Bioquímica do Enxofre

H. Susana Marinho

Departamento de Química e Bioquímica
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Associação dos Estudantes da Faculdade de Ciências de Lisboa

2003

Ficha técnica

Título: Bioquímica do Enxofre

Autora: H. Susana Marinho

Composição, Impressão e Acabamentos: A autora

Edição: Associação de Estudantes da Faculdade de Ciências de Lisboa

---

Tiragem: 50 exemplares

1ª Edição, Lisboa, Abril de 2003

ISBN: 972-8008-88-0
Depósito Legal Nº. 195067/03

Bioquímica do Enxofre

H. Susana Marinho

Departamento de Química e Bioquímica
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

2003

RESUMO

O enxofre é um elemento essencial para os organismos vivos. É assimilado pelos diversos organismos em diferentes formas: na forma elementar por bactérias utilizadoras de enxofre, sob a forma de sulfato e de sulfureto pelas plantas, e sob a forma dos resíduos de cisteína e de metionina das proteínas pelos animais superiores. Independentemente de qual destas formas é ingerida, nos mamíferos, o enxofre encontra-se presente nas células essencialmente em três formas químicas - tióis (cisteína, glutationo, coenzima A), sulfuretos (metionina) e sulfato (derivados de poliósidos e esteróides) - que, de algum modo, são interconvertíveis. Existe também uma fracção de compostos contendo enxofre, presentes em menor quantidade, constituída por ácidos sulfónicos (ácido cisteico e taurina), e ácidos sulfínicos (hipotaurina). A presença de grupos funcionais, contendo enxofre, sobretudo o grupo sulfidrilo, é responsável por importantes funções catalíticas, regulatórias e estruturais nas proteínas, assim como pela função de principal tampão redox celular sob a forma do tripéptido glutationo e da proteína tiorredoxina. Neste trabalho é feita uma breve revisão da bioquímica da cisteína, metionina, coenzima A, ácido α-lipóico e glutationo.

INTRODUÇÃO **1**

PROPRIEDADES QUÍMICAS E NOMENCLATURA **2**

ABSORÇÃO DO ENXOFRE NOS SERES VIVOS **5**

METABOLISMO DA CISTEÍNA E DA METIONINA **7**

COENZIMA A **14**

ÁCIDO α-LIPÓICO **16**

GLUTATIONO **17**

ABSORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO NOS TECIDOS 20
BIOSSÍNTESE E BIODEGRADAÇÃO DO GSH 22
METABOLISMO INTER-ÓRGÃOS DO GSH 26
OXIDAÇÃO-REDUÇÃO DO GSH 28
GSH como captor de radicais *29*
GSH e a peroxidação lipídica *30*
GSH e o estado tiol/persulfureto das proteínas *34*
Papel do par GSSG/2GSH na regulação redox *40*
CONJUGAÇÃO DO GSH 44
Via dos ácidos mercaptúricos *45*
Transporte inter-órgãos e metabolismo dos GSH S-conjugados *46*
GSH S-transferases *47*

INTRODUÇÃO

O enxofre é um elemento essencial para os organismos vivos. O enxofre tem importantes funções catalíticas, regulatórias e estruturais nas proteínas, assim como a função de principal tampão redox celular sob a forma do tripéptido glutationo e da proteína tiorredoxina. Uma faceta importante dos compostos que contêm enxofre é o facto do grupo funcional contendo enxofre estar frequentemente envolvido na sua reactividade química e na sua capacidade catalítica. Um exemplo importante é a formação de ligações persulfureto pelos resíduos de cisteína nas proteínas. Estes persulfuretos podem ser reduzidos a tióis pelo glutationo ou pela tiorredoxina. Esta interconversão tiol/persulfureto serve para regular a actividade de muitos enzimas. Outras funções importantes, são a de transferência de grupos (por exemplo, transferência do grupo acetilo pelo Coenzima A e de grupos metilo pela S-adenosilometionina), a de ligando de metais (por exemplo a ligação do sulfureto ao ferro nas *clusters* ferro-enxofre das proteínas), ou a de cofactor de diversos enzimas (biotina, tiamina e ácido lipóico).

O enxofre pode ser adquirido pelos diversos organismos em diferentes formas: na forma elementar, por bactérias utilizadoras de enxofre, sob a forma de sulfato e de sulfureto pelas plantas, e sob a forma dos resíduos de cisteína e de metionina das proteínas pelos animais superiores. Independentemente de qual destas formas é ingerida, nos mamíferos, o enxofre encontra-se presente nas células essencialmente em três formas químicas que, de algum modo, são interconvertíveis (Tabela 1) [1]:

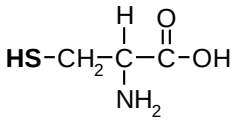
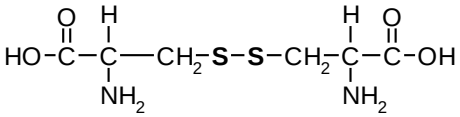
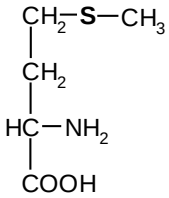
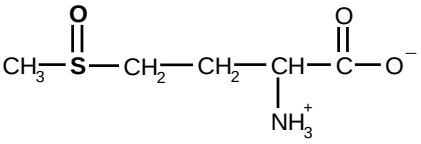
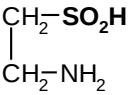
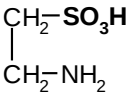
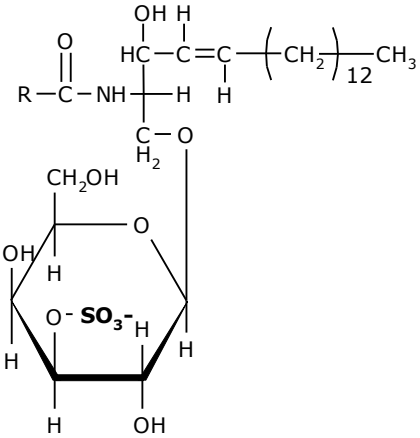
1. sob a forma de tióis (cisteína, glutationo, coenzima A) ou de persulfuretos[1] (cistina e glutationo oxidado);
2. sob a forma de sulfuretos nos resíduos de metionina ou nos *clusters* ferro-enxofre das proteínas;
3. Sob a forma de sulfato, essencialmente através de ligações tioamida ou tioéster em diversos poliósidos e esteróides

No entanto, existe também uma fracção de compostos de enxofre presentes em menor quantidade constituída por ácidos sulfónicos (ácido cisteico e taurina), e ácidos sulfínicos (hipotaurina). Por outro lado, podem também formar-se ácidos sulfénicos em proteínas quando resíduos de cisteína são oxidados.

