânicos, e nitrosoguanidas, onde o metabolito formado apresenta toxicidade.
- 2) Formação de conjugados de GSH de di-haloalcanos proximais, que são inerentemente tóxicos, uma vez que podem formar mostardas sulfuradas electrofílicas.

- 3) Formação de conjugados de GSH de alcenos halogenados, que são degradados e produzem metabólitos tóxicos através da β -liase no rim.
- 4) Formação de conjugados de quinonas, quinoneíminas e isotiocianatos com a glutathione, que são degradados a metabólitos tóxicos pelas GGT e endopeptidase M no rim (Alberts, 1994).

3.2) Excreção e transporte

A excreção e o transporte de GSH são dois processos intimamente ligados, uma vez que a glutathione para ser excretada necessita de ser transportada para o meio extracelular. Esta sai do organismo através de mecanismos de destoxificação de substâncias tóxicas, na qual esta funciona como um meio de excreção para este tipo de substâncias. No entanto, existe um mecanismo geral de degradação da GSH a partir do momento que esta sai do interior das células. A GSH sofre a acção de GGT a nível plasmático, enzimas estas que estão localizadas na superfície exterior das células. Estas enzimas vão catalisar a GSH e/ou glutathione S-conjugados, originando γ -glutamil aminoácidos. A maioria destas transpeptidases encontram-se ao nível do rim, sendo os compostos resultantes excretados na urina (Bertini, 2003).

Para que a GSH e glutathione S-conjugados atinjam o meio extracelular, sangue e bÍlis, é necessário que haja um processo responsável pelo transporte. Apesar da pouca literatura sobre esta abordagem e de dados conclusivos, actualmente sabe-se que existem pelo menos duas classes de exportadores membranares. A primeira classe são MRP, nomeadamente MRP1 e MRP2. Ambos realizam transporte de GSH e glutathione S-conjugados e MRP1 está presente em todas as células tendo um papel omnipresente no transporte. MRP2 não é encontrado em todas as células mas é responsável pelo transporte de GSH e seus conjugados na bÍlis. Ambas as proteínas transportadoras são dependentes de ATP (Ballatori, 2009).

Novos estudos indicam que para o transporte de xenobióticos associados à GSH existam pelo menos 4 mecanismos (Ballatori, 2008).

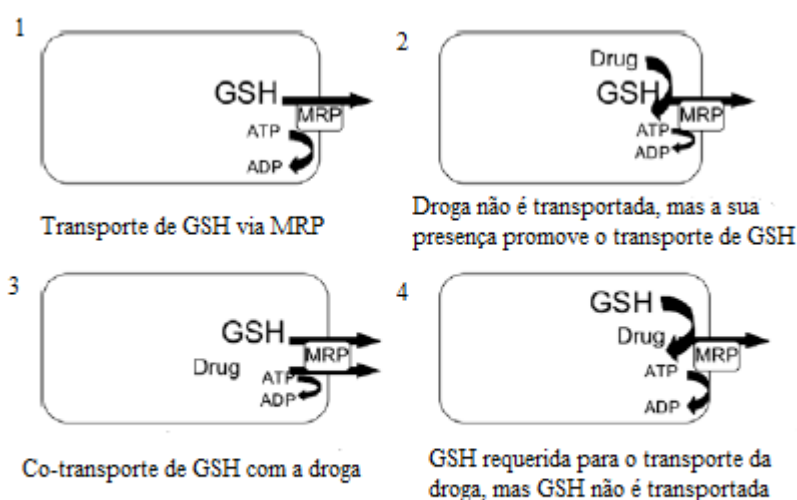


Figura 12: Quatro mecanismos possíveis de interacção da GSH com as proteínas MRP. 1- GSH propriamente dita como substrato para a proteína MRP; 2- O transporte de GSH é promovido pela presença de outros substratos, mas estes não são transportados, apenas a GSH; 3- A GSH é co-transportada juntamente com outro substrato; 4- O transporte de alguns substratos é estimulado e/ou é dependente de GSH, mas GSH em si não é transportada. Adaptado de Ballatori N., Hammond C.L., Krance S.M., Marchan R. (2008) Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Elsevier, Aspects of Medicine*, pp.3-10

A conjugação da GSH é fundamental para a eliminação de muitos tóxicos mas essa função está cada vez mais associada à presença de MRP. Estudos revelam que foi verificado que os transportadores MRP têm mais afinidade para a glutathione quando esta se encontra conjugada (Ballatori, 2005).

3.3) Poder antioxidante

A GSH é a primeira linha de defesa contra ROS que o organismo humano concretiza a favor da sua homeostasia. Consiste na neutralização de radicais livres e redução do peróxido de hidrogénio. A glutathione é solúvel em água e é o principal antioxidante no citoplasma. Como se não bastasse a forma directa de actuação de GSH,

verifica-se uma segunda linha de defesa contra a oxidação, estando a cargo de enzimas glutaciona-dependentes que atingem principalmente subprodutos nocivos gerados por ROS e evitam em simultâneo a propagação de radicais livres. Enzimas como a GST, catalisam a conjugação de GSH com diversificados compostos que são produzidos *in vivo* na presença de stresse oxidativo (Franklin, 2010)

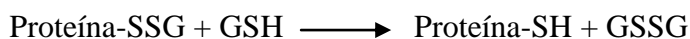
Na célula existem duas formas principais de defesa antioxidante: enzimática e não enzimática. A defesa enzimática compreende várias enzimas do ciclo redox da glutaciona (glutaciona redutase e glicose-6-fosfato-desidrogenase), sendo a mais importante a GPx. Existem ainda outros sistemas enzimáticos intervenientes na defesa antioxidante na qual inserem no seu mecanismo a enzima superóxido dismutase (SOD) e a catalase. A primeira faz com que ocorra a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio. A segunda converte o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio molecular. É através destes sistemas que muitas das reacções radicalares prejudiciais que decorrem *in vivo* são evitadas ou alteradas (Beattie, 2010).

As enzimas glutaciona-dependentes são coordenadamente induzidas à expressão em resposta ao stresse oxidativo, designada cientificamente de *antioxidant responsive element* (ARE). Estas espécies radicalares vêm-se envolvidas em mecanismos reactivos inflamatórios ou podem actuar como segundos mensageiros de variadas funções celulares. Desta forma, a taxa de formação e remoção de espécies reactivas deve ser realizada de forma equilibrada e compensatória para que os processos metabólicos dependentes das mesmas possam decorrer numa proporção adequada para o bom estado fisiológico das células (Franklin, 2010).

3.4) Manutenção do estado tiol

Como referido anteriormente, o quociente GSH/GSSG reflecte o estado redox intracelular. Este ambiente redox está envolvido na regulação de processos celulares importantes, incluindo a diferenciação celular, proliferação e apoptose. A capacidade de sinalização redox vai depender da disponibilidade de grupos tiol activos. Alguns dos mecanismos possíveis na qual a GSH afecta a sinalização celular incluem a eliminação

de radicais livres, manutenção do estado tiol das proteínas e a ligação covalente da cisteína a porções de proteínas citosólicas (S-glutathionilação). A S-glutathionilação apresenta-se como um mecanismo viável de regulação do estado redox. Regula proteínas sinalizadoras, factores de transcrição, canais e bombas iónicas, proteínas mitocondriais, proteínas do citoesqueleto, onde desempenha um papel na diferenciação celular. Neste contexto, é importante a manutenção de um equilíbrio intracelular do estado redox. A GSH é o tiol não proteico dominante no organismo e, como tal, surge como factor essencial na manutenção do potencial redox celular através das suas acções como antioxidante e modulador do equilíbrio sulfidrilo-dissulfureto proteico, tal como representado na seguinte reacção (Lu, 2009):



Como esta reacção é reversível, o equilíbrio é determinado pelo estado redox celular, o que vai sempre depender das concentrações existentes de GSH e GSSG (Ballatori, 2008).

Estabelecendo-se um equilíbrio redox na célula, esta apresenta melhores prestações na sua proliferação e proporciona maior resistência a danos oxidativos.

Capítulo IV: Relação da Glutationa em Doenças Humanas

4.1) Introdução ao tema

A glutathione é uma molécula determinante em diversos processos celulares e como tal, qualquer alteração na sua homeostasia pode influenciar a etiologia e/ou progressão de diversas doenças humanas. O par redox GSH/GSSG nas células funciona como bioindicativo da sua respectiva vitalidade (Ballatori, 2009).

Cada vez mais existem estudos que sustentam a evidência de que a formação reversível de moléculas contendo GSH e resíduos cisteínicos de proteínas com pKa baixo são uma importante contribuição para a regulação metabólica, estrutural e dinâmica translacional das proteínas, e ainda, para a regulação da sinalização das vias metabólicas em sistemas celulares intactos. Como tal, é visível o “poder” que a glutathione tem sob o organismo humano a nível metabólico. Sendo uma molécula que desempenha múltiplas funções, é difícil atribuir uma causa directa para determinada doença por alteração dos níveis de GSH ou do estado redox. Apenas se pode inferir que existe uma participação da GSH para a manifestação e progressão da patologia (Bonney, 2002).

