

Fig. 3.- Reacció catalitzada per la GST entre GSH i CDNB (extret de la ref. 116).

7.7.-Inhibidors de les GST

Els estudis d'inhibició s'han emprat clàssicament per intentar distingir entre espècies enzimàtiques diferents, en el cas d'isoenzims o d'altres formes múltiples d'un enzim amb la mateixa activitat catalítica.

En nombrosos estudis referents a les GST, les proves d'inhibició han resultat ser útils quan l'especificitat pels substrats, les dades immunoquímiques o altres criteris han estat insuficients (1, 116, 192). Els estudis d'inhibició tenen l'avantatge que requereixen només quantitats catalítiques de l'enzim i es poden fer amb el substrat més actiu (o amb el substrat que doni una major sensibilitat de l'assaig si s'utilitzen diferents mètodes analítics) (116).

Per a alguns inhibidors, com els esteroides i els derivats de les porfirines, sembla existir en la proteïna un segon lloc d'unió, diferent del lloc actiu. La troballa que els esteroides, així com els àcids biliars i les hormones esteroïdals, són inhibidors relativament forts, indica l'existència d'un lloc d'unió disponible per a aquestes estructures i suggereix que les GST juguen algun paper en el metabolisme dels esteroides. De la mateixa manera, l'estreta unió de l'hematina i altres derivats porfirínics recolza també la idea que algunes formes enzimàtiques intervenen, a més, en funcions de transport intracel·lular (116).

Dintre dels inhibidors de l'activitat GST s'hi troben també molts tipus de sals, com per exemple les de Pb, Cd, Zn, Cu, Hg o Be (65).

Els diferents isoenzims humans poden ser distingits fàcilment mesurant el valor de I_{50} amb determinats inhibidors. La I_{50} correspon a la concentració de l'inhibidor que aconsegueix inhibir en un 50% l'activitat de l'enzim. Així, doncs, el millor inhibidor per a un determinat isoenzim serà aquell que resulti amb una I_{50} menor.

INTRODUCCIÓ

Alguns dels inhibidors que més s'han utilitzat en estudis amb GST humana són: bromosulfoftaleïna: inhibeix amb més efectivitat els isoenzims de classe alfa i mu; N-etilmaleïmida: inhibeix principalment els de classe pi; i colat sòdic: inhibeix sobretot els de classe mu.

Els estudis amb inhibidors s'han portat a terme també intentant demostrar la seva influència sobre les GST i la capacitat d'aquests enzims d'actuar com a marcadors biològics d'exposició a compostos químics. És el cas d'algun treball realitzat sobre certs tòxics industrials (òxid d'estirè, acroleïna) i la GST eritrocitària (5)

També s'ha investigat la inhibició de les GST hepàtiques per àcids grassos i els seus ésters (àcid palmític, àcid esteàric, palmitoat ascòrbic, àcid linoleic i àcid araquidònic) donada la seva influència en l'origen de certa patologia, i així s'ha vist que tots ells inhibeixen alguns dels isoenzims hepàtics (128).

La GST classe π és inactivada pel peròxid d'hidrogen (H_2O_2), espècie reactiva de l'oxigen, a concentracions de 0,05 - 1 mM, mentre que les GST α i μ no s'inactiven ni a concentracions molt més altes (5mM). Aquest fet ens reafirma la importància de la integritat dels grups -SH de la cisteïna per a la seva acció, com ja hem comentat (170).

Recentment s'han intentat aplicar terapèuticament els diferents inhibidors de la GST en aquells casos on la GST està augmentada, i per això s'han provat diferents inhibidors de forma selectiva sobre els diferents isoenzims; per exemple, una quinona com el tetraclor-1,4-benzoquinona i el seu conjugat glutatidònic (150, 202).

7.8.-Inductors de les GST

Els nivells de GST en fetge poden augmentar amb l'exposició a molts agents,

INTRODUCCIÓ

incloent fenobarbital, 3-metilcolantrè, propiltiouracil i antioxidants com el butil hidroxianisol. La majoria d'aquests agents no causen un increment uniforme de totes les formes de GST.

Per exemple, després d'administrar fenobarbital a les rates, la quantitat de subunitats Ya i Yb en fetge va augmentar 130 i 240% respectivament, mentre que els nivells de Yc no es van modificar (10).

L'augment d'isoenzims específics es deu a l'increment dels nivells d'ARNm. Es pot trobar un augment de 4-5 vegades en els nivells d'ARNm 24 hores després de l'administració de fenobarbital a rates per a les subunitats Ya, Yb₁ i Yb₂, però només d'1,6 vegades per a la subunitat Yc (53, 149).

Sembla que una part d'aquest increment d'ARNm pot ser degut a una augment en l'activitat transcripcional, però aquesta no és l'única explicació. De fet, s'ha demostrat que la mitja vida del ARNm per a la GST Ya/Yc s'incrementa unes dues vegades després de l'administració de fenobarbital, la qual cosa indicaria que el fenobarbital augmenta la proporció de transcripció i, a més, l'estabilitat del ARNm per a la GST (53).

Aquesta inducció de la GST π s'observa, per exemple, en el cas de càncer de mama humà; s'ha vist que la banda cromosòmica que codifica la GST π està localitzada en la mateixa banda cromosòmica (11q13) que els proto-oncogens INT2 i HSTF1, els quals són freqüentment amplificats en el càncer de mama; per tant, això serà d'interès com a possible marcador per al pronòstic d'aquest tipus de càncer i com a marcador de resistència a quimioteràpics (165).

7.9.-Paper de les GST en la resistència a fàrmacs

Per entendre millor el paper catalític dels isoenzims de GST en el metabolisme i detoxificació dels fàrmacs antineoplàstics, és necessari tenir en compte el

INTRODUCCIÓ

caràcter electrofílic del fàrmac i el nucleofílic del grup tiol del GSH (196).

L'efectivitat de molts d'aquests fàrmacs pot estar força limitada per la resistència de les cèl.lules, la qual pot ser intrínseca en alguns tumors, però també pot originar-se en el curs del tractament quimioteràpic.

En el cas dels fenotips resistents a agents alquilants, sovint s'hi han trobat alteracions en el sistema GSH/GST, incloent augments del contingut de GSH cel.lular, increment de l'activitat GST i canvis en els nivells d'expressió d'un o més isoenzims (207).

L'agressió de la cèl.lula per part dels CE estimula els mecanismes reparadors de l'ADN. Com a conseqüència, podem observar alteracions en els genomes que codifiquen la síntesi de proteïnes, entre elles les GST. Així, podem apreciar l'existència de clons cel.lulars que, després del contacte amb CE, presenten un augment de determinats tipus de GST o, fins i tot, presenten isoenzims del tipus GST que abans no expressaven. Per tant, podem trobar no solament una supervivència d'aquestes cèl.lules enfront dels CE, sinó també l'aparició de resistències als quimioteràpics, producte de l'estimulació d'aquests mecanismes pel propi quimioteràpic, que actuaria com a CE (194).

Alguns dels mecanismes pels quals es produeix resistència a fàrmacs antineoplàstics s'han relacionat amb l'anió superòxid (100). Aquests fàrmacs donen lloc en el seu metabolisme a anions superòxids que, segons s'ha vist a l'apartat corresponent a radicals lliures, poden donar lloc a H_2O_2 o reaccionar directament amb els lípids de membrana originant la lipoperoxidació. Entre els mecanismes de reparació o defensa hi trobem diferents sistemes enzimàtics, com és la glutatió peroxidasa seleni-indepenent (GST α o GST π). Aquestes GST es poden utilitzar com a eliminadors dels productes de la lipoperoxidació i la inducció que s'observa de la GST π és resposta a aquests fàrmacs antineoplàstics.

Aquesta resposta de la GST al tractament amb quimioteràpics ha suggerit, en estudis de l'activitat GST en malalts leucèmics, que els valors baixos d'aquesta activitat enzimàtica es podrien utilitzar com a factor de pronòstic favorable per determinar aquells pacients que respondran a la terapèutica (95).

7.10.-GST i patologia

Molts carcinògens i mutàgens, entre d'altres compostos tòxics, s'han comprovat que són substrats de la GST (42). D'altra banda, les GST poden ser induïdes en el citosol de molts òrgans de diferents espècies animals per substàncies considerades com a anticarcinogèniques (178). Tot això suggereix que la GST deu tenir un paper important en la carcinogènesi (92).

Recentment, s'ha demostrat que la GST π -també anomenada 7-7-, que gairebé no s'expressa en fetge normal de rata, augmenta significativament en mostres tumorals de diversos teixits humans: cervell (153), mama (50, 145, 36) i sigma (172, 36). En aquest últim cas, s'havia vist que l'augment de GST no afectava a còlon ni a recte, però recents estudis immunohistoquímics emprant anticossos monoclonals de ratolí dirigits contra la GST π humana han demostrat que els nivells d'aquest isoenzim de GST estan augmentats en càncer de còlon i recte (91, 96, 129, 208, 37), a l'igual que en els de cervell, cèrvix, endometri, testicles i fibro- i condrosarcomes (91).

En el cas del melanoma maligne, s'ha comprovat un increment de GST π (l'únic isoenzim de GST present en fibroblasts, nevus i melanomes) respecte al teixit no tumoral. Això recolzaria la idea que la GST classe π pot contribuir a la resistència als fàrmacs que és característica del melanoma maligne (115).

Altres estudis han demostrat que, en alguns casos, hi pot haver un descens de l'activitat GST total en carcinomes renals, però a causa només d'una disminució de les formes bàsiques (α a ϵ), alhora que s'hi troba un augment de la forma

acídica (51).

També s'ha comprovat un descens de l'activitat GST en els tumors humans hepàtics (171).

Un altre cas d'augment d'activitat enzimàtica GST és el tumor de cèl.lules superficials transicionals de bufeta de l'orina (101).

L'augment d'activitat GST suggereix que seria possible utilitzar la determinació enzimàtica com a marcador tumoral, arribant-se a suggerir que la GST π és una proteïna oncofetal que s'expressa durant la carcinogènesi (98).

També s'ha demostrat un augment d'activitat enzimàtica GST en línies cel.lulars de carcinoma pulmonar humà de "cèl.lula no petita" ("non-small cell lung cancer"), en comparació amb el de "cèl.lula petita" ("small cell lung cancer"). Aquesta podria ser l'explicació de la resistència intrínseca als fàrmacs, que sovint es troba en els pacients amb càncer de "cèl.lula no petita" (32).