Neste trabalho iremos começar por abordar algumas das propriedades químicas e nomenclatura dos compostos com enxofre assim como a absorção do enxofre nos seres vivos. Em seguida, iremos rever brevemente a bioquímica da cisteína, metionina, coenzima A, ácido α-lipóico e glutationo.

[1] Frequentemente chamados na literatura dissulfuretos, o que é incorrecto.

Tabela 1. Alguns compostos importantes de baixa massa molecular contendo enxofre que ocorrem nos seres vivos.

Forma do Enxofre	Estrutura geral	Exemplo	Estrutura
Tióis	RSH	**L-cisteína** (outros- Coenzima A, glutationo, homocisteína, tióis proteicos)	
Persulfuretos	RSSR	**Cistina** (outros – glutationo oxidado, ácido α-lipóico, homocistina, persulfuretos proteicos)	
Tioéteres	RSR	**Metionina** (outros – Cistationina,	
Sulfóxidos	RSOR	**Sulfóxido de metionina**	
Ácido sulfínicos	RSO_2H	**Hipotaurina**	
Ácidos sulfónicos	RSO_3H	**Taurina** (outros – ácido cisteico)	
Ésteres do sulfato	RSO_4H	**Sulfatido (3-sulfato de galactocerebrósido)** (outros – PAPS, APS)	

PROPRIEDADES QUÍMICAS E NOMENCLATURA

O enxofre pertence ao grupo VIA da Tabela Periódica. Entre as propriedades do enxofre que são diferentes em relação ao oxigénio destacam-se, o maior raio atómico e a menor electronegatividade, o que influencia, por exemplo, a capacidade de formar

ligações de hidrogénio, e a acidez (Tabela 2). Por outro lado, o oxigénio, o elemento mais abundante e importante do grupo VIA existe normalmente como gás diatómico e a sua química mostra estados de oxidação negativos de forma praticamente exclusiva (geralmente -2 (óxidos) mas também -1). Os elementos S, Se, Te e Po existem como sólidos com estruturas que são bastante complexas e formam compostos que aparecem num intervalo de estados de oxidação tanto positivos como negativos. Assim, os estados de oxidação do S variam entre -2 e +6, o que pode ser exemplificado pelos estados de oxidação de alguns dos compostos inorgânicos do enxofre mais conhecidos, nomeadamente os ácidos e os respectivos iões (Tabela 3).

Tabela 2. Propriedades dos elementos do grupo VIA essenciais à vida. O selénio é um elemento vestigial nos seres vivos

	O	**S**	**Se**
Número atómico	8	16	34
Configuração	$2s^2 2p^4$	$3s^2 3p^4$	$4s^2 4p^4$
Energia de ionização (kcal)	314	239	225
Raio atómico (Å)	0,74	1,04	1,17
Ponto de fusão (ºK)	54	392	490
Ponto de ebulição (ºK)	90	718	960
Electronegatividade	3,5	2,4	2,5
Raio iónico (Å)	1,45	1,90	2,02

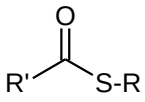
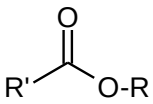
Tabela 3. Estados de oxidação do enxofre em diversos ácidos inorgânicos e respectivos iões.

Ácidos	**Iões**	**Estado de oxidação do S**
H_2S	S^{2-}	-2
Sulfídrico	Sulfureto	
H_2SO_3	SO_3^{2-}	+4
Sulfuroso	Sulfito	
H_2SO_4	SO_4^{2-}	+6
Sulfúrico	Sulfato	

Muitos dos compostos contendo enxofre têm grupos funcionais que podem ser considerados como análogos aos grupos funcionais contendo oxigénio (Tabela 4). Assim, o grupo funcional **–SH**, chamado **grupo sulfidrilo**, tem semelhanças com o grupo –OH dos álcoois. Compostos que contêm o grupo –SH são, portanto, chamados tioálcoois ou **tióis**. O prefixo **tio** indica que um átomo de enxofre substituiu um átomo de oxigénio no grupo funcional característico destes compostos. Os tióis são igualmente referidos como mercaptanos[2].

[2] Do latim *mercurium captans*, ou seja, da capacidade que os tióis têm de formar complexos com sais de mercúrio.

Tabela 4. Comparação entre a nomenclatura dos grupos funcionais contendo enxofre e grupos funcionais contendo oxigénio. R e R', grupos alquilo.

TIOL (tioálcool ou mercaptano)	R-SH	R-OH	ÁLCOOL
TIOÉTER (tiolato de alquilo ou sulfureto de alquilo)	R'-S-R	R'-O-R	ÉTER
TIOÉSTER			ÉSTER
PERSULFURETO	R'-S-S-R	R'-O-O-R	PERÓXIDO

Nas células, o enxofre pode existir nos estados de oxidação de -2 a +6 mas, biologicamente, são sobretudo importantes os estados de oxidação -2 e -1, exemplificados pelos tióis, sulfuretos e persulfuretos (Figura 1) [1].

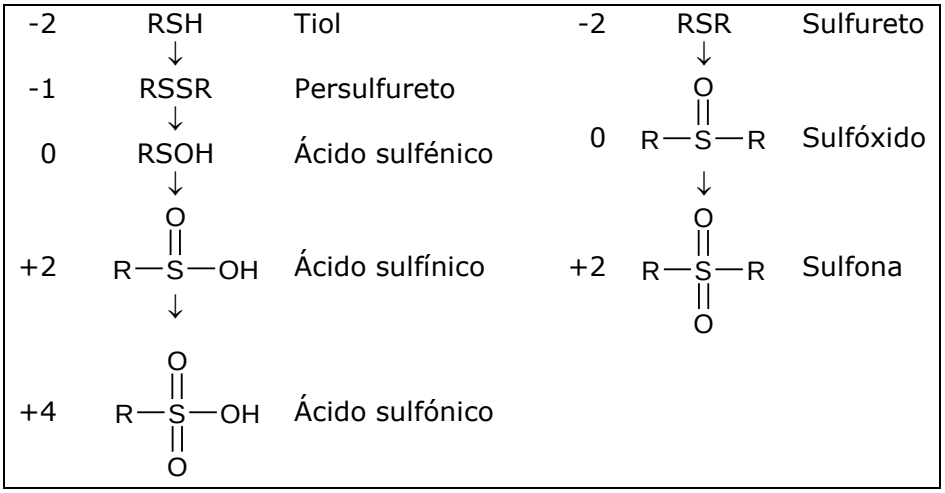


Figura 1. Compostos formados pela oxidação de tióis e sulfuretos e respectivos estados de oxidação.