4.2.) Glutathione e o seu estado de homeostasia

Os níveis de GSH, em condições normais, podem ser regulados através do controlo da taxa de síntese na célula, controlo da taxa de exportação a partir de células e da redução da GSSG.

No entanto, os níveis de GSH não podem ser apenas resumidos a estes três mecanismos, porque também são influenciados por condições que podem alterar o seu estado redox, formando-se conjugados S-glutathione, ou complexos que afectam a distribuição de GSH no organismo (Chen, 2004).

O estado nutricional, hormonal e situações de stresse, são condicionantes dos níveis de GSH, verificando-se a existência de variações entre o estado diurno e nocturno bem como situações de exercício físico e gravidez (Beattie, 2010).

A síntese de GSH varia em função do tipo de célula e tecido. Após a sua síntese, como já mencionado, parte é compartimentalizada intracelularmente, para mitocôndrias, retículo endoplasmático e núcleo. Outra parte vai para o espaço extracelular, inclusive o plasma sanguíneo, secreções exócrinas, fluido de revestimento do pulmão, e fluido cerebrospinal. O conteúdo de GSH que segue para o núcleo é efectuado por difusão passiva através dos poros nucleares (Lu, 2009).

Ao contrário do que se verifica durante a síntese, na degradação de GSH, todo o processo decorre no meio extracelular. A exportação de GSH é considerado o passo inicial para a regulação das taxas de equilíbrio homeostático em todas as células de mamíferos (Lu, 2009).

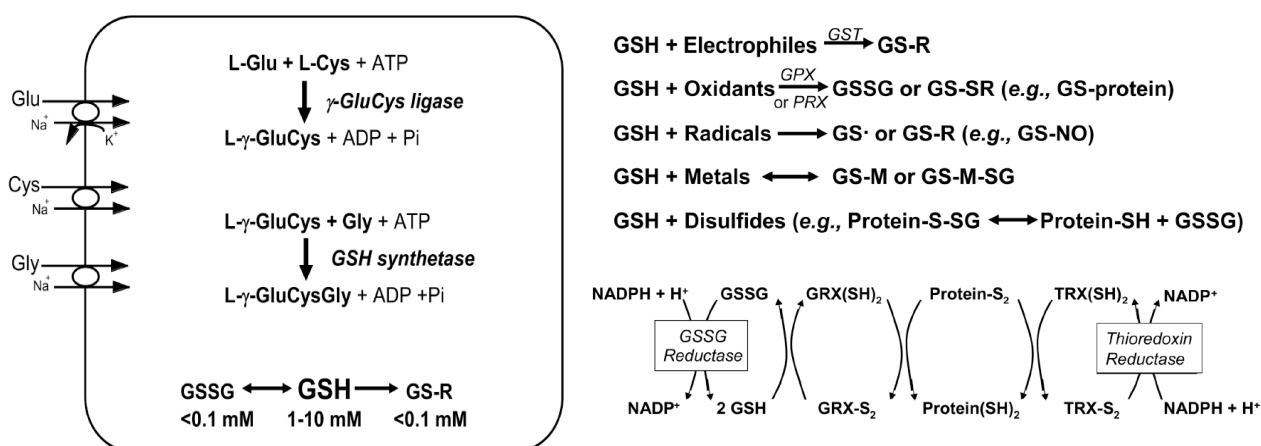


Figura 13: Vias do estado homeostático da glutathione nas células (Síntese, reacções redox e conjugação). Adaptado de Ballatori, N., *et alii.* (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 390, pp. 191-214.

4.3) Relação da Glutathione com doenças humanas

A elevação do estado oxidativo ou dos níveis normais de GSH podem levar ao desencadeamento de diversas patologias. A diminuição nos níveis de GSH implica um

aumento na susceptibilidade ao stresse oxidativo. Em contrapartida, valores superiores ao normal, aumentam a resistência ao ambiente oxidativo, devido a uma capacidade antioxidante acrescida. Este fenómeno já foi observado em células cancerígenas (Anazetti, 2007). Talvez a melhor forma para a compreensão de que a GSH está relacionada com determinadas doenças, é determinar os níveis de GSH durante a ocorrência da patologia. Nestes casos e em determinadas doenças verifica-se a presença de falhas no metabolismo da GSH (Abraham, 1996; Park, 2010).

Estudos anteriores indicam que durante o ciclo do γ -glutamilo, das 6 enzimas integrantes, 5 poderão despoletar doenças, caso se verifique alguma anomalia em: γ -glutamilsteína sintetase, glutaciona sintetase, 5-oxoprolinase, γ -glutamiltranspeptidase e dipeptidase (Carolis, 2009).

No caso de se verificar uma deficiência em γ -glutamilsteína sintetase, pode condicionar a síntese de GSH e representar uma rara doença autossómica recessiva, denominada de anemia hemolítica. Esta pode manifestar-se através de sintomas neurodegenerativos e em alguns pacientes é notória uma degeneração espinocerebelar, neuropatia periférica, miopatia e aminoacidúria (Chen, 2004).

Uma leve deficiência na GS, acompanhada por mutações de estabilidade na enzima, provoca uma anemia hemolítica compensada. Pacientes com deficiência moderada a grave de GS revelam mutações que afectam as propriedades enzimáticas. A anomalia moderada leva a anemia hemolítica e acidose metabólica, enquanto numa situação mais agravada, leva à oxoprolinúria, infecções bacterianas e disfunção progressiva do sistema nervoso central, provocando uma degeneração e recessão mental e motora. Em alguns casos é ainda verificado a pigmentação da retina. Esta é uma doença que não tem cura. É recomendado a administração de vitamina C e E para aumentar os níveis de antioxidantes e de bicarbonato de sódio para o combate da acidose metabólica. A acidose metabólica é explicada pela diminuição do *feedback* inibitório de γ -glutamilsteína sintetase, proveniente dos baixos níveis de GSH. Nestas condições a enzima γ -glutamilsteína sintetase continua a produzir grandes quantidades de γ -glutamilsteína, que é depois convertido em 5-oxoprolina. A 5-oxoprolina vai estar em excesso, sendo eliminada depois pela urina (Nishimura, 1999).

A enzima 5-oxoprolinase catalisa a abertura do anel da 5-oxoprolina com a intenção de fornecer glutamato à reacção. Uma deficiência nesta enzima não é normal acontecer e corresponde a uma rara doença recessiva autosómica designada de 5-oxoprolinúria. Esta doença manifesta-se por ser clinicamente heterogénea, com a formação de cálculos renais, enterocolite, degeneração mental, hipoglicemia neonatal, anemia microcítica e microcefalia (Nishimura, 1999).

As propriedades multifuncionais da GSH estão reflectidas num interesse crescente desta molécula como parte integrante das mais diversas investigações (Ballatori, 2008). De seguida, descreve-se alguns casos onde essa influência é visível.

4.3.1) Glutationa vs Doenças Cardiovasculares

O stresse oxidativo pode resultar do excesso da produção de espécies oxidantes ou da depleção das defesas antioxidantes. As principais doenças cardiovasculares associadas a este desequilíbrio redox são a hipertensão e aterosclerose.

Polimorfismos em enzimas antioxidantes, incluindo a GPx e a GST, estão associados a aumento do risco da doença cardiovascular, devido à acumulação de ROS. Numa visão mais particular, um polimorfismo ao nível da glutatona peroxidase, significa um risco aumentado para a doença cardíaca coronária, derrame e trombose venoso cerebral. No caso de um polimorfismo ao nível da glutatona S-transferase, verifica-se a elevação de marcadores inflamatórios e um aumento do risco de uma doença coronária em tabagistas (Ballatori, 2008). A fim de contrariar o fenómeno, as enzimas tioredoxina e glutarredoxinas desempenham uma função importante na protecção contra este tipo de doenças, através de melhoria dos efeitos causados pelos ROS, atenuando os efeitos da inflamação (Bruguera, 2002).

O desenvolvimento da hipertensão está fortemente associado ao aumento das espécies reactivas em células endoteliais, assim como ao aumento de angiotensina II, uma vez que é um forte estímulo para a produção de novas espécies reactivas de oxigénio. Estudos efectuados em ratos revelam que a angiotensina II induz a

hipertensão arterial mas é possível de ser impedida por MRP1. Esta característica foi designada pelo aumento dos níveis de GSH nas células do endotélio vascular, provocado pela diminuição da exportação de GSH. Uma hipótese terapêutica sugerida para atenuar estes efeitos é a administração de GSH em lipossomas (Bruguera, 2002; Ballatori, 2008).