L'ús d'anticossos que no presenten reaccions creuades permet una caracterització immunològica precisa dels diferents grups d'isoenzims, i pot ser emprat per a la detecció immunohistoquímica (119). D'aquesta manera, es pot establir la distribució cel.lular de la GST π en teixits normals i tumorals, essent algunes estructures més immunoreactives que altres (taula 10). Els mètodes immunohistoquímics permeten una anàlisi més detallada de l'expressió de la proteïna GST π en un gran nombre de mostres de pacients, la qual cosa és útil per determinar si aquest gen pot ser un bon marcador de pronòstic en els pacients amb càncer de mama (195). Aquesta possibilitat va ser suggerida per un estudi previ que indicava que els nivells d'ARNm de GST π eren més alts en els tumors de mama receptor-estrogènics negatius, que en els positius (133).

Recents investigacions han portat a la comparació dels nivells d'expressió de

GST π entre diferents tipus de tumors humans, que s'ha vist que són molt més alts en càncer de pulmó o de cap i coll, que en els limfomes o en els càncers de mama. A més, comparant teixit tumoral amb teixit sa adjacent s'ha arribat a la conclusió que, en molts tipus de tumors, es troba una major expressió de GST π a la part tumoral que a la sana (134, 208).

Teixit	Estructures més reactives
Sistema urinari	
Ronyó	Nansa de Henle, túbul distal, tubs collectors
Urèter i bufeta de Porina	Epiteli, muscularis
Aparell digestiu	
Esòfag	Epiteli, glàndules submucoses
Estómac	Superfície epiteli i glàndules fúndiques
Duodè, jejú, còlon	Epiteli, criptes de Lieberkühn
Glàndules digestives	
Fetge	Ductes biliars
Bufeta de la fel	Epiteli, muscularis
Pàncreas	Ductes
Sistema respiratori	
Tràquea, bronquis	Epiteli, glàndules, cartílag
Pulmó	Epiteli alveolar
Aparell reproductor	
Úter	Epiteli cervical, epiteli i glàndules endometrials, miometri, epiteli tubàric, múscul llis
Ovari	Fol·licles, cèl.lules del córtex
Mama	Epitelis acinar i ductal
Placenta	Citotrofoblast
Testicle	Túbuls seminífers, epidídim, múscul llis
Pròstata	Epiteli glandular, múscul llis
Sistema endocrí	
Tiroides	Cèl.lules foliculars
Adrenal	Còrtex, medul·la
Sistema nerviós	
Cervell	Neurones, cèl.lules glials
Nervis perifèrics	Cèl.lules d'Schwann
Sistema vascular	
Cor	Miocardi
Vasos sanguinis	Endoteli, múscul llis
Altres	
Pell	Epidermis, glàndules sebàcies i de la suor
Ganglis limfàtics	Centres germinals

TAULA 10.- Detecció immunohistoquímica de la GST π en teixits humans normals (extret de la ref. 195).

INTRODUCCIÓ

Quant a la pell, s'han fet estudis d'ARNm de GST pi en mostres de pell i s'ha vist una expressió més alta que la que s'observa a placenta, però no es pot correlacionar amb el fet que es tracti de pell normal, hiperplàsia escamosa o lesió maligna (98).

Així, doncs, en la majoria dels tumors humans estudiats s'ha trobat un augment de la GST π , però no en tots. A més, l'expressió d'aquest isoenzim, estudiada per immunohistoquímica, pot variar dins d'un tipus concret de tumor, la qual cosa limita el seu ús com a marcador tumoral (30). I en canvi s'ha pogut observar que, així com l' α roman estable, l'isoenzim μ disminueix en alguns tumors (177).

D'altra banda, com ja hem comentat, la GST μ és molt eficient en la detoxificació de l'òxid trans-estilbè, que és un epòxid fortament mutagènic. Aproximadament un 50% de la població caucasiana és genèticament deficient en GST μ (211), havent-se indicat recentment que les diferències hereditàries en l'expressió d'aquest isoenzim es deuen a una delecció genètica (168, 45). Els individus deficientes en aquest tipus de GST, fumadors i amb nivell de cotinina alta, semblen tenir un alt risc de patir càncer pulmonar induït pel tabac (169); en un estudi posterior s'observa fins i tot, per la tècnica de les cromàtides germanes, una afectació de l'ADN superior en els individus fumadors amb dèficit de la GST μ (206). A més, els individus GST1 0 (no expressió d'isoenzim μ) tenen un risc 3 vegades superior als que sí expressen GST μ de desenvolupar un adenocarcinoma d'estómac o còlon (188, 37). Per aquest motiu, actualment s'estan posant a punt tècniques de PCR (protein chain reaction) per detectar els diferents fenotips responsables d'aquest polimorfisme (14).

8.- GSH

8.1.-Distribució

El glutatió (GSH) és el tripèptid γ -glutamilcisteïnilglicina, una de les molècules orgàniques petites més abundants a la natura. La majoria de les seves funcions biològiques depenen del grup tiol del residu de cisteïna (42).

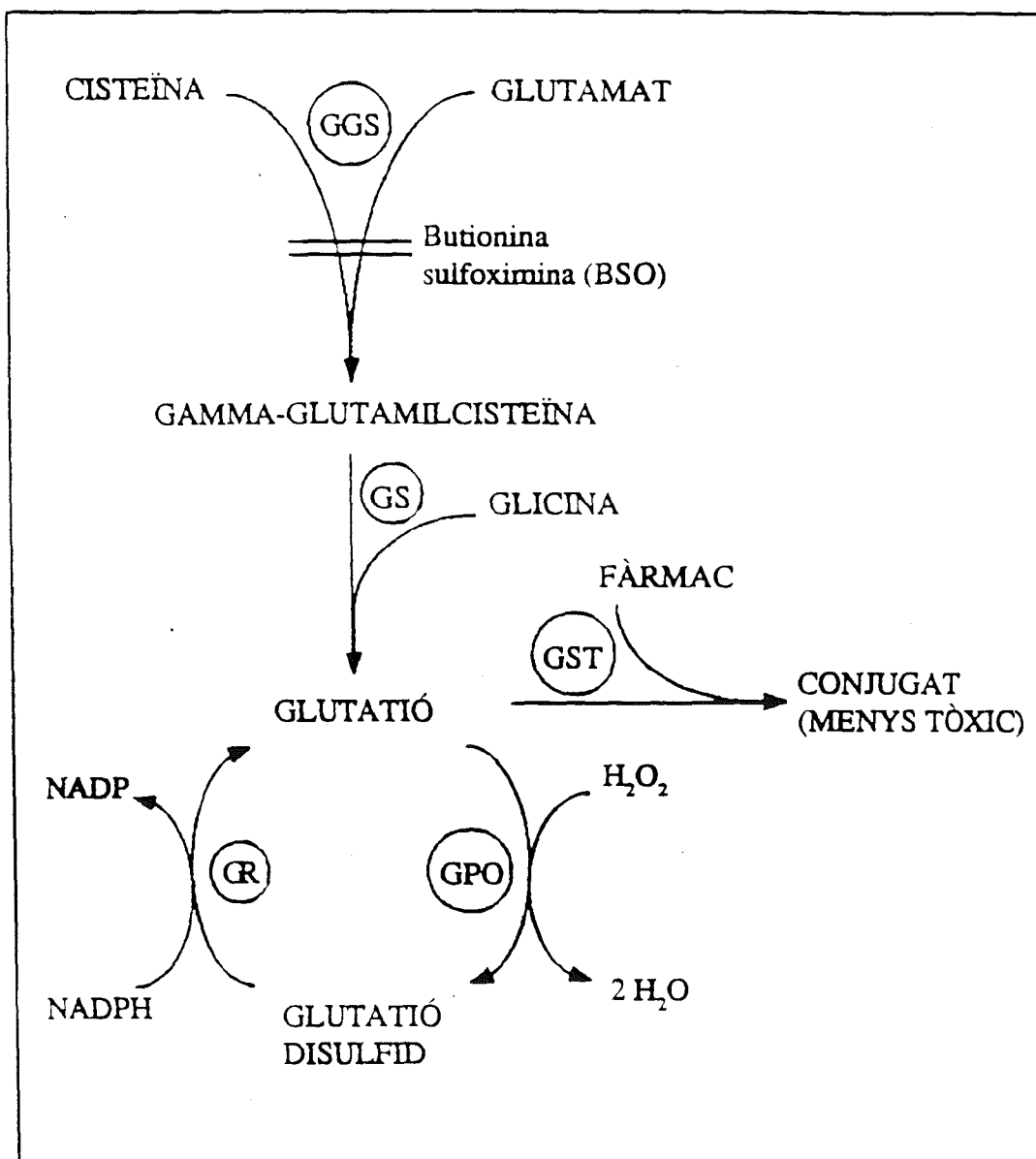
Gairebé tots els teixits contenen GSH, essent el fetge l'òrgan de biosíntesi principal d'aquest compost. Encara que molts teixits en tinguin, no està necessàriament present en totes les seves cèl·lules. Per exemple, en el cas del cervell el contingut de GSH és 1,5-2 mM, però estudis histoquímics mostren que en l'estroma neuronal no n'hi ha. Es creu que l'ascorbat dels astròcits cerebrals podria ser una alternativa per a la defensa antioxidant del citosol en els somes neuronals del sistema nerviós central. Aquest ascorbat contribuiria a la prevenció del dany que pot ser ocasionat, per exemple, pels radicals lliures durant una reperfusió postisquèmica (148).

8.2.-Biosíntesi i cicle redox

El GSH és sintetitzat *in vivo* al fetge, a partir de γ -glutamilcisteïna i glicina via GSH sintetasa (fig. 4).

La inhibició de la glutamilcisteïna sintetasa per butionina sulfoximina (BSO) donarà lloc a una disminució de la síntesi de GSH (120).

El GSH és manté en un cicle redox amb el GSSG dins la mitocòndria (fig. 5) i és regenerat per la GSH reductasa, un enzim citosòlic NADPH-dependent. La inhibició d'aquest enzim, i per tant de la regeneració del GSH, ocasionarà una deplecció intracel·lular del GSH. Això, per exemple, té lloc amb l'ús del quimioteràpic 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU) (160).



ENZIMS: GGS = *gamma-glutamilcisteïna sintetasa*
GS = *glutatió sintetasa*
GST = *glutatió S-transferasa*
GP = *glutatió peroxidasa*
GR = *glutatió reductasa*

Fig. 4.- Esquema d'algunes vies metabòliques on intervé el glutatió (extret de la ref. 120).