Os tióis e os persulfuretos diferem nas suas propriedades físicas e químicas dos compostos de oxigénio equivalentes, sobretudo na sua maior acidez (Tabela 5) e na menor capacidade de formar ligações de hidrogénio e duplas ligações. Estas diferenças podem ser explicadas qualitativamente pelo facto do enxofre ter um maior raio atómico e portanto uma menor electronegatividade que o oxigénio. Uma consequência destas diferenças é que:

- os tióis têm pontos de ebulição mais baixos que os álcoois;
- são geralmente menos solúveis em água;
- a energia de dissociação da ligação SH é menor que a da ligação OH;
- e o comprimento da ligação SH é maior que o da ligação OH.

Tabela 5. Valores de pKa para alguns tióis encontrados nos seres vivos (adaptado de [2]). De um modo geral, o pKa de um grupo OH de um álcool é 5-6 unidades de pKa mais básico que o pKa do grupo SH correspondente. Por exemplo, no caso do GSH, a pH 7,4, apenas cerca de 5% existe sob a forma de GS^-. (7.4=8.7+ log[GS^-]/[GSH] → -1.3= log[GS^-]/[GSH] → GS^-=0,05GSH)

Composto	pKa (SH)
CH_3SH	10,3
Cisteamina ($HOCH_2CH_2SH$)	9,4
γ-Glutamilocisteína	9,1
GSH (γ-Glutamilocisteíniloglicina)	8,7
Cisteína	8,35

ABSORÇÃO DO ENXOFRE NOS SERES VIVOS

O enxofre, tal como o carbono e o azoto, passa através de um ciclo de transformações mediado por bactérias. Algumas espécies de bactérias oxidam e outras reduzem os diversos compostos de enxofre.

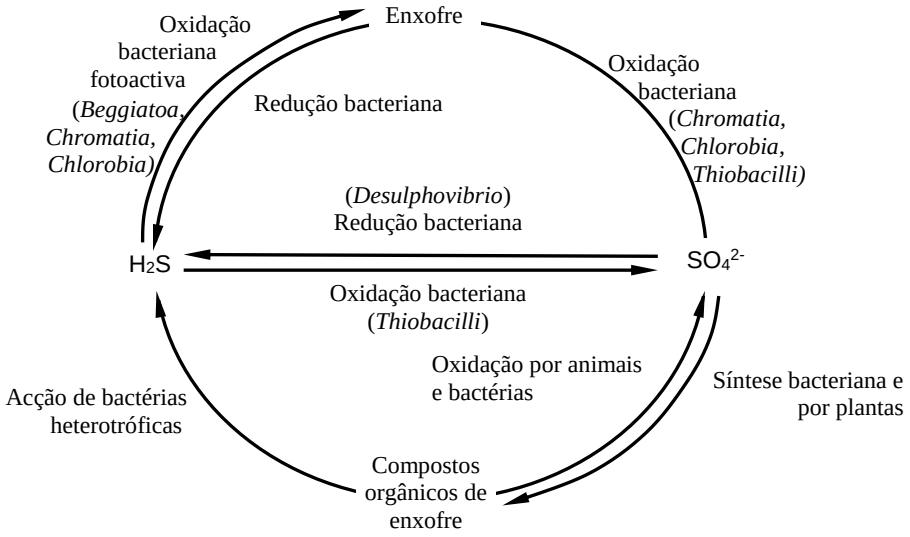


Figura 2. Ciclo do enxofre (adaptado de [3]).

Algumas das reacções bioquímicas deste ciclo do enxofre (Figura 2), podem ser resumidas da seguinte maneira (ver [4]):

- O enxofre elementar não pode ser utilizado por plantas e animais. No entanto, certas bactérias, como por exemplo o *Thiobacillus thiooxidans*, são capazes de oxidar o enxofre elementar a sulfato. A reacção envolvida é:

$$2S + 2\,H_2O + 3O_2 \rightarrow 2\,H_2SO_4 \qquad (1)$$

- A assimilação do sulfato é feita por plantas e por muitos microorganismos, mas não por animais superiores. O sulfato é convertido numa forma "activada" antes de ser usado metabolicamente para a síntese de aminoácidos contendo enxofre (metionina e cisteína). Assim, a incorporação do enxofre do sulfato em aminoácidos (cisteína e metionina) e em outros compostos bio-orgânicos é feita

essencialmente através de duas vias, envolvendo uma forma "activada" de sulfato como intermediário: **a via APS** (5'-fosfosulfato de adenosina), que existe nas plantas e em alguns microrganismos e **a via PAPS** (3'-fosfato-5'-fosfosulfato de adenosina), que existe nas leveduras e na *E. coli*, sendo o produto final a cisteína (Figura 3). O APS e o PAPS (Figura 4) são formados em duas reacções catalisadas pelos enzimas ATP sulfurilase [EC 2.7.7.4] e APS cinase [EC 2.7.1.25] (Figura 3). A cisteína pode ser usada para formar metionina e, quer a cisteína, quer a metionina, podem ser incorporadas em proteínas.