4.3.2) Glutationa vs Doenças Pulmonares

Diversas células do parênquima pulmonar são capazes de gerar radicais livres de oxigénio (RLO), como células endoteliais, células alveolares tipo II, células ciliadas da via aérea, e macrófagos alveolares. Estes sistemas geradores de RLO no pulmão são semelhantes aos dos outros tecidos (Ballatori, 2008).

Um desequilíbrio na homeostasia da GSH e no seu estado redox, contribuem para a etiologia e progressão de doenças pulmonares como por exemplo doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), enfisema pulmonar, asma e insuficiência respiratória aguda. Por outro lado, as contribuições do meio ambiente para a destabilização do equilíbrio interior do organismo, não podem ser ignoradas afectando a homeostasia da GSH. A regulação dos níveis de GSH no pulmão consiste num sistema bastante complexo (Bruguera, 2002).

O factor de transcrição Nrf2 desempenha um papel fundamental na regulação da expressão de numerosos genes de compostos antioxidantes, incluindo GCS, GST e GPx, e verifica-se ainda que o Nrf2 e a GPx apresentam níveis reduzidos em doentes com enfisema pulmonar. Este factor, Nrf2, na DPOC, intervém na regularização dos níveis de GSH que se encontram diminuídos. Esta proteína, Nrf2, aparece também como controlador do conteúdo da GSH por regularização da expressão de MRP1 (Rahman, 2005).

Fenómenos de polimorfismo em enzimas integrantes da actividade da GSH, são também responsáveis pelo desenvolvimento de doenças pulmonares. Se se verificar polimorfismo na γ -glutamilcisteína sintetase e glutatona S-transferase, podem

contribuir para o aumento do risco de DPOC. Decorrem assim vários estudos no sentido de verificar os benefícios de compostos antioxidantes, tais como a N-acetilcisteína e o polifenol resveratrol, em doenças pulmonares. No futuro, o uso de substâncias neutralizantes dos RLO pode fazer parte do arsenal terapêutico no combate às principais doenças pulmonares (Carolis, 2009).

Outra alternativa a ser estudada é a administração directa de GSH, que revela ser uma alternativa terapêutica bastante benéfica, uma vez que vai proteger e “revitalizar” as células epiteliais na prevenção contra a asma (Rahman, 2005).

4.3.3) Diabetes *mellitus*

A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica caracterizada por uma elevação crónica e prolongada da glicose sérica. Esta elevação deve-se à ineficiência de insulina capaz de compensar os valores de glicose, podendo manifestar-se em dois tipos diferentes de diabetes (Ballatori, 2009).

As concentrações de GSH em eritrócitos e plasma sanguíneo são mais baixas em diabéticos e pacientes com síndrome metabólica e, conseqüentemente, os níveis reduzidos de GSH potencializam os efeitos causados pela presença de ROS. Os níveis de GSH podem ser diminuídos de duas formas: efeito directo da glicose e insulina na síntese de GSH ou pelo consumo de um co-factor essencial na regeneração de GSH através da GSSG, através da via poli-ol (Lu, 2009). Esta via pode levar a uma redução de GSH, uma vez que é dependente de NADPH para conseguir estabelecer a conversão de glicose em sorbitol, catalisada pela aldose redutase. Em condições normais de glicose, esta via é pouco usada, no entanto, em casos de hiperglicemia, esta via é recorrente provocando uma diminuição nos níveis de NADPH. Desta forma, a conversão de GSSG a GSH fica comprometida, uma vez que o NADPH está a ser usado para a conversão de glicose e não se encontra disponível para a conversão da glutatona. Em condições severas de stresse oxidativo isto leva a uma diminuição acentuada de GSH (Kharb, 2000).

4.3.4) Efeitos da insulina e da glicose na síntese de GSH

A exposição prolongada a níveis elevados de glicose promove a diminuição dos níveis celulares de GSH e diminuição do mRNA para as subunidades reguladoras da GCS. Esta enzima tem demonstrado uma diminuição de actividade em eritrócitos de pacientes diabéticos. No entanto, a actividade da GS, parece não ser afectada pela diabetes. Ao contrário do que se verifica com a glicose, níveis elevados de insulina promovem a actividade catalítica da GSH e verifica-se o aumento da actividade, experimentalmente, em culturas de eritrócitos de doentes diabéticos. A relação entre níveis altos de glicose e baixos de insulina, vai proporcionar a formação de ROS. A diminuição da síntese de GSH e os baixos níveis da GSH promovem um enfraquecimento das defesas celulares contra o stresse oxidativo (Kharb, 2000).

Actividade da glutathione peroxidase em células- β pancreáticas:

As células β -pancreáticas são fundamentais na regulação dos níveis de insulina no organismo. Estas, em situações de stresse oxidativo, ficam expostas a danos oxidativos. A exposição a altas concentrações de glicose não aumenta a expressão da enzima glutathione peroxidase em células ilhota. Os baixos níveis iniciais de glutathione peroxidase e a incapacidade das células ilhota em aumentar a expressão da respectiva enzima durante o processo de stresse oxidativo, leva a que as células produtoras de insulina – células β -pancreáticas – fiquem mais vulneráveis. Os baixos níveis de GSH nos diabéticos, fazem com que existam valores baixos de substrato disponível para a enzima glutathione peroxidase, contribuindo para uma baixa actividade das células produtoras de insulina e, conseqüentemente, estas células tornam-se menos activas contra o peróxido de oxigénio. Exemplo disso é a exposição prolongada de glicose que diminui a actividade da glutathione peroxidase no endotélio vascular, células do rim e mitocôndrias presentes no cérebro (Ballatori, 2009).

4.3.5) Glutathione na terapia da diabetes

Estudos revelam que a GSH pode melhorar o desempenho do organismo no combate à diabetes. A infusão de GSH em não-insulina dependentes melhora a captação de glucose mediada pela insulina e os níveis de GSH nos eritrócitos. A N-acetilcisteína também tem sido estudada verificando-se que o seu uso melhora o estado redox das células (Ballatori, 2009). Estudos em modelos de ratos de laboratório, verificaram que a administração de N-acetilcisteína reduzia a apoptose de células β -pancreáticas (Kharb, 2000). Com estes dados sugere-se que a N-acetilcisteína pode assim diminuir a probabilidade de um estado hiperglicémico crónico evoluir para o estado de diabetes, evitando ao mesmo tempo também danos noutros tecidos periféricos (Chen, 2004).

Outros estudos em modelo de ratos, revelam que este tipo de terapia sugerido para o tratamento de diabetes, pode também ser útil para diabéticas grávidas. Verificou-se que durante este estado os níveis de GSH encontram-se igualmente baixos bem como a taxa de síntese. Após a administração de GSH, observou-se que os valores de GSH foram recuperados parcialmente e, a actividade da γ -glutamylcisteína sintetase é possível mesmo em estados de hiperglicemia, melhorando assim o crescimento do embrião e a ocorrência de malformações (Ballatori, 2009).

4.3.6) Glutathione em infecções virais

Alguns estudos incidem na associação que a GSH pode ter durante o processo de infecção viral e, de que forma a GSH melhora essa infecção (Obert, 1994; Franklin, 2010).

Durante infecções virais como HIV, verifica-se que os níveis de GSH se encontram diminuídos, e podem estar associados com a diminuição da capacidade de sobrevivência em indivíduos infectados. Os níveis de GSH encontram-se diminuídos no plasma sanguíneo, no líquido epitelial de revestimento, nas células mononucleares de sangue periférico e em monócitos de indivíduos infectados pelo HIV. No entanto, o mecanismo de depleção de GSH nestes casos ainda não é conhecido (Cohen, 1997;

Ballatori, 2009). O mesmo estudo revela a existência de uma associação entre os níveis baixos de GSH com a replicação do vírus. Sabe-se que um défice de GSH em doentes infectados por HIV, vai favorecer a replicação viral e consequentemente a progressão da doença. Os mecanismos subjacentes a este processo não estão ainda esclarecidos, no entanto há evidências de que há diminuição de GSH e que durante a progressão do HIV o número de linfócitos CD4+ vai diminuindo, sendo que a diminuição de GSH contribui para a apoptose dessas células CD4+ (Ballatori, 2009).

4.3.7) Doenças neurodegenerativas

O cérebro é bastante sensível à alteração da homeostasia da GSH. Disfunções do sistema nervoso estão relacionadas com erros inatos do metabolismo da GSH. Duas hipóteses foram levantadas na tentativa de explicar a sensibilidade das células cerebrais às oscilações dos níveis de GSH. A primeira baseia-se no facto de este órgão consumir altas concentrações de oxigénio. A segunda baseia-se no facto da GSH poder funcionar como neuromodulador ou neurotransmissor, sendo assim essencial para a actividade do sistema nervoso central (Dringen, 1999; Ballatori, 2009).