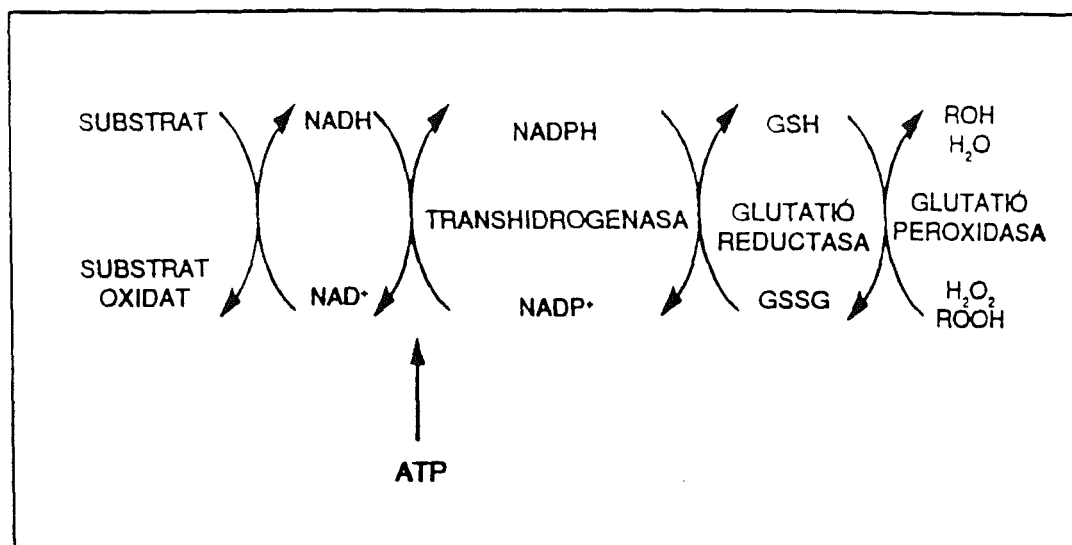


Fig. 5.- Sistema redox del glutatió present a la mitocòndria (extret de la ref. 160).

Les alteracions en el metabolisme de la glucosa per la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PDH) afectaran la disponibilitat de NADPH en els eritròcits, que no tenen mitocondries, i per tant limitarà l'activitat reductasa. Un dels defectes genètics amb més prevalença, la deficiència de G6PDH, s'associa amb hemòlisi crònica moderada i hemòlisi aguda severa en condicions d'estrès oxidatiu.

En treballs on s'estudiava la presència de productes de la lipoperoxidació en pell humana, s'ha vist que el malonaldehid s'uneix covalentment a la G6PDH modificant la seva estructura i afectant la seva activitat, ja que la unió és pròxima al lloc d'acció; per tant produeix una inhibició de l'activitat de l'enzim (122) i la conseqüent disminució del GSH.

Això demostra la importància del paper desenvolupat pel NADPH en el manteniment del glutatió en la seva forma reduïda (19, 48).

Quan augmenta l'estrès oxidatiu, la capacitat del sistema GSH peroxidasa/GSH reductasa pot ser superada i produir-se un acúmul intracel.lular de GSSG. Per mantenir l'estatus redox de la cèl.lula, el GSSG és transportat activament fora d'ella. Així, doncs, el nivell de GSSG plasmàtic pot ser considerat un bon índex de l'estrès oxidatiu intracel.lular (48).

La figura 6 recull el cicle del glutatió a l'interior de l'eritròcit i la seva relació amb el plasma.

8.3.-Funcions del GSH

El glutatió té funcions com reductor intracel.lular i juga un paper important en la catàlisi, metabolisme i transport. Així, protegeix les cèl.lules davant radicals lliures, espècies reactives de l'oxigen (ex. peròxids) i compostos tòxics d'origen endogen i exogen (123, 99). És, per tant, a més d'una bona defensa enfront

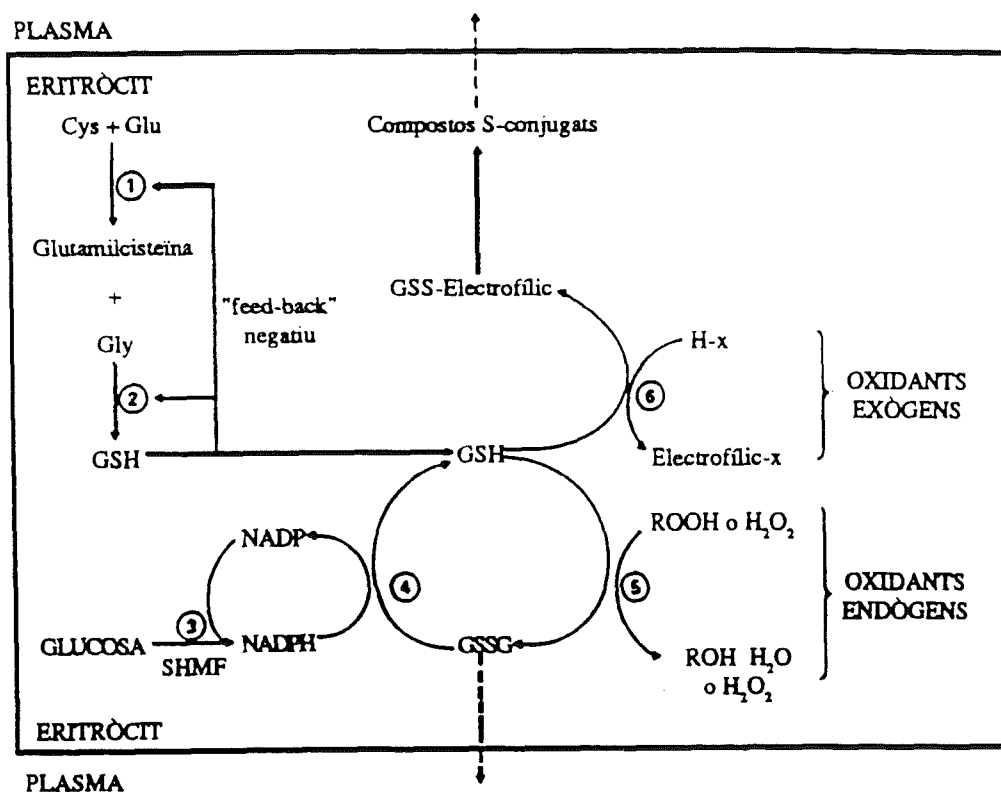


Fig. 6.- Cicle del GSH a l'eritròcit humà.

Cys: cisteïna; Glu: àcid glutàmic; Gly: glicina; GSH: glutatió reduït; GSSG: glutatió oxidat; 1: γ-glutamilcisteïna sintetasa; 2: glutatió sintetasa; 3: glucosa-6-fosfat deshidrogenasa; 4: glutatió reductasa; 5: glutatió peroxidasa; 6: glutatió S-transferasa; SHMF: shunt hexosa monofosfat (extret de la ref. 40).

xenobiòtics electrofílics i oxidants intracel·lulars, un regulador del potencial redox cel·lular.

El GSH i els compostos relacionats detoxifiquen una gran varietat de productes químics, incloent fàrmacs quimioteràpics. Alterant la quantitat o la reacció de qualsevol constituent dels passos metabòlics implicats, potencialment es pot influir en la resposta a fàrmacs (incloent ciclofosfamida, nitrosourees, melfalan, bleomicina) reduint els nivells de GSH *in vitro* i en models experimentals (120).

Les reaccions del cicle redox GSH-GSSG (veure figures 4 i 5) poden incloure radicals lliures, responsables parcialment de la toxicitat de molts fàrmacs quimioteràpics. L'increment d'activitat d'aquest cicle redox s'associarà amb la resistència inherent o adquirida als fàrmacs en les cèl·lules *in vitro*.

8.4.-GSH i patologia

Nombrosos estudis sobre l'activitat GST en diversos tipus de càncer han intentat també establir els possibles canvis en el contingut de GSH en el teixit tumoral. En el cas dels tumors de cèrvix i en els de cap-coll, s'ha vist que el contingut de GSH no és gaire alt i no superior al corresponent del teixit sa, encara que s'han trobat moltes variacions interindividuais (70).

En canvi, en línies cel·lulars de carcinoma pulmonar humà s'ha demostrat una disminució del contingut de GSH en els tumors de "cèl·lula petita", encara que curiosament no hi ha diferències en què les cèl·lules procedeixin de pacients tractats amb agents citotòxics que haurien d'interaccionar amb el GSH o que les cèl·lules procedeixin de malalts no tractats (33).

També existeix un augment del contingut de GSH en el carcinoma superficial transicional de bufeta de l'orina humana, alhora que s'hi detecta un augment d'activitat GST. El fet que s'incrementin ambdós paràmetres suggereix que el

INTRODUCCIÓ

patró de mutació podria afectar tots dos processos. Encara que no es trobi una correlació entre l'augment de GSH i l'activitat GST per a cada individu, això seria lògic si pensem que cada genoma pot ser influenciat de manera diferent durant el procés de mutació. Aquesta manca de correlació ja havia estat observada per Whyte i col. (210) en diverses espècies animals. D'altra banda, no es va trobar diferència entre el GSH dels teixits d'individus sans i el de teixit sa adjacent al tumoral, suggerint que en aquest cas el GSH no tindria influència en el desenvolupament del tumor (101).

Molts quimioteràpics semblen ser detoxificats pel GSH. Per tant, la disminució del GSH cel.lular en tumors podria augmentar l'eficàcia de la teràpia emprada en el càncer. Per aquest motiu, s'estan portant a terme investigacions sobre l'ús clínic de la BSO com a complement de la quimioteràpia en tumors malignes humans (48).

El GSH reduït juga un paper en la protecció de cèlules contra el dany per radicals lliures i altres electrofílics, influència de la radiosensibilitat cel.lular, resposta cel.lular a la hipertèrmia i citotoxicitat d'alguns agents quimioteràpics (99).

S'ha suggerit que les complicacions més significatives de la Diabetis Mellitus, com són polineuritis, retinopatia, microangiopatia i úlceres perforants, poden dependre d'una excessiva producció de radicals lliures d'oxigen (increment de lipoperoxidació amb un augment de formació de malondialdehid) i una deplecció del glutatió enmagatzemat en eritròcits (68). Aquest fet també es pot observar en eritròcits de nens urèmics sotmesos a hemodiàlisi (199).

Així, s'ha examinat la correlació entre el contingut de GSH cel.lular i la sensibilitat de les cèl.lules humanes de pell (fibroblasts i queratinòcits) a les radiacions. Utilitzant BSO com a deplector dels nivells de GSH, s'ha pogut posar de manifest que els tiols endògens estan directament involucrats en la

protecció de les cèl.lules davant el dany de les radiacions, ja que en nivells baixos de GSH mostren una major afectació. *In vivo* es troba dues vegades més GSH en epidermis que en la dermis, factor important per a la protecció davant les radiacions UVA i UVB (200).