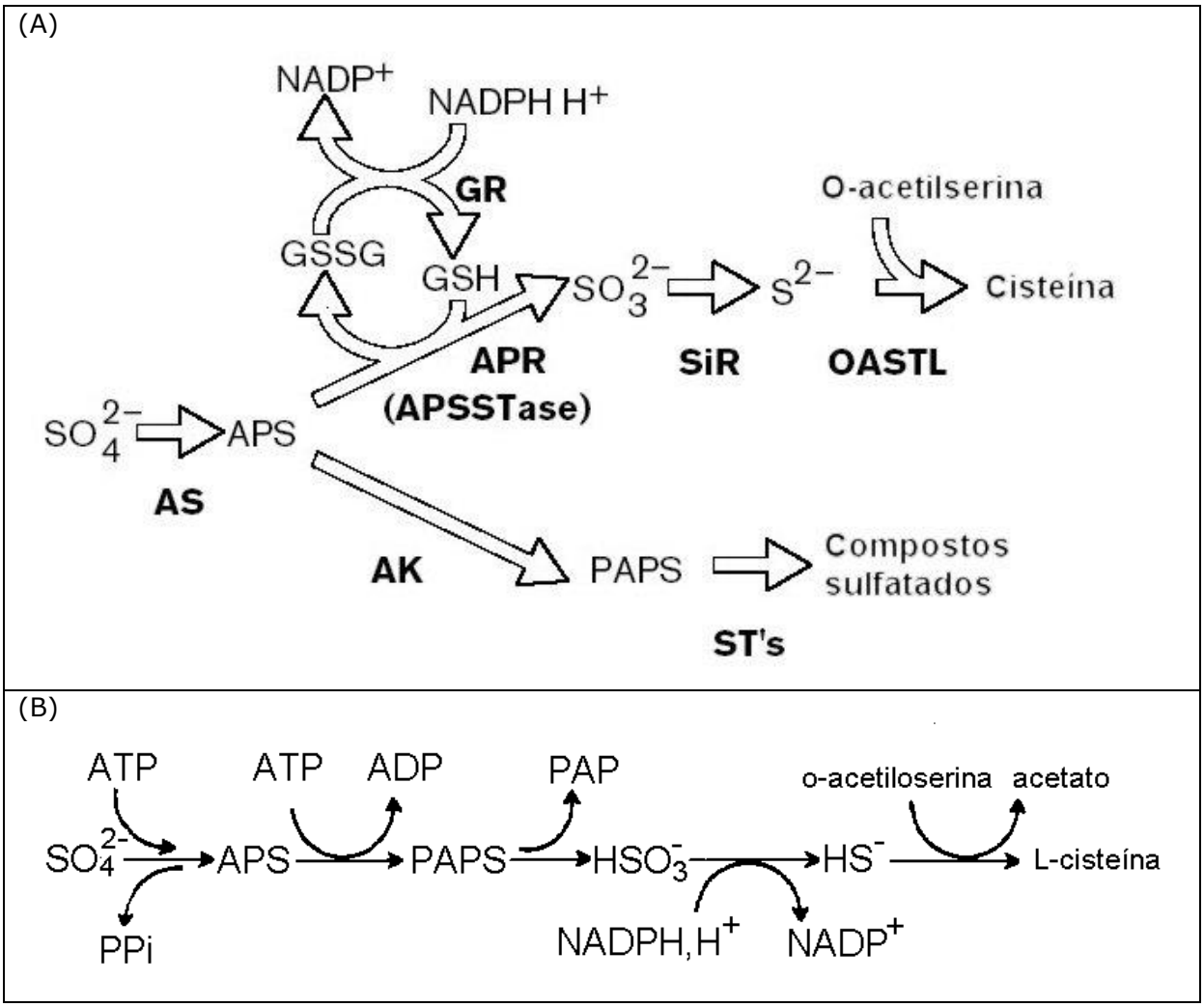


Figura 3 – Assimilação do sulfato para a síntese de cisteína (adaptado de [4;5]. (A) via APS da assimilação do sulfato em plantas. O sulfato é activado pelo ATP sulfurilase para formar APS. Este é um intermediário que pode seguir duas vias diferentes. Ou é usado numa via redutora para a síntese de cisteína, ou é usado numa via de sulfatação para a síntese de compostos sulfatados. A via de sulfatação começa com a fosforilação do APS para formar PAPS numa reacção catalisada pelo APS cinase. O PAPS é substrato de diversos sulfotransferases. Na via da cisteína, o primeiro passo de redução é aparentemente catalisado pelo enzima APS sulfotransferase, um redutase dependente do glutationo. O glutationo oxidado (GSSG) que se forma é reduzido a GSH pelo NADPH numa reacção catalisada pelo glutationo redutase. As reacções subsequentes são a redução do sulfito a sulfureto pelo sulfito redutase e a assimilação do sulfureto na cisteína catalisada pelo O-acetiloserina tiol liase. ATP sulfurilase [EC 2.7.7.4]; AK, APS cinase [EC 2.7.1.25]; ST, Sulfotransferases; APR, APS redutase [EC 1.8.99.-]; APSSTase, APS sulfotransferase; SiR, Sulfito redutase [EC 1.8.7.1]; GR, Glutationo redutase [EC 1.6.4.2]; OASTL, O-acetiloserina tiol liase [EC 4.2.99.8]. **(B)** via PAPS. Nas leveduras, a conversão de PAPS em sulfureto requer a tioredoxina, mas o papel da tiorredoxina não está totalmente elucidado. O enzima PAPS redutase, que é um dímero, contem provavelmente um persulfureto no seu centro activo que é reduzido pelo tiorredoxina.

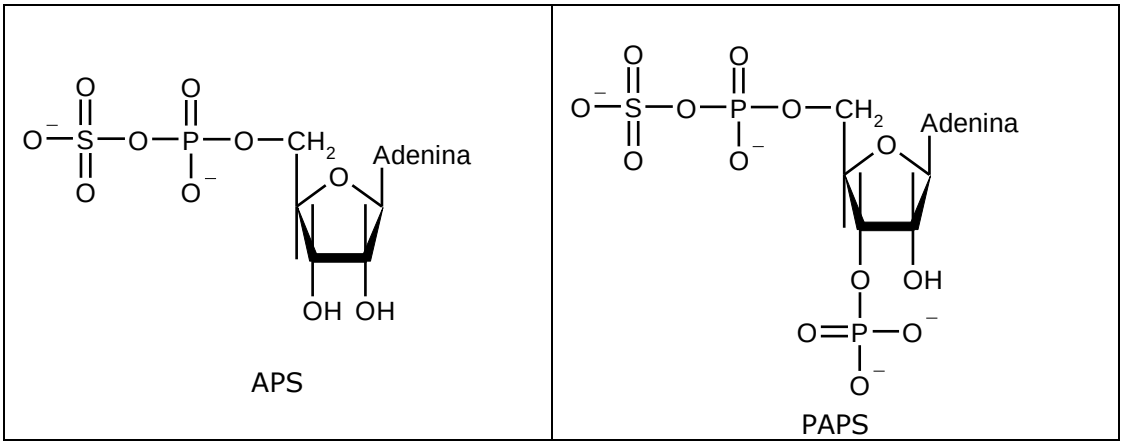


Figura 4. Estrutura do APS (5'-fosfosulfato de adenosina) e do PAPS (3'-fosfato-5'-fosfosulfato de adenosina).