Apesar de o cérebro representar apenas 2% do peso corporal nos humanos, este órgão consome cerca de 20% do oxigénio total, e cerca de 90% desse oxigénio é usado por mitocôndrias para produzir ATP (Ballatori, 2009). Como tal, é de prever que o stresse oxidativo seja considerado por muitos autores, um dos mecanismos mais implicados no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, nomeadamente, doenças como Parkinson, Huntington e doença de Alzheimer (Kryzhanovsky, 2004).

Os níveis de GSH no cérebro são baixos comparativamente com outro tipo de tecidos e/ou células. Por exemplo, as concentrações de GSH nos neurónios são de aproximadamente 2,5 M (Ballatori, 2009). Estes valores diminuídos podem ser causa de uma menor actividade específica para GCS em neurónios, tornando o cérebro mais sensível a substâncias tóxicas. Neste tipo de células a expressão do MRP1 é baixa, o que condiciona o transporte de GSH para estas células (Wilson, 2003).

A doença de Alzheimer é uma das principais doenças neurodegenerativas a ser estudada devido à controvérsia de resultados obtidos acerca do papel da GSH nesta doença (Bannister, 1974). O stresse oxidativo é proposto como um importante mecanismo patogénico causal da doença. Diferentes investigadores, para iguais zonas do cérebro, obtiveram dados diferentes em termos quantitativos de níveis GSH, demonstrando a complexidade desta abordagem, no esclarecimento do papel da GSH. No entanto, sabe-se que níveis baixos de GSH potenciam os efeitos nefastos da patologia (Tapiero, 2003).

Outros estudos demonstraram que doentes parkinsónicos têm falta de dopamina no circuito neuronal nigroestriado (Wilson, 2003). No entanto esta é uma doença que actualmente não está devidamente esclarecida na qual as causas efectivas não são ainda exactas. O papel do stresse oxidativo é realçado pela determinação do conteúdo em GSH nos diversos estados patológicos. Verifica-se que os níveis de GSH são menores, aproximadamente 40%, na substância nigra em doentes parkinsianos. A nível celular, as células dopaminérgicas demonstram perder valores significativos de GSH, realçando a importância desta molécula no organismo. Devido ao facto da região nigraestriada ser abundante em GSH, é provável que a oxidação da dopamina leve à depleção de GSH. Contudo, este efeito de diminuição dos níveis de GSH, não se supõe ser a principal causa para o despoletar da doença, como também a grande evidência de depleção surge na substância nigra e não de forma generalizada a todos os tecidos. No entanto, o facto de ocorrer decréscimo em GSH, leva a um ambiente propício à ocorrência de morte celular programada e como tal, existe uma associação indirecta da depleção de GSH com a morte celular programada nestas células (Bannister, 1974).

Numa vertente mais especulativa, existe outra hipótese de explicação para a sensibilidade do sistema nervoso central face à diminuição da GSH. Esta pode funcionar como um neuromodulador ou neurotransmissor e, como tal, qualquer alteração que ocorra nos níveis de GSH, taxas de rotatividade, ou estado de oxidação, pode prejudicar a actividade do sistema nervoso central (Bernard, L.P., 2008). A GSH é composta por três aminoácidos neuroactivos (glutamato, cisteína e glicina) e, devido a este facto, esta molécula pode ser considerada como uma forma de armazenamento ou precursor para estes aminoácidos biologicamente activos. O glutamato e glicina, funcionam como

neurotransmissores excitatórios e inibitórios, respectivamente. A cisteína apresenta também um efeito excitatório na N-metil-D-aspartato (NMDA), componente de uma classe de receptores de glutamato (Lomaestro, 1995). Quando se verifica a degradação da GSH extracelular através da GT, libertam-se os seus aminoácidos respectivos (Bernard, 2008; Augustine, 2004).

O papel crítico verificado pelo desempenho da GSH na sobrevivência neuronal fornece uma razão bastante sustentável para o desenvolvimento de terapias destinadas a restabelecer os níveis cerebrais de GSH. Contudo, as tentativas no sentido de fazer a esta terapia um sucesso têm sido ineficazes. Existem obstáculos nos quais fazem com que a entrega de GSH não seja tão imediata como se pretende. A impermeabilidade relativa da barreira hemato-encefálica (BHE) e o facto da cisteína, que é o aminoácido limitante da síntese de GSH, poder ser citotóxica quando administrado em doses elevadas, fazem com que esta terapia seja inviabilizada (Tapiero, 2003).

Como na ciência tudo é certo até se provar o contrário, é de se prever que para breve estas limitações possam ser ultrapassadas e se verifique um grande avanço no meio terapêutico no âmbito da utilização da GSH, visto ser uma molécula com extremas potencialidades.

É de prever que com a progressão da idade, os níveis de GSH tendam a ser progressivamente mais reduzidos e, por sua vez, os níveis de antioxidantes e defesas contra estímulos exógenos tendem a ser mais escassos. Por exemplo, é um facto adquirido que com o avanço da idade ocorra uma diminuição da actividade da GCS, GS e GR. Esta redução talvez esteja envolvida numa série de factores que contribuem para a redução não só da sanidade mental, como também para toda a redução sentida a nível sensorial. É usual a audição e a visão sofrerem de forma progressiva uma redução na sua eficácia, e, lentamente sofrerem danos que podem ser ou não prevenidos (Tapiero, 2003). A GSH está normalmente presente em valores elevados na lente ocular, córnea, humor aquoso e na retina, onde irá executar diversas funções, incluindo a manutenção da hidratação do tecido normal, manutenção da transparência da lente e protecção contra danos oxidativos (Giblin, 1983). Prevê-se que o declínio de GSH ocular esteja implícito no desenvolvimento de doenças oculares relacionadas com a idade,

nomeadamente cataratas nucleares, glaucoma e degeneração macular (Ballatori, 2009). A visão depende em primeira instância da retina. Esta é um órgão sensorial especializado que transforma os estímulos luminosos em estímulos eléctricos. Devido à sua importância sensorial, à sua função, à extensa exposição solar e consumo de oxigénio, este órgão demonstra ser especialmente susceptível ao stress oxidativo. Da mesma forma que neste caso a GSH funciona como um adjuvante no sentido de prevenir as lesões na retina, esta tem sido associada também com a etiologia das duas principais retinopatias, glaucoma e degeneração macular relaciona com a idade (DMI) (Tapiero, 2003).

A suplementação com antioxidantes tornou-se uma estratégia terapêutica para prevenir ou retardar as anomalias oculares, obtendo-se resultados benéficos e sustentadores para a particular relevância que existe inerente à GSH (Kryzhanovsky, 2004).

A deficiência auditiva é outra doença crónica comum associada à idade. Esta anomalia sensorial está também relacionada com a produção de ROS. Teste efectuados em modelos de ratos demonstram que esta patologia desenvolve-se mais cedo e é mais severa, quando se verifica a deficiência da superóxido dismutase, da mesma forma que uma mutação no gene da glutathione peroxidase (GPx1) aumenta o ruído provocado pela perda auditiva. Estes dados apenas são válidos em modelos de ratos usados em investigação, contudo, prevê-se que o funcionamento humano passa também por estes fenómenos (Tapiero, 2003).

Outras patologias poderiam ser abordadas no contexto de patologias de avanço com idade. Na osteoporose estima-se que a GSH também seja benéfica como forma de terapia. Face a esta realidade, seria interessante examinar e analisar se o tratamento clínico com precursores de GSH e derivados, ou suplementos antioxidantes, em mulheres pós-menopáusicas, surtiria resultados significativos para a saúde e, numa vertente mais capitalista, benefícios de carácter económico (Ballatori, 2009).

4.3.8) Neoplasias

Seria um grande avanço na ciência e na história da humanidade reverter a mortalidade associado a uma das grandes doenças, senão a maior, do século XXI: o cancro. Várias doenças já foram abordadas mas talvez o cancro demonstre uma “emergência” mais evidente no sentido de obtenção de alternativas terapêuticas.

É sabido que ROS e espécies electrofílicas podem danificar o DNA e que a GSH tem capacidade protectora face a esses agentes tóxicos. A GSH pode ainda destoxificar directamente substâncias cancerígenas através da Fase II do metabolismo e subsequente exportação destes produtos da célula. Por outro lado, índices elevados de GSH verificados em vários tipos de células cancerígenas e em tumores sólidos conferem a essas células e tecidos uma resistência acrescida face à quimioterapia. Outros dados demonstram que este tipo de células patogénicas também apresenta uma actividade superior em GCS e GST, e uma maior expressão do transportador para a glutathione MRP/ABCC, como bombas de exportação (Tapiero, 2003).