8.5.-Altres funcions del GSH

Una altra important funció del GSH és la de participar en l'ensamblatge dels microtúbuls del citoesquelet, mecanisme que requereix de la presència de grups sulfhidril reduïts. Per tant, el GSH estarà implicat en la regulació de la dinàmica i l'estabilitat de la xarxa de microtúbuls *in vivo*. En aquest sentit, s'han fet estudis tractant cèl.lules amb CDNB, que provoca un desensamblatge dels microtúbuls per deplecció del GSH cel.lular, probablement perquè el GSH es deu unir a la tubulina o qualsevol altre component dels microtúbuls. Aquest desensamblatge és en realitat reversible, ja que una exposició cel.lular més perllongada al CDNB, encara que consumeix el GSH existent, provoca un augment dels nivells basals de GSH, probablement perquè la seva deplecció inicial té un efecte de *feed-back* sobre l'enzim γ -glutamylcisteïna sintetasa, que intervé en la biosíntesi del GSH. En canvi, si les cèl.lules es tracten amb CDNB més BSO, el desensamblatge ja no és reversible, ja que s'haurà depleccionat totalment el GSH cel.lular i s'haurà inhibit l'enzim abans esmentat (106).

El glutatió reduït té un paper clau en la defensa contra l'estrès oxidatiu. Una de les situacions en les que intervé com a compost protector és en la peroxidació lipídica, reduint les formes oxidades (radicalars) de la vitamina E. La regeneració d'aquesta vitamina a partir dels seus radicals és catalitzada per una reductasa de membrana glutatió-depenent. S'han fet estudis que demostren que la combinació de glutatió oxidat (GSSG) i àcid lipoic protegeix contra la peroxidació lipídica microsomal hepàtica, via formació de GSH (12). Això tindria importància en aquelles patologies -cirrosi hepàtica, diabetis mellitus, arteriosclerosi, polineuritis- on s'ha trobat una disminució de l'àcid lipoic

INTRODUCCIÓ

endogen. S'ha suggerit que la peroxidació de la membrana cel·lular mitjançant radicals lliures seria un pas comú en l'etiologia d'aquestes patologies (12).

La importància del GSH intracel·lular com a protector del dany oxidatiu s'ha demostrat a través de les conseqüències observades en casos de dèficit per alteracions congènites del seu metabolisme. Per exemple, els malalts amb deficiència de γ -glutamilcisteïna sintetasa i GSH sintetasa, tenen nivells de GSH intracel·lular marcadament disminuïts. Aquests pacients presenten episodis d'anèmia hemolítica a causa de l'estrès oxidatiu, fet que demostra el paper antioxidant del GSH (48).

Recents evidències suggereixen que els pacients amb síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA) són GSH-deficients, principalment en plasma, epitelí pulmonar i limfòcits T. Seria interessant considerar l'impacte d'aquest dèficit adquirit de GSH sobre les disfuncions immunològiques i cerebrals d'aquests malalts. Aquest dèficit pot fins i tot potenciar la replicació del virus, ja que s'ha vist que es multiplica més fàcilment en les cèl·lules deficitàries amb GSH (85, 179).

Alguns estudis fets en rates indiquen que la concentració de GSH hepàtic respon a la quantitat de proteïnes de la dieta, a causa del contingut dels sulfurs dels aminoàcids. Malgrat això, ni l'excés de proteïnes ni l'excés de sulfurs poden augmentar la concentració de GSH per sobre de la concentració trobada quan l'animal és alimentat amb una dieta amb contingut proteic adient. Les proteïnes de la dieta i els sulfurs dels aminoàcids afectarien l'activitat dels enzims GSH-dependents, però la limitada disponibilitat del substrat, GSH, en animals alimentats amb dietes baixes en contingut proteic podria reduir la capacitat de detoxificació de molts compostos xenobiòtics (13).

Tanmateix, en estudis realitzats en ratolins als quals primerament se'ls produïa una deplecció del GSH amb BSO, el GSH augmentava quan aquest

INTRODUCCIÓ

s'administrava oralment; per tant, el GSH oral pot incrementar la concentració de GSH en diferents teixits després d'una disminució de GSH, tal com pot passar en situacions patològiques o toxicològiques en les quals l'homeostasi del GSH és compromesa. Situacions patològiques que poden presentar GSH disminuït, a part de les ja comentades, són: a) dany oxidatiu en el pulmó secundari a la tensió d'oxigen, fumar cigarretes o atmosfera pol.lucionada; b) dany oxidatiu en la pell com a conseqüència de radiacions ultraviolades; c) dany en el cor i pulmó per teràpia antitumoral; d) dany en el ronyó i budell prim com a conseqüència de la reperfusió després d'una isquèmia (7).

El GSH ha estat també relacionat amb el procés de l'envelliment, a causa principalment del seu paper en la protecció cel.lular. En ratolins d'edat avançada, s'ha demostrat que la dieta rica en proteïnes de la llet provoca un increment de la concentració de GSH al fetge i al cor i també un augment de la longevitat (23).

Recents investigacions sobre el nivell de GSH i GSSG en plasma i eritròcits de pacients diabètics han mostrat que el GSSG plasmàtic està augmentat en diabètics respecte als individus controls, essent això degut a una manca de conversió de GSSG a GSH dins l'eritròcit, probablement per la disminució de l'activitat de l'enzim glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PDH) que s'ha observat en els diabètics. La G6PDH donaria lloc a poca quantitat de NADPH, la qual cosa afectaria l'enzim glutatió reductasa i la integritat de tot el sistema glutatió (40, 63, 180) (figura 6).

També s'ha suggerit que els sistemes antioxidants de l'eritròcit, entre els que s'hi troben el GSH, la catalasa i d'altres, podrien ser un factor important en la prevenció de la inactivació oxidativa de l'alfa₁-antitripsina provocada pel fum del tabac (111).

En cervell de rata femella també s'ha estudiat el contingut de GSH, que

disminueix significativament després de l'administració intraventricular de LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone), alhora que es produeix un increment de l'activitat τ -glutamil transpeptidasa. Tot això ha suggerit que podria existir una interacció entre el GSH i els pèptids hipotalàmics (146).

9.- Pell. Glàndula sebàcia

La pell és exposada constantment a nombrosos compostos químics del medi ambient. És la major porta d'entrada d'aquests i altres xenobiòtics en el cos, i és el blanc per a l'acció tòxica d'alguns xenobiòtics, especialment hidrocarburs aromàtics policíclics i altres procarcinògens, els quals són transformats allí en metabòlits reactius. Si bé freqüentment s'ha considerat com una barrera passiva, la pell té capacitat de metabolitzar substàncies endògenes, així com fàrmacs i altres compostos químics exògens.

La pell és un teixit relativament heterogeni format per dues capes: l'epidermis, que és una capa epitelial estratificada, escamosa i queratinitzada, i la dermis, que és una capa densa de teixit connectiu que conté vasos sanguinis, nervis, fol·licles pilosos i glàndules sebàcies (9).

Diverses patologies de la pell -entre elles l'acne, l'alopecía masculina i l'hirsutisme idiopàtic- s'ha demostrat que són androgen-depenents. Des de fa més de 30 anys se sap que la pell humana pot metabolitzar la testosterona, encara que primerament no s'havien establert els metabòlits que en deriven.

Més endavant es va demostrar que la testosterona és metabolitzada per la pell de la glàndula mamària masculina en diversos productes, incloent 5α -androstano- 3α -ol-17-ona, 5α -androstano-3,17-diona, Δ^4 -androstano-3,17-diona-3 i Δ^4 - 5β -androstano- 3α -ol-17-ona.

La principal característica diferencial entre el metabolisme dels esteroides a la

pell i al fetge és la reducció estéreo-específica a la posició C₅. En el cas del fetge, aproximadament un 50 % dels productes de la reacció són metabòlits 5 α , mentre que el 50 % restant són 5 β , sobretot en el cas dels esteroides de 19 carbonis, com és el cas de la testosterona. En canvi, pràcticament tots els estudis sobre biotransformació a la pell d'hormones esteroïdals sexuals indiquen que en aquest cas només es formen metabòlits 5 β . Tanmateix, han estat detectat metabòlits 5 β en un "quist sebaci" incubat *in vitro* amb precursors hormonals marcats amb isòtops radiactius.

És ben conegut que la testosterona i la Δ^4 -androstenediona es formen a la pell humana a partir de la dehidroepiandrosterona. La Δ^5 -androstano-3 β ,17 β -diol, la Δ^4 -androstenediona, la testosterona i el sulfat de dehidroepiandrosterona es formen a partir de la dehidroepiandrosterona quan aquesta s'incuba *in vitro* amb pell humana masculina. De fet, s'ha demostrat formació de metabòlits esteroïdals hidrosolubles tant en pell humana masculina com femenina.

La pell humana té activitat Δ^4 -5 α -esteroide reductasa per a la testosterona i la Δ^4 -androstenediona, i en el cas dels microsomes aquesta activitat s'accelera amb NADPH.

També s'ha demostrat l'existència, a la fracció citosòlica de la pell, de proteïnes de transport per a la testosterona, dihidrotestosterona, 17 β -estradiol i progesterona. Curiosament, aquest transport varia en funció de la fase del cicle de creixement en què es trobi el cabell. Això suggereix que el metabolisme d'hormones esteroïdals a la pell pot ser un factor important en el cicle del cabell i en el patró del seu creixement (136).

9.1.- Glàndula sebàcia

És una formació annexa al fol·licle pilós, resultat d'una invaginació d'aquest. És

INTRODUCCIÓ

una glàndula lobulada que desemboca en la porció terminal del fol·licle, i està situada entre aquest i el múscul erector del pèl. Existeix únicament en mamífers.

Es troba en totes les àrees de la pell, excepte palmes de les mans i plantes i dors dels peus. El seu tamany i nombre varia d'una zona a l'altra. Les glàndules més grans es troben generalment a la cara i el cuir pilós.

La glàndula sebàcia és una glàndula holocrina, la secreció de la qual està formada per la desintegració completa de les cèl·lules glandulars.

El seu sèu és una barreja complexa de lípids. La seva composició es difícil d'estudiar, ja que el material glandular pur és difícil d'obtenir. Per això, quasi totes les anàlisis s'han fet amb lípids sebàcics i epidèrmics. S'han identificat en els lípids superficials: àcids grassos lliures, triglicèrids, diglicèrids, monoglicèrids, ésters de la cera, ésters del colesterol, escualè i parafines. La parafina és, probablement, d'origen exogen, mentre que l'escualè i els ésters de la cera deriven únicament de les glàndules sebàcies.