- A degradação de proteínas (proteólise) liberta aminoácidos entre os quais a metionina e cisteína. O enxofre pode ser libertado destes aminoácidos através de reacções enzimáticas que ocorrem em muitas bactérias heterotróficas:

$$\text{cisteína} + H_2O \xrightarrow{\text{cisteína desulfurase}} \text{ácido pirúvico} + H_2S + NH_3 \qquad (2)$$

- Os sulfatos podem igualmente ser reduzidos a H_2S por bactérias existentes no solo, como por exemplo as bactérias do género *Desulfotomaculum* estando provavelmente envolvida a reacção:

$$4H_2 + CaSO_4 \rightarrow 2\,H_2S + Ca(OH)_2 + 2H_2O \qquad (3)$$

- O H_2S resultante da redução de sulfatos e da decomposição de aminoácidos é oxidado a enxofre elementar. Esta reacção é característica de certas bactérias pigmentadas utilizadoras de enxofre (fotossintéticas):

$$CO_2 + 2\,H_2S \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O)_x + H_2O + 2S \qquad (4)$$

METABOLISMO DA CISTEÍNA E DA METIONINA

Nas células procariontes, a principal via de síntese de metionina envolve a cisteína e a homocisteína (Figura 5). Nas células eucariontes acontece o contrário, ou seja, a metionina pode servir de percursor da homocisteína e da cisteína. Embora a maioria das células eucariontes obtenha cisteína através de transporte a partir do meio extracelular, em alguns tipos de células, por exemplo hepatócitos, a metionina pode ser convertida em cisteína. Até aos anos 30, pensava-se que a cisteína era um aminoácido essencial na dieta dos animais (ver [6]). Foi através do trabalho de Jackson e Block (1931, 1932) que se descobriu que, desde que metionina estivesse presente na dieta, era possível o crescimento de animais alimentados com uma dieta deficiente em cistina. Coube a Vincent du Vigneaud[3], durante os anos 40, a elucidação da via metabólica através da qual a metionina é convertida em cisteína e que é conhecida por via da trans-sulfuração ou via

[3] Vincent du Vigneaud ganhou o Prémio Nobel em 1955 pelos seus estudos sobre compostos de enxofre importantes em bioquímica

da cistationina (ver [6]) (Figura 6). Curiosamente, mais recentemente descobriu-se que a cisteína é um aminoácido essencial em fetos de humanos e de rato, pois o fígado fetal humano e de rato é deficiente no enzima γ-cistationase, o que resulta numa maior concentração de cistationina e em nenhuma formação de cisteína a partir de metionina [7].

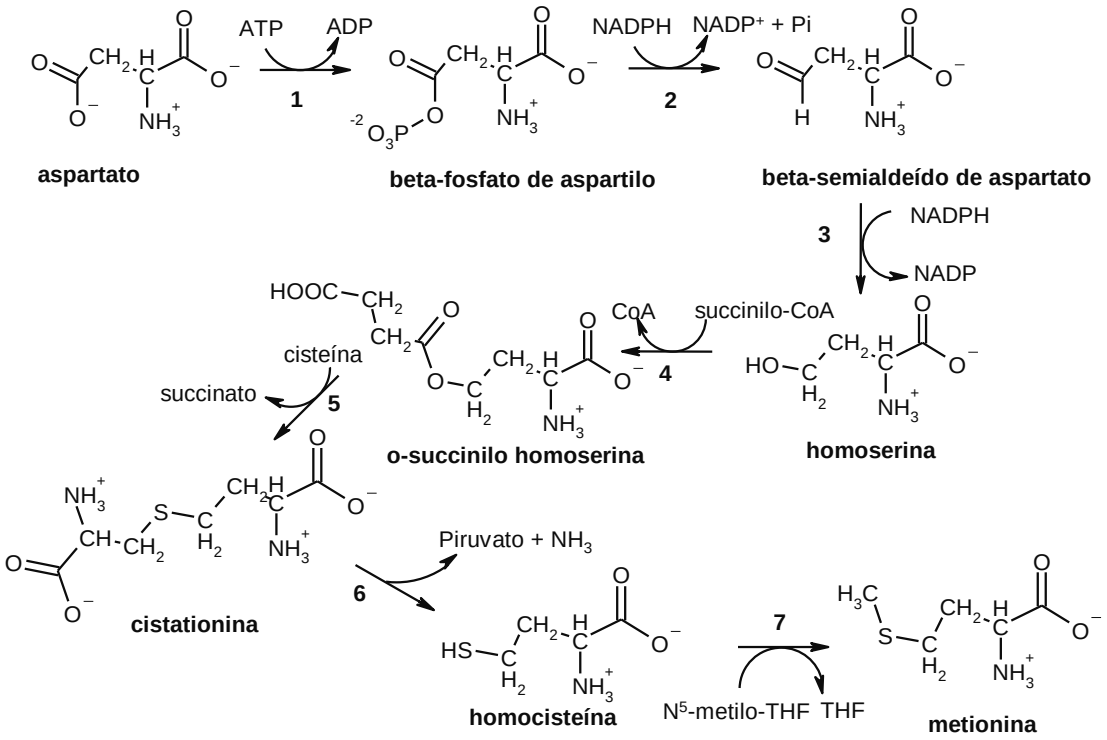


Figura 5. Formação de metionina em procariontes. 1, aspartocinase; 2, β-aspartato semialdeído desidrogenase; 3, homoserina desidrogenase; 4, homoserina acilotransferase; 5, cistationina γ-sintase; 6, cistationina β-liase; 7, homocisteína metilotransferase. A reacção 4 pode dar-se igualmente com o acetilo-CoA formando-se o-acetilo homoserina que pode reagir com a cisteína para formar cistationina e acetato.

A principal utilização da metionina nos organismos é a sua incorporação em proteínas. Os resíduos de metionina das proteínas podem ser oxidados por diversos oxidantes biologicamente relevantes, incluindo espécies reactivas de oxigénio (ERO) formando-se sulfóxidos de metionina e, em condições de *stress* oxidativo muito elevado, sulfonas de metionina. Enquanto que a conversão de metionina a sulfona de metionina é um processo aparentemente irreversível, os sulfóxidos de metionina podem ser novamente reduzidos a metionina através de uma reacção enzimática catalisada pelos redutases de sulfóxido de metionina. Esta oxidação reversível dos resíduos de metionina expostos na superfície das proteínas parece ser um mecanismo de defesa contra o *stress* oxidativo, uma vez que a sobre-expressão da metionina sulfóxido redutase confere resistência às ERO, tanto em células de mamífero como em células de levedura (ver [8;9]). No entanto, ainda não foram estabelecidos os mecanismos que relacionam a oxidação da metionina com a resposta celular ao *stress* oxidativo.