O teor em GSH pode, em algumas células cancerígenas aumentar a resistência à quimioterapia, funcionando assim como um factor limitante à eficácia da terapêutica. A sobreexpressão específica de glutathione-S-transferase pode igualmente afectar a resistência à quimioterapia. Uma elevada expressão desta enzima acompanhado com altos níveis de GSH pode aumentar a taxa de conjugação de agentes quimioterápicos, reduzindo assim a sua eficácia. Os níveis elevados que podem surgir da expressão de transportadores como MRP/ABCC podem ser ainda outro factor que sustente a quimioresistência. O MRP1 tem sido observado numa variedade de tumores sólidos e hematológicos e o aumento de níveis da expressão de outros transportadores MRP são encontrados em reduzidos tecidos cancerosos (Tapiero, 2003). No sentido de tentar contornar os efeitos que a GSH tem perante a quimioterapia, sugere-se a depleção da mesma ou a inibição da síntese como reversão do processo de resistência quimioterápica. Contudo, não se consegue ainda direccionar selectivamente esta depleção apenas às células oncogénicas, e como tal, todas as células iriam sofrer com esta diminuição dos índices de GSH (Forman, 2009).

Em termo de conclusão deste capítulo, expõe-se uma tabela resumo de doenças associadas à molécula em estudo, GSH.

Tabela adaptada: Ballatori, N., *et alii.* (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 390, pp. 191-214.

GSH/Proteínas associadas	Patologia associada
γ-Glutamylcisteína sintetase	Anemia hemolítica, esquizofrenia, enfarte do miocárdio, sintomas neurológicos, DPOC
Glutathione sintetase	Anemia hemolítica, acidose metabólica, disfunção do SNC
γ- Glutamyltranspeptidase	Glutathionúria, arteriosclerose
Dipeptidase	Sintomas neurológicos
5-Oxoprolinase	Sintomas neuronais, hipoglicémia, pedra renal
N- Acetiltransferases	Sensibilidade a drogas
Glutathione-S-transferase	Cancro, DPOC, doença cardiovascular, diminuição auditiva
Glutathione redutase	Anemia hemolítica , doença cardiovascular
Glutathione peroxidases	Osteoporose, enfisema, doença cardiovascular
Peroxirredoxinas	Anemia hemolítica, cancro, doença cardiovascular, disfunção SNC
Glutarredoxina	Doença cardiovascular
Tiorredoxina	Doença cardiovascular
<u>Transportadores :</u>	
MRP1/ABCC1	Redução da resposta inflamatória, resistência a diversos fármacos
MRP2/ABCC2	Síndrome de Dubin-Johnson
CFTR/ABCC7	Fibrose cística

Capítulo V : Apoptose: Intervenção da GSH

5.1) Apoptose

A morte celular programada é um processo biológico altamente organizado que se desencadeia de forma não acidental, induzido por uma infinidade de estímulos. Caracterizada por um desencadear de processos bioquímicos específicos e por ocorrer alterações morfológicas em células individualizadas. Necessita de energia e síntese proteica para a sua execução e realiza-se em diversas etapas. Oposto à mitose, o seu termo provém do grego “apoptwsiz” que compreende a queda das folhas das árvores no Outono (Grivicich, 2007).

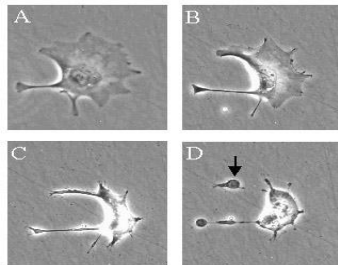
A ocorrência deste fenómeno no organismo é frequente e surge em diversas situações não sendo implícito a existência de um agente patológico. É visível a sua ocorrência no processo de organogénese e hematopoiese normal e patológica, durante o processo de atrofia de órgãos, durante o processo de destoxificação por eliminação de células e na reposição fisiológica de determinados tecidos maduros (Grivicich, 2007). É desta forma que se obtém um equilíbrio homeostático que sendo afectado pode promover o aparecimento de lesões proliferativas e degenerativas como enfarte do miocárdio e doença de Alzheimer (Cohen, 1997).

Para desencadear um fenómeno desta natureza existem estímulos, tanto intrínsecos como extrínsecos, que podem despoletar a morte celular programada. Entre muitos podemos enunciar: agentes oxidantes, glicocorticóides, neurotransmissores, factores de crescimento, toxinas bacterianas, cálcio, radicais livres e agentes mutagénicos (Kiechle, 2002).

Da mesma forma que existem factores que promovem a apoptose, existem outros que a suprimem e muitas vezes inibem o processo. Entre eles destacam-se: hormonas androgénicas e esteroídes, ião de zinco e factores da matriz celular (Anazetti, 2007).

É um processo que contempla a sucessão de determinadas etapas. Inicia-se pela perda da coesão da célula (perdendo aderência à célula vizinha) como se desintegrasse do seu plano estrutural. No entanto os organelos celulares ainda se mantêm íntegros. De

seguida a cromatina começa a condensar e a localizar-se junto da membrana nuclear que nesta fase ainda se mantém coesa (Kannan, 2000).



Legenda:

- A-** Desagregação do núcleo com condensação nuclear.
- B-** Diminuição da célula.
- C-** Condensação celular e início de formação de vesículas.
- D-** Formação de corpos apoptóticos.

Figura 14: Sequência de eventos apoptóticos. Adaptado de Reproductive and Cardiovascular Disease Research Group – Apoptosis [Em linha]. Disponível em <<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/>> [Consultado em Julho 2010]

A partir desta etapa começam-se a formar prolongamentos membranares designados de *blebs* e ocorre a desintegração do núcleo em fragmentos circunscritos através da membrana nuclear. O DNA fragmenta-se (cariorexis). Como consequência da sua degradação, o núcleo cinde-se em vários corpos cromatínicos. Estas etapas prosseguem em termos de sucessão às anteriores onde, a esta instância inicia-se o processo de formação de corpos apoptóticos que consiste no aumento dos *blebs* acabando por rebentar. A membrana celular desagrega-se onde os corpos apoptóticos contêm citoplasma, organelos e fragmentos nucleares. Face à resposta imunitária eficaz do organismo, estes fragmentos vão ser fagocitados por macrófagos. Este processo de reconhecimento procede-se rapidamente por parte dos fagócitos uma vez que durante a formação dos corpos apoptóticos ocorre em simultâneo um processo de sinalização. A fosfatidilserina transacciona-se do interior para o exterior da membrana plasmática, ficando exposta à superfície externa da célula “marcando” desta forma as células que deverão ser fagocitadas (Alberts, 1994).

5.1.1) Intervenientes essenciais para a apoptose

Agregado Bcl-2 e IAP

A família Bcl-2 consiste numa família de proteínas que induzem ou suprimem a apoptose. Os membros desta família têm um papel activo e determinante na apoptose daí ser relevante e importante a sua menção num vertente não só informativa como de contextualização da temática.

Mediante a sua expressão e o tipo de célula, apresentam um papel ou de indução ou de inibição da apoptose. Proteínas como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose impedindo a libertação de citocromo *c* da mitocôndria, sendo assim designadas de proteínas anti-apoptóticas, podendo mesmo inibir a formação de espécies reactivas de oxigénio e conseqüente acidificação do meio intracelular. Por sua vez, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas. A sua localização no citoplasma da mitocôndria também difere sendo que Bcl-2, Bcl-XL e Bax encontram-se nas membranas intra citoplasmáticas, Bad e Bid estão definitivamente no citosol. Esta diferente localização indica mecanismos distintos de participação na regulação da apoptose, independentemente do seu papel em todo o processo (Grivicich, 2007).

Outra particularidade desta família é que Bax e Bcl-2 conseguem formar homodímeros – Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2 – e heterodímeros – Bax-Bcl-2. É assente neste equilíbrio entre homodímeros e heterodímeros que se define o balanço pró-apoptótico e anti-apoptótico. Todas as proteínas bloqueadoras parecem funcionalmente equivalentes nas formas de homodímeros ou de heterodímeros, enquanto a Bax só promove a apoptose na forma de homodímero. Face a um estímulo de morte, a Bcl-2 “sequestra” Bax ou ocupa locais por ele supostamente ocupados e inibe a permeabilização na membrana externa da mitocôndria. Mediante outro tipo de estímulos desta vez representativos para Bax, este interage com a mitocôndria, de forma independente da interacção de proteínas anti-apoptóticas (Kiechle, 2002).

A família IAP é constituída exclusivamente por proteínas inibidoras de apoptose, que inibem a actividade das caspases efectoras 3 e 7, a actividade da caspase iniciadora

9, e ainda modulam o factor de transcrição NF-KB. Actualmente estão descritos a existência de cinco membros pertencentes ao agregado IAP: NAIP, XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2 e survivina. Esta última tem sido visivelmente destacada ao longo dos estudos efectuados na medida em que está associada fortemente à regulação e progressão da mitose, inibição da apoptose e resistência ao tratamento por radioterapia e quimioterapia em alguns cancros. No percurso apoptótico, as IAP são incapacitadas de efectuar a sua ligação inibitória com as caspases, por meio de proteínas mitocondriais libertadas para o citosol, na mesma instância em que é libertado o citocromo *c* que activa o Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor-1*) para interagir directamente com a caspase 9. Tudo isto potencia a eficiência do processo de activação de morte celular programada (Kiechle, 2002; Debatin, 2004).