Les glàndules sebàcies experimenten canvis en el seu desenvolupament i activitat, com a resultat dels canvis endocrins.

En l'home, les glàndules sebàcies de la cara són moderadament grans en néixer, però es tornen petites i indiferenciades en la infància. En la pubertat, les glàndules sebàcies tornen a créixer, produint gran quantitat de sèu en homes i dones. Generalment a la dona declina l'activitat després de la menopausa, mentre que a l'home persisteix sense canvis fins als 70 anys (152, 191).

Els canvis que es produeixen en la glàndula sebàcia, en relació a l'edat i el sexe, estan influenciades i modulades per diferents hormones. Les hormones "sebotròfiques" més importants són els andrògens, tant els d'origen gonadal i adrenal en la dona, com els d'origen gonadal en l'home. L'acció concreta dels

INTRODUCCIÓ

andrògens en la glàndula sebàcia s'ha demostrat en molts estudis realitzats tant en animals com en l'home: l'activitat de la glàndula sebàcia està estimulada pels andrògens. Els andrògens incrementen el tamany de les glàndules sebàcies en rata (58, 57) i ratolí (103). Estudis de l'acció de la testosterona en rata, mostren que estimula la divisió cel·lular i que augmenta el tamany de les cèl·lules, així com la producció de sèu (6, 59, 60).

L'administració de testosterona augmenta el tamany de les glàndules sebàcies i la producció de sèu en nens prepuberals, però no en varons adults, on les glàndules sebàcies semblen estar sota l'estimulació màxima per andrògens endògens (77, 190). L'augment de tamany de glàndules sebàcies localitzades ha estat induït per aplicacions tòpiques de testosterona, indicant que els andrògens actuen directament sobre el teixit diana (78, 151). En l'home, la testosterona injectada intradèrmicament produeix augment de la lipogènesi sebàcia quan la secreció sebàcia està disminuïda, mentre que disminueix la lipogènesi quan aquesta última està augmentada.

La dihidrotestosterona (DHT) actua molt dèbilment a la glàndula sebàcia humana, i la seva formació a partir de testosterona pot produir inhibició de la secreció sebàcia per competició.

Els estrògens redueixen l'activitat sebàcia. El tamany de la cèl·lula disminueix quan s'administra oralment a homes adults (191). Pel que sembla, actuen independentment dels andrògens en el lloc perifèric i independentment de l'existència de glàndules secretores d'andrògens.

Donat que el nostre estudi s'ha centrat en individus afectes d'alopecïa seborreica, serà necessari fer una petita ressenya d'aquesta patologia.

La patogènia d'aquesta forma d'alopecïa es relaciona amb l'edat, el quadre genètic i les hormones andrògenes. L'afectació mai es produeix en nens

INTRODUCCIÓ

prepuberals normals, però quan s'arriba a la maduresa sexual es fa evident el procés d'envelliment amb progressiva pèrdua de cabell. Tanmateix, l'etiologia de l'alopecia segueix essent un misteri, ja que aquells que l'atribueixen a defectes endocrins han hagut d'acceptar el seu error, a causa de l'èxit demostrat dels autotrasplantaments de cuir pilós. Tothom sembla estar d'acord amb Hamilton (79) en què un cert nivell d'andrògens és necessari per desenvolupar l'alopecia, però com es desenvolupa ningú ho sap.

Quan es produeix calvície de tipus masculí en l'home adult, la castració atura la progressió, i l'administració de testosterona proporciona una nova pèrdua de cabell. Sembla ser que existeix una relació directa entre el metabolisme dels andrògens i el desenvolupament capilar. No obstant, en aquest sentit una de les paradoxes és que quan la producció de testosterona és massiva, el cuir pilós perd el seu cabell, però tant el pèl del pit com el de la barba, fosses nasals i conductes auditius té un creixement estimulat.

En diferents estudis sobre la patogènesi de l'alopecia seborreica s'ha dit que en la glàndula sebàcia el primer pas seria un augment de la captació de la testosterona, seguit d'un augment de la biotransformació de la testosterona a DHT, que a la vegada es metabolitzarà a 3β -androstanodiol (3β -Adiol). El 3β -Adiol augmentarà la secreció sebàcia, i aquest augment estarà afavorit per la disminució de 17β -HDOR, fre fisiològic de la secreció. Això provocaria la hipertròfia de la glàndula sebàcia (fig. 7), que seria la responsable de l'atròfia del fol·licle pilós, no tan sols per impediment mecànic, sinó també per la presència d'un excés de lípids, que podria contribuir impedit el normal desenvolupament dels fol·licles (155).

S'ha demostrat en el metabolisme dels esteroides la formació de substàncies intermèdies amb poder electrofílic, com són els androstenotriols, i per tant molt agressives per a les nostres macromolècules (127, 140). Generalment, aquests processos són tamponats pels sistemes neutralizants que hem descrit de

INTRODUCCIÓ

protecció davant els RLLO; l'excés de metabòlits reactius d'estradiol i testosterona no pot ser degudament controlat i apareixen processos degeneratius o tòxics en determinats òrgans. Tenim exemples en els càncers de mama, de pròstata, en els adenomes benignes de pròstata, en la hipertròfia sebàcia, etc., situacions molt conegudes des de fa anys, però en les quals l'estudi des del punt de vista dels RLLO és relativament recent i encara molt incomplet.

INTRODUCCIÓ

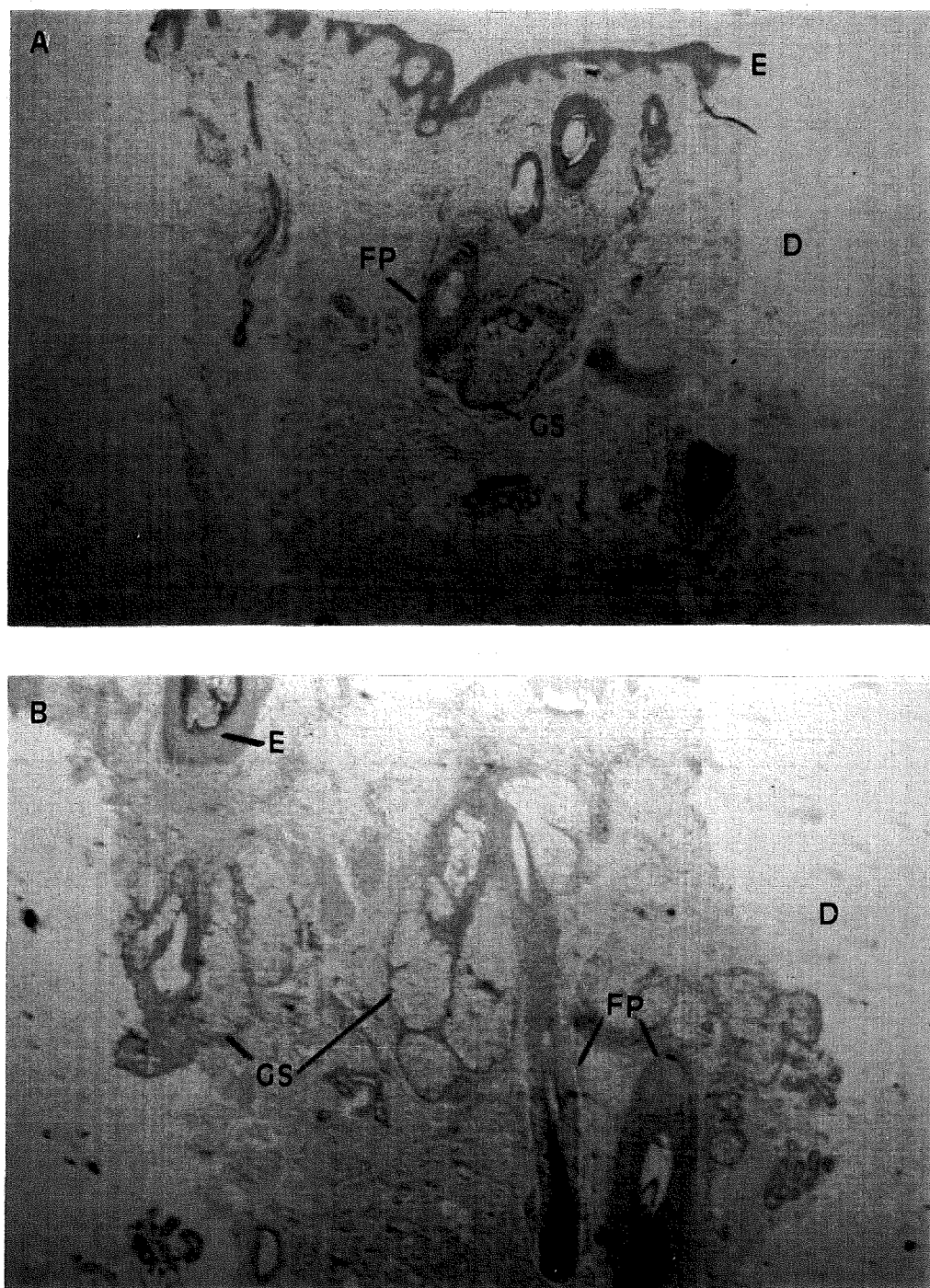


Fig. 7.- Estructura de la pell. A: zona no alopèica d'home, B: zona alopèica d'home.
E: epidermis; D: dermis; GS: glàndula sebàcia; FP: fol.licle pilós (x 40).

II.- HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

II.- HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

La font de radicals lliures en el nostre organisme és múltiple; per això existeixen mecanismes de defensa per tal de poder eliminar-los i evitar la patologia. Un d'aquests mecanismes és el sistema GST/GSH, present en molts òrgans i teixits.

Com hem vist a la introducció, la pell és un teixit amb poc contingut de GST. En conseqüència, podem acceptar que la seva capacitat de defensa enfront dels RLL serà baixa. En aquest sentit, l'estudi de la GST cutània és un tema interessant per tal de poder conèixer millor l'expressió dels isoenzims de la GST i el seu paper en el metabolisme de substrats fisiològics i xenobiòtics, tal com s'ha fet en altres patologies com el càncer de pell i altres processos.

Molt poc o res se sap de la GST en els annexos cutanis, tot i que en determinades situacions aquests annexos tenen un paper important. En el cas de l'alopecia androgenètica, es produeix una hipertròfia sebàcia, amb una formació excessiva de lípids i β -androstenediols que produeixen un augment de RLL en ser transformats en triols com a metabòlits finals. La lipoperoxidació que s'origina té efectes tòxics per al fol·licle pilós. Per tant, considerem que la GST tindrà un paper important en la protecció enfront d'aquests agents electrofílics.