Com a excepção de duas vias metabólicas (a via da transaminação e a da incorporação da metionina em proteínas), todas as outras vias de metabolismo da metionina envolvem a formação de S-adenosilometionina. A S-adenosilometionina é o dador de grupos metilo para praticamente todas as reacções de metilação biológicas que se conhecem, com a excepção daquelas que envolvem a metilação da homocisteína. Estima-se que cerca de 95% da S-adenosilometionina formada é consumida nas reacções de transferência de grupos metilo. Os grupos metilo lábeis são usados para a formação de muitos compostos importantes em bioquímica, por exemplo, a formação de fosfatidilocolina a partir de fosfatidiloetanolamina ou a formação de adrenalina a partir de

noradrenalina. No entanto, estudos metabólicos indicam que a maior parte das necessidades diárias de grupos metilo lábeis é dirigida no sentido da síntese de creatina (Figura 7).

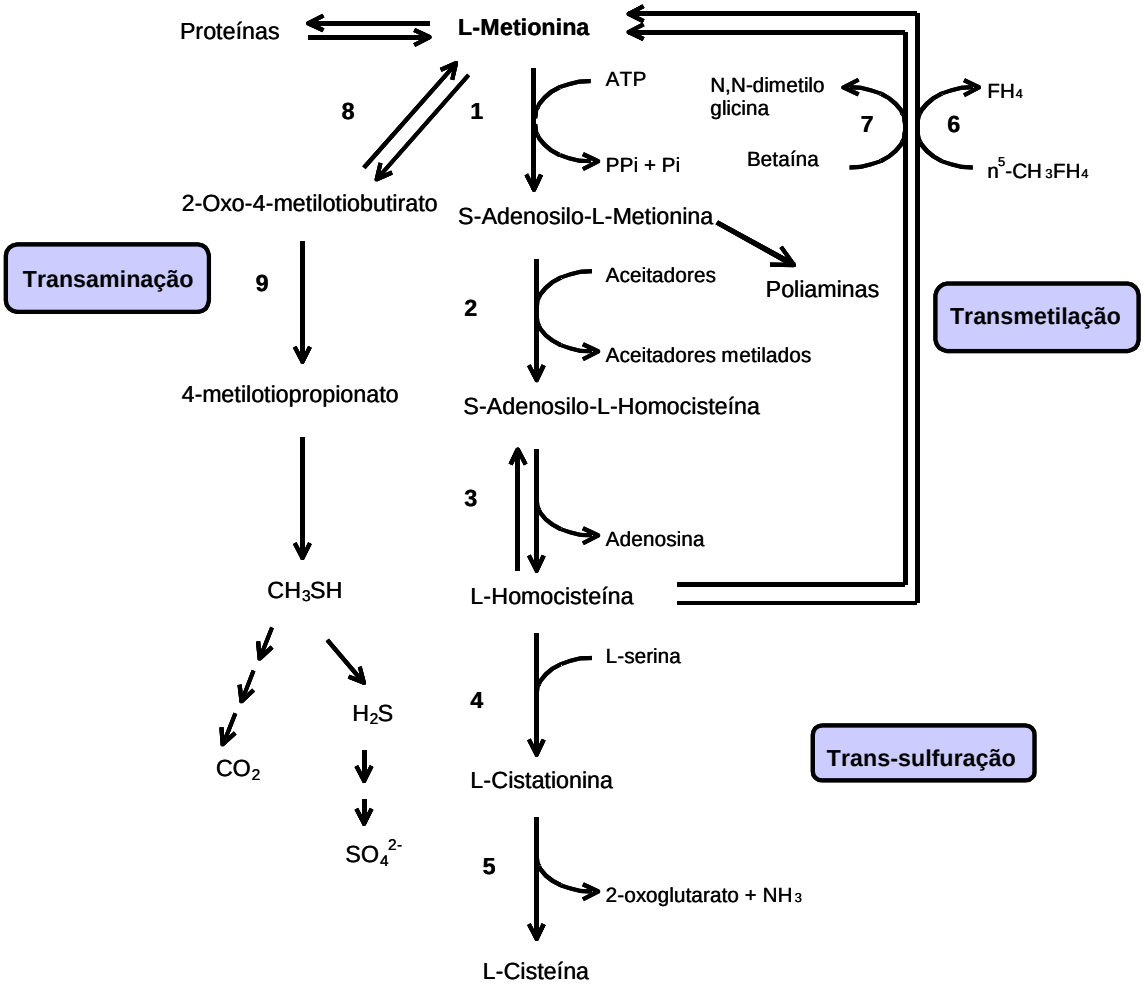


Figura 6. Metabolismo da metionina através das vias da transmetilação, trans-sulfuração (via da cistationina) e transaminação (adaptado de [10] e de [11]). 1. Sintetase da S-adenosilometionina [EC 2.5.1.6]; 2 .Transferases do grupo metilo por ex. glicina metilo transferase [EC 2.1.1.20]; 3. Hidrolase da S-adenosilo-homocisteína [EC 3.3.1.1]; 4. Sintetase da cistationina [EC 4.2.1.22]; 5. γ-cistationase (L-cistationina cisteína liase [EC 4.4.1.1]); 6. metionina sintase (N5-metilotetra-hidrofolato-homocisteína metilo transferase) [EC 2.1.1.13]; 7. betaína-homocisteína metilo transferase [EC 2.1.1.5]; 8. glutamina: 2-oxoácido amino transferase [EC 2.6.1.15]; 9. 2-oxoácido de cadeia ramificada desidrogenase [EC 1.2.4.4].

Outro dos destinos possíveis da S-adenosilometionina, envolve a sua descarboxilação para formar S-adenosilometionina descarboxilada que é o dador de grupos aminopropilo para a síntese de espermidina e espermina (via das poliaminas). Em humanos esta via consome cerca de 2-5% da S-adenosilometionina.