5.2) Papel da glutathione na regulação da apoptose

Com o decorrer evolutivo da ciência, novos dados são identificados acerca de numerosos processos, inclusive na apoptose. Sendo este um fenómeno deveras determinante no organismo, é natural existir uma incidência forte de estudos e investigações sobre todo o fenómeno, no sentido de se obter toda a informação possível de maneira a que brevemente se obtenha um mecanismo capaz de intervir e manipular de bom grado o fenómeno da apoptose. Por outro lado a glutathione é uma ferramenta multidisciplinar no organismo intervindo nos mais diversos processos celulares, verificando-se a sua actuação benéfica na maioria deles. Como tal, associar esta molécula à apoptose e tentar interpretar diferentes situações comuns a ambas, é de todo inteligente e merecedor de empenho e interesse sobre o mesmo (Kannan, 2000).

Dados recentes afirmam processo apoptótico não se sucede apenas da forma como até agora tem sido descrito: um desencadear de activações em cascata que culminam na morte celular. Existe antes e durante o fenómeno, todo um ambiente intracelular que promove a apoptose, isto é, para este processo se efectuar é necessário que o interior da célula tenha condições favoráveis para tal. O estado redox e alterações fisiológicas do meio intracelular são essenciais para que a “célula pré-apoptótica” obtenha a sinalização adequada (Grivicich, 2007).

Apesar do papel da GSH na apoptose não estar plenamente esclarecido, os estudos revelam que é um factor de início da progressão da morte celular em virtude a uma série de estímulos apoptóticos (Franklin, 2010).

A GCS é um factor que relaciona a GSH à apoptose uma vez que pode proteger as células de estímulos extrínsecos e intrínsecos que levam à activação das vias de sinalização. Níveis elevados de GCS inibem a activação de apoptose porque a GSH em excesso protege a célula de estímulos apoptóticos. Por outro lado, níveis reduzidos de GCS levam à activação do fenómeno em diversos tipos de células. Outra informação interessante é o facto do promotor desta enzima apresentar locais de ligação para o reconhecimento de proteínas como a proteína activadora-1 (AP-1 ou TRE), AP-2, factor nuclear kB(NF-kB) e EpRE (elemento de resposta antioxidante). Este elemento encontra-se localizado no flanco 5' da sequência de genes em ambas as subunidades estruturais (catalítica e reguladora) da GCS. Esta informação isolada não demonstra ter directamente interferência com a apoptose. No entanto, o EpRE, mediante o gene expressado, regulada a funcionalidade do factor Nrf2. Este quando em concentrações baixas, reduz consequentemente a expressão de GCS, o que leva à diminuição de GSH e enzimas GSH-dependentes. Este ambiente em défice de GSH leva à progressão de um ambiente propício aos radicais livres, e posterior apoptose. Por conseguinte, o Nrf2 é relacionado com a resistência à apoptose e protecção contra a oxidação. (Friesen, 2004; Kiechle, 2002).

Uma questão lógica e pertinente é qual será a mais-valia, GSH no meio interno citosólico ou no meio interno mitocondrial? Visto que ambos os meios se vêm envolvidos com diferentes vias de activação apoptótica, será interessante saber se é mais vantajoso existir uma saturação de GSH num meio do que no outro e qual será a consequência inversa.

Alguns estudos apontam para o facto de a apoptose estar directamente relacionada com o declínio de GSH no meio citosólico mas não no mitocondrial (Franklin, 2010). Por outro lado, existem estudos que demonstram que valores baixos de GSH mitocondrial são um promotor de activação da cascata das caspases. Patologias e tratamentos que provoquem o decréscimo de GSH surgem como evidências para a

disfunção de GSH mitocondrial, em vez da citoplasmática. Outro dado indicativo da GSH mitocondrial como interveniente na apoptose é o facto de tióis situados na mitocôndria, agirem como reguladores do respectivo fenómeno. De facto a mitocôndria é um organelo essencial na célula e a sua intervenção directa na respiração aeróbia faz com que estas estruturas sejam preventivas face a situações de oxidação e que uma depleção de GSH, torne a célula mais susceptível à lesão oxidativa. Como tal, não é fácil debater qual o mais importante e mais relevante para a apoptose, se a GSH mitocondrial ou a citosólica, dado tratar-se de sistemas indissociáveis visto que a GSH citosólica, juntamente com reservas de GSSG e glutathione redutase em toda a membrana externa, são componentes necessários para que a mitocôndria permaneça funcional e com níveis estáveis de GSH (Friesen, 2004).

A GSH é transportada do citoplasma para a mitocôndria, sendo necessária a intervenção de transportadores monocarboxilatos, hidróxido de glutamato, entre outros. Assim sendo, se existir uma abundância de transportadores, é provável que também seja um factor de protecção contra a apoptose. Já foi comprovado experimentalmente que a inibição do transporte de GSH para a mitocôndria leva a que o dano oxidativo seja induzido pelo citocromo *c* e conseqüentemente há a activação da caspase 9 e posterior apoptose (Franklin, 2010).

Toxicidade induzida por citotóxicos (xenobióticos, quimioterápicos e metais), leva à oxidação da GSH a GSSG mediada por espécies reactivas de oxigénio, diminuindo a biodisponibilidade de GSH e, em situações deste tipo, o resultado final é a apoptose (Kannan, 2000). Estudos revelam que a diminuição de GSH intracelular, concomitante a um aumento de ROS, são fenómenos característicos no fenómeno de apoptose. Neste contexto, a perda de GSH é um dos eventos característicos de morte celular por apoptose, uma vez que torna a célula intolerante à presença de agentes oxidantes. Quando ocorre uma diminuição dos níveis de GSH mitocondrial, a produção de energia é afectada e a célula incha sofrendo “necrose secundária” – apoptose tardia. Ocorrendo uma diminuição na produção de ATP causada por agentes oxidantes, a mitocôndria fica com um défice em energia, levando à libertação de citocromo *c*, alterando a permeabilidade da membrana mitocondrial. Como é visível, existe uma

panóplia de evidências que realçam a influência da GSH mitocondrial na apoptose (Anazetti, 2007)

Transporte de GSH na Apoptose

As proteínas MRP são responsáveis pelo transporte da GSH, GSSG e conjugados de glutathione para o meio extracelular e requerem ATP para efectuarem essa função. Quando ocorre morte celular programada, verifica-se que a célula liberta GSH para o meio extracelular através de transportadores específicos. Tanto o MRP como famílias de Oatp1 estão a ser implicados na exportação de GSH durante a apoptose, no entanto apenas existem dados conclusivos para a directa participação de MRP no respectivo transporte (Ballatori, 2005).

Um estudo colocou em termo de comparação duas linhagens de células; células que libertam GSH durante a apoptose, e células que não libertam. Ambas as linhagens foram marcadas com calceína, complexo fluorescente, para a qual os MRP apresentam capacidade de transporte. Foi verificado que o transportador apresenta diferente localização e funcionalidade em cada uma das linhagens. Nas células onde se verificava a libertação de GSH durante a apoptose, o MRP1 estava amplamente localizado na membrana plasmática e em condições funcionais, uma vez que houve transporte de calceína. Em contraste, nas células que não libertavam GSH verificou-se que continham poucos MRP1 pois não ocorreu exportação de calceína, quer em condições normais, quer em condições apoptóticas. Foi também comprovado que em situações de sobreexpressão de MRP1, ocorria um aumento na libertação de GSH, tanto em condições normais como em condições apoptóticas. Uma maior libertação de GSH juntamente com uma redução de GSH intracelular, parece ser necessária para a progressão da apoptose. Outros estudos têm associado também aumentos de citotoxicidade para as células com sobreexpressão de MRP1 devido à perda de GSH intracelular (Ballatori, 2008). Por sua vez, o facto de sair GSH da célula faz com que o meio extracelular fique saturado da mesma. Através de mecanismos específicos que envolvem a GGT, a GSH pode ser regenerada no meio intracelular. Com isto e de uma maneira geral, a sobreexpressão de GGT pode ser outra alternativa na prevenção da apoptose induzida pelo stresse oxidativo (Kannan, 2000).

5.3) A GSH na cascata de sinalização

A progressão da apoptose depende de um ciclo de amplificação de clivagens de caspases. Estas são clivadas por activação de outras através de sinais e interacção com receptores apropriados (Sies, 1999).