Un desequilibri en el sistema GST/GSH i/o un excés de RLL procedents dels esteroides podria ser la causa de l'alopecia androgenètica. Si això fos així, l'adopció de mesures terapèutiques encaminades a prevenir la formació de RLL dels andrògens i l'aplicació de substàncies antiradicalars haurien de contribuir a millorar el quadre clínic de l'alopecia seborreica.

HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

Per confirmar aquesta hipòtesi, ens hem plantejat els següents objectius:

1r. OBJECTIU. Estudiar la distribució i característiques de la GST en pell de cuir pilós, comparativament en zones afectades d'alopecía seborreica i zones normals de varons, i en zones normals de dones.

2n. OBJECTIU. Conèixer quin és el contingut de GSH, tant en teixit sa com patològic, donada la importància d'aquest tripèptid en molts dels sistemes de defensa.

3r. OBJECTIU. Analitzar els efectes dels andrògens i els seus metabòlits sobre l'enzim GST.

4t. OBJECTIU. Estudiar el contingut de RLL i lípids d'aquesta zona en cada grup d'individus estudiats.

III.- MATERIAL I MÈTODES

III.- MATERIAL I MÈTODES

Els diferents apartats de "Material i Mètodes" estan dividits en subapartats referents a l'estudi fet en humans i rates, segons correspongui, ja que prèviament al treball fet en mostres humanes, es van realitzar estudis en fetge de rata per tal de poder posar a punt les diferents tècniques.

1.- Animals d'experimentació

S'han fet servir per a aquest estudi rates mascle Sprague-Dawley d'un pes aproximat de 300 g sotmeses a un període inicial d'adaptació de 2 setmanes a les condicions ambientals de llum (12 hores/dia), temperatura (22°C), humitat (60-80%), alimentació (Panlab Laboratory Rodent Chow) i aigua *ad libitum*.

2.- Obtenció de mostres

2.1.- Obtenció de mostres de rata

Les rates es van anestesiar per via inhalatòria amb éter etílic i es van decapitar per tal de poder fer una exanguinació i extreure el màxim volum de sang del cos, a fi d'evitar les possibles interferències produïdes per la GST eritrocitària. A través d'una laparotomia mitja es va treure el fetge, que a continuació va ser rentat amb sèrum fisiològic.

2.2.- Obtenció de mostres humanes

Per treballar en teixit humà hem obtingut mostres de diferents zones de cuir pilós d'individus d'ambdós sexes.

Les mostres de pell de dones (zona no alopecica) s'han obtingut de dones sotmeses a cirurgia estètica, i corresponen a zona de cuir pilós retroauricular.

Respecte a les mostres de pell d'homes, per raons deontològiques ha estat difícil obtenir mostres de zona normal, ja que procedien o de les zones donadores dels individus sotmesos a autotrasplantaments (totes elles utilitzades per a estudis d'activitat enzimàtica), o en últim cas d'autòpsies.

Les mostres dels autotrasplantaments (zona alopecica d'home) es van obtenir mitjançant un trócar d'Orentreich de 4,5 mm, després de practicar un rentat i rasurat de la zona i d'haver administrat anestèsia local i adrenalina.

Aquestes mostres s'han dividit en grups segons l'estudi posterior a realitzar:

- estudi de l'activitat GST;
- estudi de purificació de l'enzim mitjançant cromatoenfoc;
- contingut de GSH; i
- anàlisi de RLL i lípids.

3.- Conservació de les mostres

Posteriorment a la seva extracció, totes les mostres humanes van ser conservades, amb o sense sèrum fisiològic, a -20°C o -80°C, segons fos necessari pels estudis a realitzar.

4.- Dissecció de les mostres

Inicialment, les mostres humanes van ser separades en diferents parts per tal de delimitar la zona d'activitat enzimàtica. Així, doncs, sota lupa binocular (x 40), es van dissecar l'epiteli o estrat corni, el teixit adipós subcutani, la zona subepitelial que contenia la glàndula sebàcia o dermis, i la glàndula sebàcia pròpiament dita. Després de l'estudi de l'activitat GST d'aquestes parts, es va decidir separar totes les mostres humanes agafant tan sols la dermis que contenia la glàndula sebàcia, descartant l'epiteli i el teixit adipós (fig. 8).

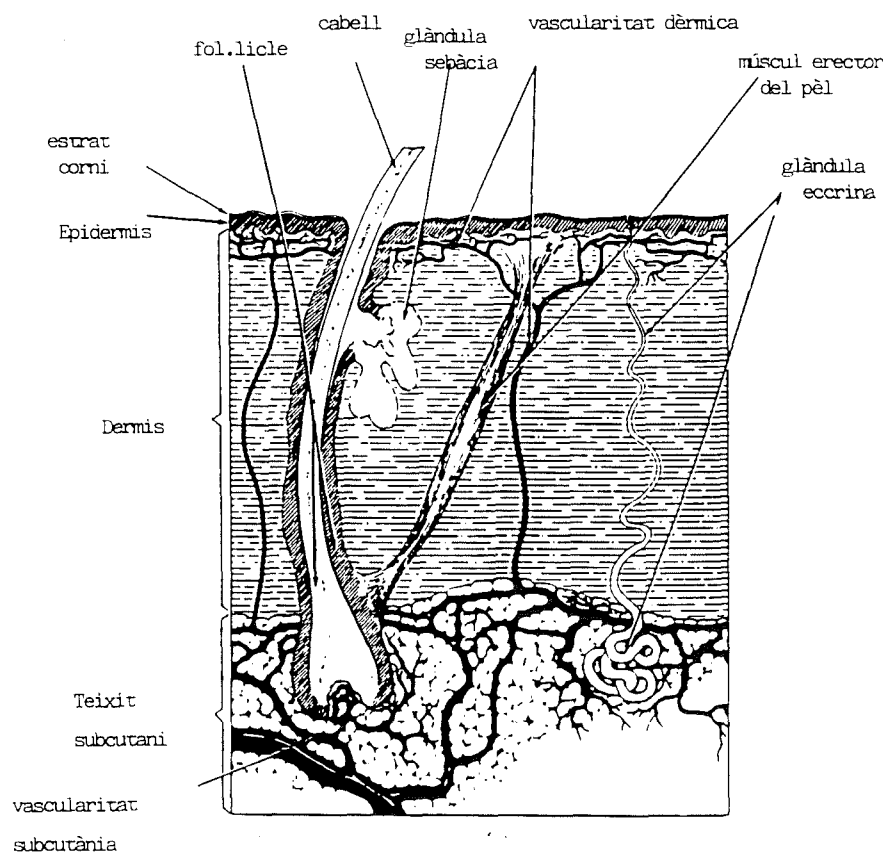


Fig. 8.- Principals estructures de la pell.

5.- Preparació de les mostres de citosol

5.1.- Mostres de rates

Les mostres van ser trossejades acuradament amb tisora i homogenitzades amb un homogenitzador Polytron (Kinematica, Lucerne, Switzerland) durant 2 minuts amb tampó fosfat sòdic 200 mM pH 6,25 en proporció 1:20 (p/v) i a una velocitat baixa (posició 3-4), sempre sobre gel.

Els homogenitzats van ser centrifugats a 20.000 x g durant 20 minuts, i el sobrenedant resultant a 100.000 x g durant 1 hora en una ultracentrífuga Kontron T1045 (Kontron Instruments, Milan, Italy).

El citosol obtingut es va emmagatzemar en petites alíquotes a -80°C, o bé va ser liofilitzat fins al moment de procedir a la determinació de l'activitat GST.

5.2.- Mostres humanes

Les mostres ja separades van ser trossejades i homogenitzades, com s'ha indicat a l'apartat anterior, amb tampó fosfat sòdic 200 mM pH 6,25, però en proporció 1:10 (p/v) i a una velocitat més alta (posició 6-7) que en el cas de les mostres de rata, donada la duresa del teixit.

Aquestes condicions van ser les utilitzades en el cas de l'estudi de l'activitat GST utilitzant com a substrat CDNB.

Per a l'estudi de l'activitat isomerasa, l'homogenitzat es va fer amb tampó tris/fosfat potàssic 25 mM pH 8,5.

I en els estudis de purificació es van emprar diferents tampons per homogenitzar, segons el tipus de columna de cromatografia a utilitzar, que ja

MATERIAL I MÈTODES

s'especificaran quan s'expliqui el mètode de cada una d'elles.

6.- Estudi enzimàtic de la GST

6.1.- Activitat GST utilitzant com a substrat CDNB.

Per analitzar l'activitat GST es va emprar com a substrat l'1-cloro-2,4-dinitrobenzè (CDNB), seguint el mètode descrit per Habig i col. (74). La cubeta de la reacció, amb un volum final d'1 o 3 ml, contenia tampó fosfat sòdic 200 mM pH 6,25, CDNB a diferents concentracions (0,07 - 2 mM) i GSH (2 mM). La reacció tenia lloc a 25°C i s'iniciava, després d'una incubació d'5 minuts, en afegir el substrat electrofílic CDNB.

L'increment de l'activitat es va monitoritzar espectrofotomètricament a 340 nm (coeficient d'extinció molar = $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La correcció per la reacció no enzimàtica es va fer restant l'increment obtingut en absència del citosol.

L'activitat enzimàtica es va expressar com la quantitat d'enzim necessària per catalitzar la formació d'1 nmol de producte/min a 25°C per mil·lígram de proteïna o per gram de teixit.

L'estudi cinètic va seguir els requeriments descrits per Habig i col. (74), és a dir, linealitat durant 5 minuts, saturabilitat a altes concentracions del substrat i linealitat en totes les concentracions proteiques utilitzades.

L'anàlisi enzimàtica feta variant les concentracions de CDNB i amb una concentració de GSH fixa, com hem especificat abans, ens va permetre obtenir els valors de K_m i V_{max} , que van ser calculats a partir de la típica representació de Lineweaver-Burk (fig. 9).