Como se mostra na Figura 6, a homocisteína ocupa um local de derivação no metabolismo da metionina. Existem três enzimas que actuam na homocisteína (Figura 6) e a utilização da homocisteína através destas vias depende do estado metabólico. A homocisteína pode ser novamente metilada para formar metionina numa reacção catalisada pelo metionina sintetase (N^5-metilotetra-hidrofolato-homocisteína metilo transferase) ou pelo betaína-homocisteína metilo transferase. Pode também ser usada para nova síntese de S-adenosilo homocisteína pois a reacção catalisada pelo S-adenosilo homocisteína hidrolase é reversível, ou então, ser convertida irreversivelmente em

cistationina através da reacção catalisada pela pelo cistationina β-sintetase. Este local de derivação é um ponto de regulação importante [12].

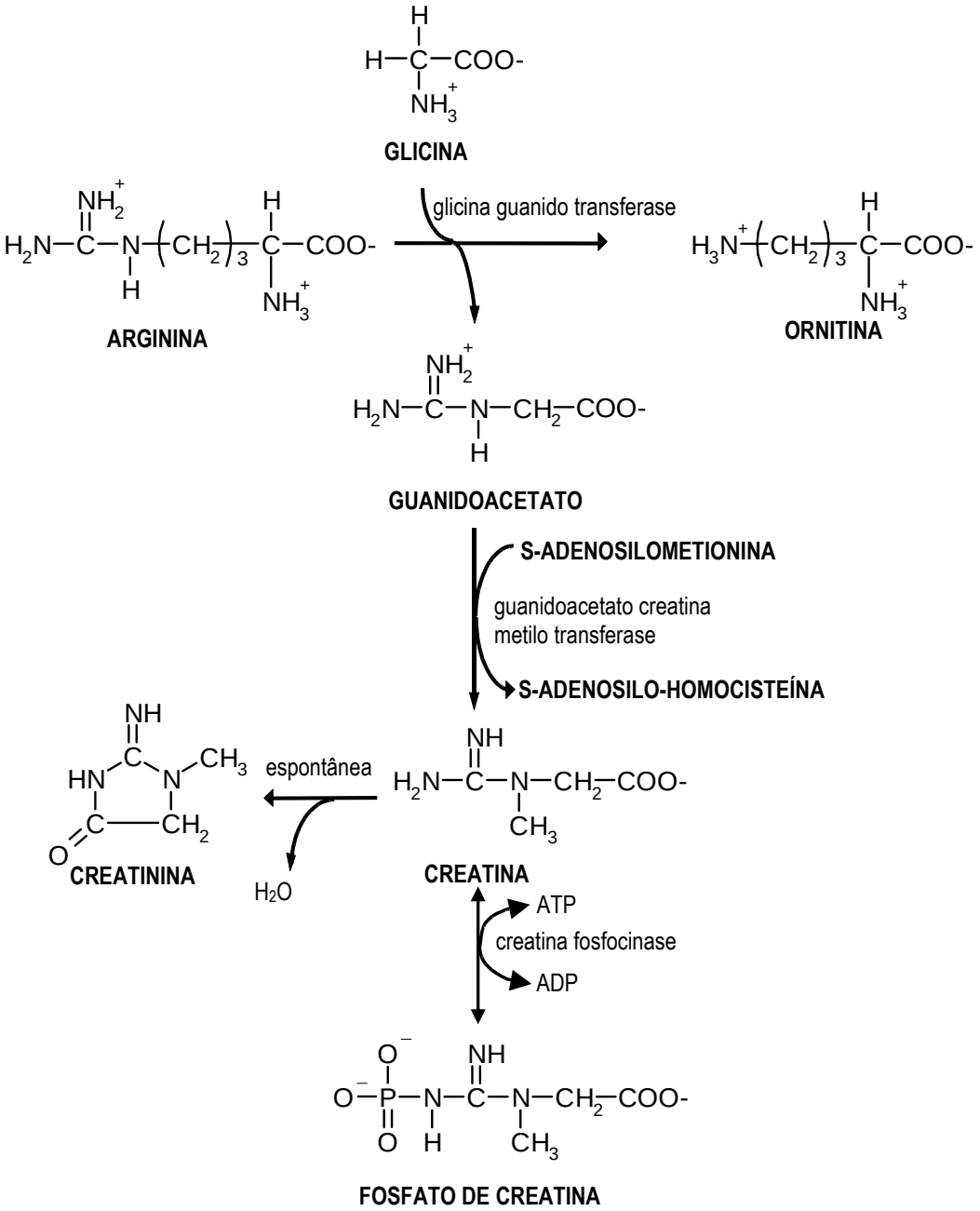


Figura 7. Envolvimento das reacções de metilação na síntese de creatina e creatinina (adaptado de [13]).

Quando a metionina está em excesso, a homocisteína é utilizada preferencialmente através da via da trans-sulfuração que converte irreversivelmente a homocisteína em cisteína α-oxoglutarato e NH_3. A primeira reacção desta via é catalisada pelo enzima sintetase da cistationina que é dependente da vitamina B6 (fosfato de piridoxal). A regulação da via da cistationina parece ser feita, pelo menos em parte, ao nível do enzima sintetase do cistationina. Este enzima existe numa forma inactiva que é activada por proteólise passando de uma estrutura tetramérica para dimérica. Com esta mudança de estrutura há uma diminuição em trinta vezes do valor de Km para a homocisteína e um aumento em sessenta vezes da actividade específica [11]. O cistationina sintetase também é activado pelo S-adenosilometionina [12] e foi sugerido que a concentração de S-adenosilometionina é um regulador fisiológico da actividade do cistationina sintetase

[11;14]. A actividade da via da trans-sulfuração não é regulada pela concentração de cisteína [11;15].

Em condições de deficiência em metionina, a homocisteína é usada para formar novamente metionina através da transmetilação. No fígado, uma porção substancial da homocisteína é metilada numa reacção catalisada pelo betaína-homocisteína metilo transferase, que em que a betaína é usada como dadora de grupos metilo. No entanto, na maioria dos tecidos a metilação da homocisteína é catalisada pelo enzima metionina sintase (N^5-metilotetra-hidrofolato-homocisteína metilo transferase) que usa a vitamina B12 como cofactor e o metilotetra-hidrofolato como substrato.