A diminuição dos níveis de GSH está envolvida na regulação tanto da via extrínseca como intrínseca da sinalização apoptótica das caspases em pontos de actuação e controlo distintos. A GSH modula a permeabilidade membranar e a activação de caspases predispondo a célula para a ocorrência de apoptose. Índices reduzidos desta molécula proporcionam a formação de poros membranares – apoptossoma e activam a via intrínseca por dimerização oxidação dependente do mediador Bax. Este ambiente com níveis reduzidos em GSH não só activa o Bax como liberta o citocromo *c* da mitocôndria que para aceder às suas funções pró apoptóticas necessita de ser oxidado. Para isso suceder leva a que os índices de GSH se tornem escassos. Através da via das pentoses fosfato, a GSH pode elevar os seus valores e tornar inactiva a libertação do citocromo *c*. Este fenómeno foi comprovado em células cancerígenas e neurónios saudáveis (Kiechle, 2002).

Também para Bcl-2 se verificou uma relação com a GSH. Este regula de certa forma o conteúdo de GSH em diferentes localizações na célula. Ao nível da mitocôndria este interacciona de uma forma directa com o conteúdo em GSH, mediando a sua função antioxidante. Assim, o facto de existir um decréscimo de GSH faz com que a resistência que Bcl-2 oferece à apoptose não seja suficiente para a evitar. Contudo, o contexto desta situação só foi reportado em células de carácter específico e em circunstâncias atípicas do “ambiente” normal (Kannan, 2000).

Outro dado relatado é o facto da proteína Bcl-xl ser mencionado como salvaguarda para a GSH, isto é, estabelece um equilíbrio dinâmico na regulação da homeostasia, permitindo que não se perca GSH. Quando se verifica um elevado stresse oxidativo ao nível do reticulo, há a activação de cinases que induzem proteínas específicas a dificultar o trabalho das anti-apoptóticas. Como tal, há activação dos pró-apoptóticos que realizam a sinalização respectiva ao accionamento das caspases que

levam a célula à destruição. Conclui-se assim que alterações quantitativas e qualitativas de GSH ao nível do retículo podem exacerbar a possibilidade da célula entrar em apoptose (Debatin, 2004).

Relativamente a lesões específicas de DNA, englobando ligações cruzadas e ruptura de ligações de cadeia dupla, a sua activação é promovida pelo p53 e pela actividade da caspase 2, que accionadas geram dano oxidativo, dificultando a respectiva reparação. A difusão de GSH ao nível do núcleo é proporcionada através de poros nucleares localizados na membrana. Visto a característica funcional do núcleo de uma célula, é pertinente que se tente a todo o custo manter esta manutenção fisiológica de GSH. No entanto, conjugados e derivados da glutathione também favorecem a manutenção do núcleo. A glutathione S-transferase constitui uma classe de enzimas especializadas que geram um grande conjunto de tioésteres, os designados S-conjugados. Estes em conjunto com GST protegem o DNA contra a apoptose induzida na medida que inviabilizam acção do stresse oxidativo. O DNA mitocondrial é também protegido pela GSH que reduz a susceptibilidade de ser atingida por agentes apoptóticos como a cisplatina, BSO e doxorubicina (Debatin, 2004; Franklin, 2010).

Capítulo VI: Conclusão da abordagem sobre a temática

6) Conclusão

Muito para além do que foi discutido ao longo desta dissertação podia ter sido abordado, muitos outros dados podiam ter sido mencionados, no entanto, optou-se por uma panóplia de informação que se pensa ser mais relevante. Não é de todo uma temática fácil. Por um lado torna-se difícil apenas restringir o projecto num só tema, uma vez que existe uma variedade de informação num largo espectro de campos de actuação e, de igual forma torna-se complexo criar algo inteiramente novo, onde não exista confronto de informação e repetição de conceitos.

Relativamente à glutathione, esta tem um papel fundamental na resistência celular ao dano oxidativo. É um dos principais antioxidantes do organismo e tem um papel importante na metabolização/excreção de xenobióticos (Franklin, 2010).

Muitas doenças agudas e crónicas apresentam um desequilíbrio na expressão de GCS e GS. Alguns estudos demonstram que existe uma ligação entre determinadas doenças e o facto de existir um polimorfismo numa subunidade da GCS (Dickinson, 2002). No futuro é pertinente aprofundar estes dados, identificando polimorfismos associados a doenças, que também estão associadas ao stresse oxidativo. A identificação desses mecanismos permitirá o desenvolvimento de terapias dirigidas à prevenção e combate dessas doenças.

Futuramente, se se conseguir perceber e conhecer todos os locais de actuação e ligação da GSH e a formar como ela actua, podar-se-á ter um grande avanço na terapia de diversas patologias associadas ao stresse oxidativo. A diminuição de GSH na apoptose é um facto confirmado. Se o processo apoptótico for controlado e as vias bioquímicas envolvidas estiverem completamente esclarecidas sabendo-se de que maneira é que se pode manipular a concentração de GSH a fim de se evitar o processo apoptótico, doenças neurodegenerativas, por exemplo poderiam vir a ser minimizadas.

Desta forma, conclui-se que é uma molécula em ascensão potencial na terapêutica por todas as suas funções, características fortificantes e intervenção metabólica. A sua

profusão é notória e torna-se mais empolgante o seu estudo e criação de motivos de utilidade visto que a sua produção é inata no organismo. No entanto, estudos descrevem o interesse de se produzir GSH industrialmente, uma vez que por ser um tripeptídeo simples, a sua produção em modelo biotecnológico heterólogo em culturas vegetais seria uma mais-valia. No entanto, este tipo de produção seria demasiado dispendioso, tornando o processo inviável. Futuramente, se esta alternativa for conseguida, a adição de GSH a géneros alimentícios ou a terapias farmacológicas podiam constituir anti-cancerígenos e antioxidantes de elevada potência, se ao mesmo tempo também se evoluir no conhecimento do metabolismo da GSH (Arisi, 1998).

A título de conclusão e apenas a menção de mais um contributo que a glutathione pode suplementar. Faz sentido pensar-se nela como meio preventivo de um dos vírus mais letais e complexos do nosso século, HIV. O HIV é predominantemente mais extensível em casos em que se verifique estados oxidativos sendo agravado em situações de deficiência de cisteína e glutathione. Linfócitos T e B exigem níveis adequados de GSH intracelular para se poderem diferenciar, e em indivíduos saudáveis com níveis relativamente baixos de GSH, os níveis de células CD4 encontra-se baixo. A diminuição dos níveis de GSH induzida experimentalmente, inibe o funcionamento das células do sistema imunológico, mostrando que o *status* de GSH intracelular desempenha um papel central neste domínio. Em recém infectados com HIV, os valores de GSH nos monócitos são anormais. Quando a infecção progride esses valores voltam ao normal, ao mesmo tempo que o equilíbrio GSH/GSSG é perturbado. Os níveis plasmáticos de cisteína são baixos em pacientes infectados com HIV. A suplementação com N-acetilcisteína ajuda os doentes com HIV a restaurarem os níveis normais de GSH no sangue. Como tal, esta molécula pode ser peremptoriamente uma mais-valia futura (Anderson, 1998).

A glutathione é um dos mais potentes antioxidantes existentes no organismo. Todas as grandes patologias advêm de estados oxidativos. Dá que pensar.

Capítulo VII: Bibliografia

7) Bibliografia

- Abraham, P., *et alii*. (1996) Blood Glutathione concentrations in a large scale human study. *Chinical Chemistry*, 42(1), pp.64-70
- Alberts, B. (1994) *Molecular Biology of The Cell*. New York and London, Garland Publishing.
- Almeida, P., Fátima, A., Huber, P.C. (2008) Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31, pp.1170-1170.
- Anazetti, M.C., Melo, P.,S. (2007) Morte celular por Apoptose : uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa*, 1 (1), pp. 37-58
- Anderson, M.E. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Elsevier- Chemico-Biological Interactions*, 111-112, pp. 1-14
- Arisi, A.C.M., *et alii* (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany*, 49 (321), pp.623-647
- Augustine G.J., *et alii* (2004) Parkinson *In: McNamara, J.O. Invitación a la Neurociencia*, 2ª edição, Argentina, Panamericana Editorial Medica. pp.363
- Ayer, A., *et alii* (2010) The critical role of glutathione in maintenance of the mitochondrial genome. *Free Radical Biology & Medicine*, 10-1016, pp. 1-13
- Ballatori, N., *et alii*. (2005) Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204,pp. 238-255
- Ballatori, N., *et alii*. (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 390,pp. 191-214.
- Ballatori N., Hammond C.L., Krance S.M., Marchan R. (2008) Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology *Elsevier, Aspects of Medicine*, pp.3-10