MATERIAL I MÈTODES

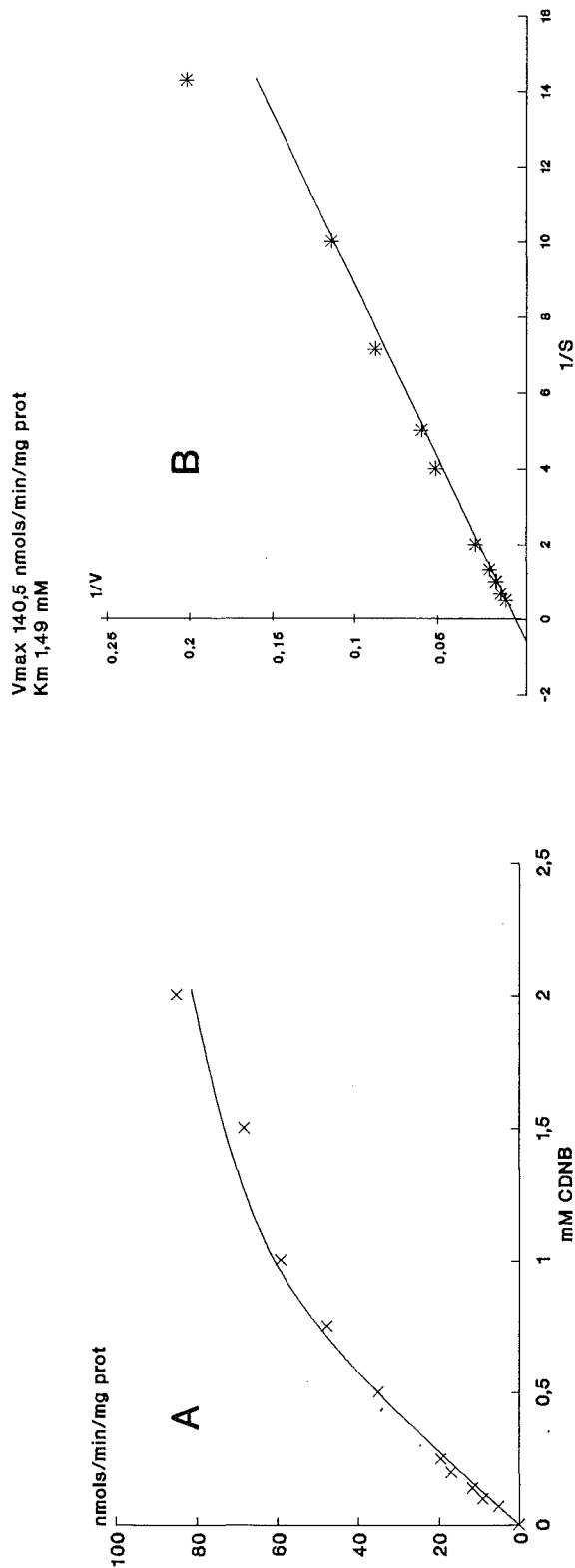


Fig. 9.- Estudi enzimàtic de la GST. A: nmols de producte formats per minut i per mg de proteïna, en funció de la concentració del substrat CDNB. B: representació de Lineweaver-Burk (S= concentració mM de CDNB; V= velocitat en nmols/min/mg proteïna).

6.2.- Activitat isomerasa de la GST.

Per estudiar l'activitat isomerasa es va utilitzar com a substrat Δ^5 -androsten-3,17-diona, seguint el mètode descrit per Benson i col. (15). La cubeta de la reacció, amb un volum final de 3 ml, contenia també tris/fosfat potàssic 25 mM pH 8,5, GSH (100 μ M), dithiothreitol (100 μ M) i 20 μ l delta- 5 -androsten-3,17-diona (metanol) a concentracions variables (15 μ M a 100 μ M). La reacció tenia lloc a 25°C i s'iniciava després d'afegir l'enzim (citosol).

L'increment de l'activitat es va monitoritzar espectrofotomètricament a 248 nm (coeficient d'extinció molar = 16,3 mM⁻¹ cm⁻¹). La correcció per la reacció no enzimàtica es va fer restant l'increment obtingut en absència de l'esteroides.

L'activitat enzimàtica es va expressar com la quantitat d'enzim necessària per causar la isomerització d'1 nmol de producte/min a 25°C per mil·lígram de proteïna o per gram de teixit.

L'estudi cinètic presentava linealitat durant 3 minuts, així com linealitat en totes les concentracions proteïques utilitzades.

6.3.- Estudi d'inhibició de l'activitat GST amb esteroides.

Per realitzar aquest estudi, a la cubeta de la reacció es va afegir, a part dels reactius indicats per a l'estudi de l'activitat GST amb CDNB (veure apartat 6.1), diferents tipus d'esteroides a concentracions de 0,1 a 0,75-1 mM segons la seva solubilitat. La reacció s'iniciava en el moment d'afegir el compost electrofílic CDNB i l'esteroides. També es va fer l'estudi incubant els esteroides junt amb l'enzim i el GSH durant 5 minuts i desencadenant la reacció només amb el CDNB.

MATERIAL I MÈTODES

Els esteroides que es van utilitzar són: testosterona, 5α androstano-3,17 diona o androstanodiona, 4-androsteno 3,17 diona o androstenodiona, 5α -androstandio-17 β -ol-3-ona o dihidrotestosterona, 5α androstano-3 β ,17 β -diol i 5α androstano-3 α ,17 β -diol.

L'estudi realitzat variant les concentracions d'esteroides ens va permetre trobar la K_i per mitjà de la representació de Lineweaver-Burk.

7.- Anàlisi del GSH

Es varen emmagatzemar alíquotes de citosol a -20°C , per determinar el contingut de GSH mitjançant una reacció d'Ellman (62).

La reacció d'Ellman s'utilitza per a l'anàlisi dels grups -SH i consisteix a valorar la intensitat de color groc que es forma quan reaccionen els grups -SH lliures amb l'àcid di-tio-bis-nitro-benzoic (DTNB). El color és valorat espectrofotomètricament en absorbàncies, a una longitud d'ona de 412 nm. La cubeta de la reacció conté 2 ml de tampó fosfat Sorensen 0,5 M pH 7,1, 0,25 ml de mostra (o aigua destil·lada, en el cas dels blancs de referència) i 0,30 ml de solució de DTNB (0,4 mg DTNB/ml de solució de citrat sòdic a l'1%).

Es va emprar GSH (Merck) com a estàndard.

8.- Determinació de proteïnes

Es van emmagatzemar, també a -20°C , alíquotes de citosol per determinar les proteïnes pel mètode de Lowry (109). Es va utilitzar com a estàndard seroalbúmina humana.

9.- Purificació de l'enzim

9.1.- Cromatografia d'intercanvi iònic

La cromatografia d'intercanvi iònic és una tècnica de separació de proteïnes en la qual s'utilitza una matriu insoluble amb grups amb càrregues unides covalentment. Aquests grups estàtics o fixos estan associats a ions de signe contrari mòbils, els quals poden ser intercanviats reversiblement amb altres ions de la mateixa càrrega sense alterar la matriu.

Així, doncs, en aquells casos en què la matriu estigui unida a intercanviadors aniònics aconseguirem unir a la matriu proteïnes aniòniques -és a dir, amb pI àcid- i per tant aïllar les proteïnes àcides. En cas contrari, quan la matriu va unida a intercanviadors catiònics, les proteïnes que se separaran seran bàsiques, és a dir, catiòniques.

En el nostre cas hem utilitzat dos tipus de matriu per determinar la característica àcida o bàsica de l'enzim:

DEAE Sephacel (Pharmacia LKB): matriu amb radical positiu on l'intercanviador (diaminoetil, DEAE) és aniònic i, per tant, ens separa proteïnes aniòniques, amb pI àcid.

CM Sephadex C-50 (Pharmacia LKB): matriu amb radical negatiu on l'intercanviador (carboximetil, CM) és catiònic, separant per tant proteïnes catiòniques, de pI bàsic.

Per a la columna de DEAE Sephacel, les mostres es van homogenitzar amb tampó tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM i mercaptoetanol 1,4 mM, en una proporció 1:5 (p/v). Per a la columna de CM Sephadex C-50, les mostres es van homogenitzar amb tampó fosfat sòdic 10 mM pH 6,25 i 1mM d'EDTA, en una

proporció també d'1:5 (p/v). Els següents passos d'homogenització i centrifugat són iguals que a l'apartat anterior (5.1).

El citosol (volum aproximat de 7 ml) es va passar per la columna corresponent (20 x 1 cm; Pharmacia LKB Biotechnology); a continuació es passava 5 ml del tampó que s'havia utilitzat per homogenitzar el teixit, i finalment NaCl 0,5 M per eluir l'enzim (30). De tots aquests passos recollíem fraccions, les quals serien analitzades per determinar l'activitat enzimàtica i poder conèixer on era l'enzim.

9.2.- Cromatoenfoc

El cromatoenfoc, una tècnica desenvolupada per Sluyterman i Wijdenes el 1977 (176), utilitza tampons tipus amfòlits, d'alta capacitat tampó però baixa força iònica. La matriu intercanviadora d'anions (Sephacrose més radicals positius en el nostre cas) té la propietat d'intercanviar contínuament grups a través d'un ampli rang de valors de pH. El continu intercanvi de grups a causa de l'amfòlit acídic produeix un gradient de pH regular i uniforme amb baixa força iònica. Una altra característica important del cromatoenfoc és que permet la formació del gradient de pH dins de la mateixa columna, la qual cosa fa que les proteïnes puguin eluir seguint l'ordre dels seus punts isoelèctrics.

En un gradient descendent de pH (el tampó d'inici té el pH alt i el d'elució el pH baix), les molècules existeixen en els tres estats: negatiu, neutre i positiu. L'essència del cromatoenfoc està en què cada molècula canvia contínuament el seu estat de càrrega a mesura que es desenvolupa el gradient de pH, i això permet que es produeixi l'efecte de focus o enfoc. Les molècules del final de la mostra seran les primeres en ser afectades pel tampó de pH baix o tampó d'elució. A mesura que aquestes molècules es carreguen positivament, són repel·lides per la matriu i portades cap a la zona frontal de la mostra. En la migració cap a aquesta zona frontal, es troben amb un augment de pH. Això fa

MATERIAL I MÈTODES

que passin a no tenir càrrega i després que tornin a ser negatives. Quan les molècules estan carregades negativament, són retingudes per interacció amb la matriu i novament tornen a la rera guarda de la zona de la mostra. L'intercanvi de molècules entre la part frontal i la del final de la mostra dóna lloc a una contínua reducció d'aquesta zona, fins que elueix de la columna.

El cromatoenfoc ha estat una tècnica molt útil en l'estudi de l'expressió dels locus GST (4, 25, 66, 82, 88, 158, 167, 181). Un dels avantatges d'aquest mètode és que aconseguix una separació ben definida de les diferents classes de GST. D'altra banda, té l'inconvenient que el pH al qual els isoenzims elueixen depèn del gradient de pH; per tant, s'ha d'intentar reproduir acuradament les mateixes condicions experimentals per a totes les mostres.

Les mostres es van homogenitzar amb tris-HCl 20 mM pH 7,20 amb sucrosa 250 mM, GSH 1mM i EDTA 0,1 mM, en proporció 1:10 (p/v). L'homogenitzat i el centrifugat, en les mateixes condicions descrites fins ara. El citosol (volum aprox. 10 ml) es va passar (19 ml/h, 4°C) per una columna (20 x 1 cm; Pharmacia LKB Biotechnology) que contenia com a matriu Polybuffer Exchanger 94 (Pharmacia LKB Biotechnology) prèviament equilibrada amb el tampó d'inici, imidazol-HCl 25 mM pH 7,3. Després de la mostra es va passar tampó d'inici (5 ml) de nou per rentar-la, i a continuació es va eluir amb el tampó d'elució Polybuffer 74-HCl pH 4 diluït en proporció 1:15 (v/v). A les fraccions recollides es determinava el pH i l'activitat GST amb CDNB.

10.- Identificació d'isoenzims: tècniques immunològiques

En general, els antígens poden ser detectats, identificats i fins i tot -en alguns casos- quantificats, mitjançant diferents tècniques que tenen en comú la utilització d'anticossos específics contra l'antigen que es vol estudiar. En el present treball s'ha emprat la tècnica d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays).

10.1.- ELISA

Per a la identificació dels isoenzims de GST presents en les fraccions eluïdes de la columna de cromatoenfoc, s'ha utilitzat la tècnica d'ELISA indirecta (3, 203). Això implica que no només es treballa amb l'antigen i el seu anticòs primari específic, sinó que la resposta s'amplifica amb un anticòs secundari i un complex biotina-estreptavidina-peroxidasa, com a continuació detallarem.

La GST de les fraccions del cromatoenfoc, que havien estat emmagatzemades a -20°C immediatament després de la seva obtenció i anàlisi enzimàtica, va ser concentrada utilitzant concentradors Centricon^R 10 (Amicon, Beverly, USA).

En cada pou de la placa de PVC (clorur de polivinil) s'hi van dipositar 50 µl de la mostra concentrada, agitant bé per assegurar la unió de l'antigen a les parets del pou i incubant-ho 12 hores a temperatura ambient. Després d'aquesta incubació, els pous eren rentats 3 cops amb aigua destil·lada (sistema de rentat que s'emptra pràcticament al llarg de tota la tècnica).

A continuació es van incubar els pous amb metanol/H₂O₂ 30% en proporció 1:1 (volum/volum) durant 5 minuts a temperatura ambient, en un intent de bloquejar l'activitat peroxidasa endògena, que ens podria interferir els resultats, ja que al final de la tècnica s'utilitza peroxidasa exògena.

Després d'un nou rentat, es va procedir a la incubació durant 30 minuts a temperatura ambient amb tampó bloquejant, que es compon de PBS (Phosphate Buffer Saline) a pH 7,4, amb 0,25 % (pes/volum) d'albumina sèrica bovina i 0,05 % (volum/volum) de Tween 20. Aquesta incubació tenia la finalitat de bloquejar les unions inespecífiques.

Un nou rentat donava pas ja a la incubació amb l'anticòs primari, és a dir, anticossos obtinguts en be específicament contra els isoenzims de GST α i π

MATERIAL I MÈTODES

humans i que ens van ser amablement cedits pel Dr. R. C. Strange de la Universitat de Keele, Gran Bretanya. En cada pou s'hi posaven 100 μ l de l'anticòs, convenientment diluït en tampó bloquejant, i s'incubava durant 30 minuts a 37°C. Als pous considerats com a controls se'ls posava tampó bloquejant en lloc de l'anticòs primari.

Després del rentat corresponent, s'incubaven tots els pous amb 100 μ l de l'anticòs secundari -anticòs desenvolupat en ase contra be- marcat amb biotina (Sigma, St. Louis, USA), durant 30 minuts a 37° C. Aquest anticòs, amb un contingut inicial de 0,46 mg d'anticòs específic/ml, es diluïa en proporció 1:200 en tampó bloquejant.

Després d'un nou rentat, es procedia a la incubació amb 100 μ l del complex estreptavidina-peroxidasa (recordem que l'avidina té una gran afinitat per la biotina), diluït en tampó bloquejant fins a aconseguir una solució de 60 μ g/ml. Aquesta incubació també es realitzava durant 30 minuts a 37° C.

Finalment, i després de 5 rentats amb aigua destil·lada, es va revelar l'activitat peroxidasa amb el substrat ortofenilendiamina (OPD) (Hoffmann-La Roche, Basle, Switzerland): 50 μ l/pou de solució OPD/H₂O₂ (0,1 % i 0,001 %, respectivament) en tampó citrat 0,1 M a pH 4,5, que dóna lloc a la formació d'un compost soluble colorejat.

Així, doncs, al cap d'uns minuts d'incubació a temperatura ambient, els pous amb reacció positiva mostraven un color groc intens. En aquest moment, s'aturava la reacció amb 50 μ l d'acid sulfúric al 4,9 %, observant-se els positius de color taronja fosc. L'absorbància es va llegir a 550 nm en un lector d'ELISA Whittaker 2001.

11.- Determinació de radicals lliures

A partir de l'homogenitzat de les diferents mostres de glàndula sebàcia, es van determinar els diferents radicals lliures que a continuació es detallen (56).

11.1.- Determinació del malondialdehid

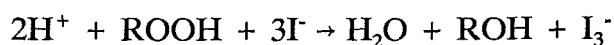
Els malondialdehids, formats d'alteracions d'àcids grassos poliinsaturats, són utilitzats d'índex per determinar l'extensió de la reacció de lipoperoxidació. Els malondialdehids, en combinar-se amb l'àcid tiobarbitúric, formen un producte vermell que s'absorbeix a 535 nm.

Un ml d'homogenitzat es va combinar amb 2 ml d'una solució TCA-TBA-HCl: àcid tricloroacètic (TCA) al 15 % (p/v), àcid tiobarbitúric (TBA) al 0,375% (p/v) i àcid clorhídric (HCl) 0,25 N. Aquest últim es va posar durant 15 minuts a escalfar en un bany d'aigua a 100°C. Després de refredar, es va centrifugar a 1.000 x g durant 10 minuts per poder treure el precipitat i llegir la mostra a 535 nm. El blanc tenia tots els reactius, però no la mostra.

El càlcul de la concentració es va fer utilitzant el coeficient d'extinció molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

11.2.- Determinació d'hidroperòxids

La reducció del iode pels peròxids és un mètode útil per determinar la quantitat d'hidroperòxids lipídics. El procés està basat en l'habilitat de l'ió I^- per reduir hidroperòxids, segons la reacció següent:



MATERIAL I MÈTODES

a 1 ml d'homogenitzat s'hi va afegir 5 ml de cloroform:metanol (2:1, volum/volum). Després d'agitar-ho durant 15 minuts, es va centrifugar a 1.000 x g durant 5 minuts per separar les fases. Es va recuperar la fase inferior del cloroform, la qual es va evaporar a sequetat a 55°C sota un corrent de nitrogen sec. Mentre estava sota el nitrogen, es va afegir 1 ml d'àcid acètic:cloroform (3:2, volum/volum) desgasificat i 0,05 ml de IK (7 M). El tub es va posar a temperatura ambient protegit de la llum durant 5 min i a continuació s'hi van afegir 3 ml d'acetat de cadmi (18 mM). Després de centrifugar a 1.000 x g durant 10 minuts es determinava la densitat òptica de la fase superior a 353 nm. El blanc tenia tots els reactius, però no la mostra.

El càlcul de la concentració es va fer utilitzant el coeficient d'extinció molar $1,73 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

11.3.- Determinació dels diens.

La lipoperoxidació va acompanyada de reajustament en els dobles enllaços dels àcids grassos poliinsaturats i per això es formen diens conjugats, els quals s'absorbeixen a 233 nm.

Els lípids de l'homogenitzat es van extreure i es van portar a sequetat com s'ha descrit per a l'assaig iodomètric de l'apartat anterior. El residu dels lípids es va dissoldre en 2 ml de ciclohexà i es va llegir a 233 nm. El blanc tenia tots els reactius, però no la mostra.

El càlcul de la concentració es va fer utilitzant el coeficient d'extinció molar $2,52 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

12.- Determinació de lípids

S'han determinat els nivells de colesterol, triglicèrids i fosfolípids a partir dels lípids extrets, com s'ha indicat a l'apartat 11.2, redissolts amb etanol, per mitjà de mètodes enzimàtics colorimètrics amb un autoanalitzador Cobas Mira (Roche) amb reactius de Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica.

13.- Estudi estadístic

S'ha portat a terme amb el programa MICROSTAT, analitzant:

- 1) la distribució de freqüències de cada variable;
- 2) la normalitat o no de cada variable, aplicant el test de Kolmogorov-Smirnov;
- 3) l'homogeneïtat de les variàncies en comparar una mateixa variable entre dos grups de mostres;
- 4) la comparació de mitjanes pel test de Student o bé la comparació per U de Mann-Whitney, segons fos convenient;
- 5) anàlisi de regressió lineal en el càlcul de la V_{max} , K_m i K_i dels diferents apartats.

IV.- RESULTATS I DISCUSSIÓ

IV.- RESULTATS I DISCUSSIÓ

1.- Localització de l'activitat GST en les diferents parts del teixit

En cada una de les tres parts en les que es va dividir la mostra de pell humana es va determinar l'activitat de la GST amb CDNB (1 mM) i GSH (1mM) com a substrats, obtenint-se -com indiquen els resultats de la taula 11-, que l'activitat enzimàtica es troba principalment a la glàndula sebàcia aïllada, així com a la zona subepitelial la qual té en el seu interior la glàndula sebàcia.

Per altra banda, en aquells casos en què es va determinar l'activitat GST a l'epiteli, es va observar que en aquesta localització l'activitat era molt inferior a la trobada en glàndula sebàcia.

Així, doncs, i com ja hem dit a l'apartat de Material i Mètodes, es va treballar sempre amb el teixit restant després de descartar l'epiteli i el teixit adipós (fig. 8).

Cas	1	2	3	4
glàndula sebàcia	63,49	35,52	25,3	24,87
subepiteli (glànd. sebàcia)	54,37	70,11	26,51	30,85
epiteli	-	-	0,81	9,46
teixit adipós	0	0	0	0

TAULA 11.- Activitat específica de la GST (nmols/min/mg prot.; CDNB 1mM, GSH 1mM) en diferents parts de la pell estudiada.