- Bannister, R. (1974) Enfermedad de Alzheimer In: Bannister, R. *Neurologia Clinica* . 4ª edição, Barcelona, Editorial Marin S/A, pp. 98-136;
- Bannister, R. (1974) Parkinsonismo In: *Neurologia Clinica*. 4ª edição, Barcelona, Editorial Marin S/A, pp. 89, 227-229, 367
- Beattie, M.C., *et alii*. (2010) Effect of glutathione: redox state on Leydig cell susceptibility to acute oxidative stress. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 323(2), pp. 147-154
- Bernard, L.P., Razmpour, R., Zeevalk, D. (2008) Glutathione and Parkinson's disease: Is this the elephant in the room? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(4), pp.236-249
- Bertini, E., Federici, G., Pastore, A., Piemonte, F. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Elsevier, Clinica Chimica Acta*, (333), pp.19-36
- Bonnefoy, M., Drai, J., Kostka, T. (2002) Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med*, 31(25), pp. 1174-84
- Bounous, G., *et alii* (1989) Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. *Clinical Investigative Medicine*, 12, pp.154-161
- Bruguera, J., *et alii* (2002) High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 168(1), pp. 99 -106
- Carolis, C., Perricone, C. Perricone R. (2009) Glutathione: A key player in autoimmunity. *Elsevier, Autoimmunity Reviews*, 8(8), pp.697-701
- Carney, D., Huang, P., Pelicano, H. (2004) ROS: stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 7(2), pp. 97-110
- Chen, A., Yumei, F., Zheng, S. (2007) De novo synthesis of glutathione is a prerequisite for curcumin to inhibit hepatic stellate cell (HSC) activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 43. pp-444-450
- Chen, Y., *et alii* (2004) Genetically mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(3), pp. 1511-1526

Cohen, G.M. (1997) Apoptosis and Necrosis in Toxicology: A Continuum or Distinct Modes of Cell Death? *Elsevier, Pharmacology and Therapeutics*, 75, 153-177

Debatin, K-M., Friesen, C., Kiess, Y. (2004) A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. *Nature Publishing Group, Cell Death and Differentiation*, (11), pp.73-85

Dickinson, D.A., Forman, H.J. (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Elsevier-Biochemical Pharmacology*, 64, pp.1019-1026

Dringen, R. (1999) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, 62(2000), pp. 649-669

Flanagan, R.J., Taylor, A., Watson, I.D., Whelpton, R. (2007) *Fundamentals of analytical toxicology*. Londres, Wiley

Forman, H.J., Rinna, A., Zhang, H. (2009) Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30, pp.1-12.

Franklin, C.C. (2010) Enhanced glutathione: biosynthetic capacity promotes resistance to AS³⁺ - induced apoptosis. *Toxicology Letters*, 193(1), 33-40

Giblin, F., Winkler, B.S. (1983) Glutathione oxidation in retina: Effects on biochemical and electrical activities. *Experimental Eye Research*, pp.287-297.

Glutationa Project [Em linha]. Disponível em <<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0405/glutationa/index.html>>.

[Consultado em Novembro 2009]

Grivicich, I., Regner, A., Rocha, A.B. (2007) Apoptosis: Programmed Cell Death. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(3), pp.335-343

Health and Medical Information – Blog Henry Okigami, Glutationa [Em linha] Disponível em <<http://henryokigami.blogspot.com/2009/05/glutationa.html>>

[Consultado em Novembro 2009]

Höehr, N.F., Júnior, L.R., Kubota, L.T. (2001) Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos electroanalíticos na avaliação do stresse oxidativo. *Quimica Nova*, 24(1), pp.112-119

Kannan, K., Jain, S.K., (2000) Oxidative stress and apoptosis. *Elsevier, Pathophysiology*, 27, pp.153-160

Kaplowitz, M.D.N., (1981) The Importance and Regulation of Hepatic Glutathione. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 54, pp.497-502

Kharb, S. (2000) Low whole blood glutathione levels in pregnancies complicated by preeclampsia and diabetes. *Clinica Chimica Acta*, 294(1-2), pp.697-701

Kiechle, F.L., Zhang, X. (2002) Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Elsevier, Clinica Chimica Acta*, (326), pp. 27-40

Kronos Science Laboratory – Glutathione [Em Linha] Disponível em <<http://www.kronoslaboratory.com/dotnetnuke/FeaturedAssays/GlutathionePanel/tabid/137/Default.aspx>> [Consultado em Setembro 2010]

Kryzhanovsky, G.N. (2004) Some categories of general pathology and biology: health, disease, homeostasis, sanogenesis, adaptation, immunity: New approaches and notions. *Elsevier, Pathophysiology*, 11(3), pp. 135-138.

Larsson A., Ristoff E. (1998) Patients with genetic defects in the γ -glutamyl Cycle. *Chemico-Biological Interactions*, (97), pp.111-121

Lomaestro B., Malone M. (1995) Glutathione in health and disease: Pharmacotherapeutic Issues. *Ann Pharmacother*, 29(12), pp 1263-1273.

Lu, S.C. (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30, pp. 42-59.

Misra, I., Griffith, O.W. (1998) Expression and Purification of Human γ -Glutamylcysteine Synthetase. *Elsevier, Protein Expression and Purification*, 13(2), pp. 268-275

Nishimura, A., *et alii* (1999) Purification and Characterizations of a Novel 5-oxoprolinase (without ATP-Hydrolyzing Activity) from *Alcaligenes faecalis* N-38-A. *Applied and environmental Microbiology*, 65(2), pp.712-717

- Obert, G., Moog, C., Simon, G. (1994) Effects of glutathione precursors on human immunodeficiency virus replication. *Chemico-Biological Interactions*, 91(2-3), pp.217-224
- Park, W.H., You, B.R. (2010) Gallic acid induced lung cancer cell death is related to glutathione; depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicology in Vitro*, 24(5), pp. 1356-1362
- Penninckx, M. (1999) A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Elsevier, Enzyme and Microbial Technology*, 26(9-10), pp. 737-739
- Rahman, I. (2005) Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579(1-2), pp. 58-80
- Reproductive and Cardiovascular Disease Research Group – Apoptosis [Em linha]. Disponível em <<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/>> [Consultado em Julho 2010]
- Sies, H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Elsevier, Free Radical Biology & Medicine*, 27(9), pp. 916-920
- Tapiero, H., Tew, K.D. (2003) The importance of glutathione in human disease. *Elsevier, Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3-4), pp. 145-155
- Tew, K.D. (2007) Redox in redux: Emergent roles for glutathione S-transferase P (GSTP) in regulation of cell signaling and S-glutathionylation. *Elsevier, Biochemical Pharmacology*, 73(9), pp. 1257-126
- Timbrell, J. (2000) *Principles of Biochemical Toxicology*. 2ª edição, London, Taylor & Francis
- Wilson, B. A. (2003) The theory and practice of Neuropsychological Rehabilitation: An overview In: Wilson, B.A. *Neuropsychological Rehabilitation*.UK, Swets & Zeitlinger Publishers , pp. 1-10

Índice

Sumário	V
Abstract	VI
Agradecimentos	VII
Índice geral	VIII
Índice figuras	X
Abreviaturas	XI
Anexos	XV
Capítulo I: <i>Apresentação da Dissertação</i>	1
1.1) Enquadramento do trabalho e objectivos.....	2
Capítulo II: <i>Revisão estrutural, bioquímica e funcional da Glutationa</i>	3
2.1) Glutationa: Introdução à molécula	4
2.2) Espécies reactivas de oxigénio	7
2.3) Funções.....	8
2.4) Síntese.....	11
2.5) Ciclo do γ -glutamilo	14
2.6) Compartimentação e exportação	15
2.7) Catabolismo: degradação da GSH.....	16
Capítulo III: <i>Destoxificação: papel da GSH</i>	18
3.1) Destoxificação	19
3.2) Excreção e transporte.....	26
3.3) Poder antioxidante	27
3.4) Manutenção do estado tiol.....	28
Capítulo IV: <i>Relação da Glutationa em Doenças Humanas</i>	30

4.1) Introdução ao tema	31
4.2.) Glutationa e o seu estado de homeostasia	31
4.3) Relação da Glutationa com doenças humanas.....	32
4.3.1) Glutationa vs Doenças Cardiovasculares	34
4.3.2) Glutationa vs Doenças Pulmonares.....	35
4.3.3) Diabetes <i>mellitus</i>	36
4.3.4) Efeitos da insulina e da glicose na síntese de GSH	37
4.3.5) Glutationa na terapia da diabetes	38
4.3.6) Glutationa em infeções virais.....	38
4.3.7) Doenças neurodegenerativas.....	39
4.3.8) Neoplasias	43
Capítulo V : <i>Apoptose: Intervenção da GSH</i>	45
5.1) Apoptose.....	46
5.1.1) Intervenientes essenciais para a apoptose.....	48
5.2) Papel da glutaciona na regulação da apoptose	49
5.3) A GSH na cascata de sinalização	53
Capítulo VI: Conclusão da abordagem sobre a temática.....	55
6) Conclusão	56
Capítulo VII: Bibliografia	58
7) Bibliografia	59