Quando há inibição de uma ou mais das vias de metabolização da homocisteína, quer devido a defeitos nos enzimas, quer devido a deficiências nas vitaminas, há uma acumulação da homocisteína, o que provoca um aumento do nível total de homocisteína no plasma[4] (hiper-homocisteinémia). Esta é a base metabólica para usar o aumento do nível total de homocisteína no plasma como marcador do estado da vitamina B_{12} e do folato, e explica a ocorrência de doenças devidas a diversos erros genéticos do metabolismo da homocisteína, que são conhecidas colectivamente por homocistinúria. A síntese de cisteína a partir de metionina parece ser sobretudo importante no fígado. Com efeito, no rato, o órgão com mais actividade de trans-sulfuração é o fígado embora o pâncreas e o rim também sejam importantes [16], sendo que os outros órgãos têm actividades bastante baixas de trans-sulfuração.

Grandes quantidades de metionina são tóxicas o que levou Benevenga (ver [4;10]) a concluir que a base metabólica para a toxicidade da metionina não podia ser atribuída ao seu metabolismo através da via da trans-sulfuração, devendo estar relacionada com o metabolismo do seu grupo metilo. Em 1977, Case e Benevenga sugeriram (ver [4;10]) que a metionina poderia ser utilizada através de uma via metabólica alternativa à transmetilação/trans-sulfuração, conhecida por transaminação, formando-se como produtos finais CO_2 e sulfato.

Estudos feitos para estabelecer uma quantificação da importância da via da transaminação relativamente à transmetilação/trans-sulfuração, indicam que a oxidação do grupo metilo da metionina por esta via, corresponde a cerca 56-88% em hepatócitos isolados de fresco [17]. No entanto, outros autores têm posto em causa a importância da via de transaminação [18-20].

As concentrações intracelulares de cisteína são da ordem dos 30-200 μM, valores que são dos mais baixos observados para os diversos aminoácidos existentes *in vivo*. Concentrações superiores de cisteína são potencialmente perigosas para as células, uma vez que a cisteína forma um derivado tiazolidino com o fosfato de piridoxal, podendo originar deficiência deste coenzima nas células. A cisteína pode também oxidar-se não enzimaticamente para formar cistina, um aminoácido muito pouco solúvel, que é tóxico quando se acumula. Na cistinose, uma doença devida a um transporte defeituoso da cistina para dentro das células, há acumulação de cristais de cistina nas células do retículo endotelial.

A cisteína participa numa série extremamente complexa de reacções metabólicas (Figura 8). Estas múltiplas vias metabólicas em que a cisteína está envolvida funcionam eficientemente de modo a impedir acumulações tóxicas de cistina. A biossíntese do glutationo (GSH) serve, em parte, para preservar a cisteína numa forma metabolicamente activa mas não tóxica, que pode ser transportada facilmente entre os diversos órgãos.

A cisteína, seja de origem exógena, seja formada a partir de serina e metionina, é utilizada para a síntese de proteínas. Nas proteínas tem importantes funções, quer através da formação de ligações persulfureto com outros resíduos de cisteína, o que é importante para a estabilização da estrutura tridimensional das proteínas, quer através do uso do seu grupo sulfidrilo para funções catalíticas no centro activo de inúmeros enzimas. É também percursora do coenzima A, pode ser oxidada a cistina, e a sua degradação nos animais forma taurina, CO_2 e sulfato.

---

[4] Quando falamos de homocisteína total no plasma falamos de homocisteína e da sua forma oxidada, homocistina. No plasma existem quantidades vestigiais (~1%) de homocisteína; cerca de 70% está ligada à albumina e os restantes 30% encontram-se sob a forma de persulfuretos mistos de baixo peso molecular, predominantemente com a cisteína.

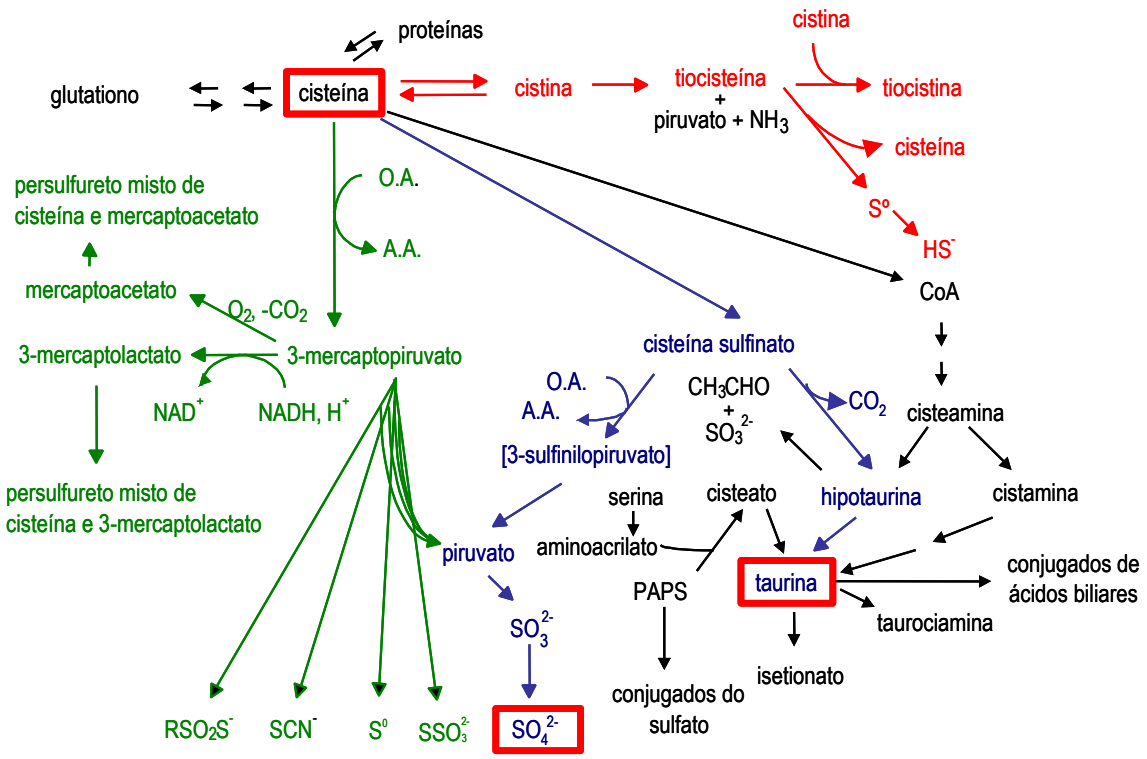


Figura 8. Metabolismo da cisteína nos mamíferos (adaptado de [4]). O sulfato e a taurina estão dentro de quadrados porque são os principais produtos da degradação da cisteína na urina e nos tecidos respectivamente. O.A.,oxoácidos, A.A. aminoácidos

O catabolismo da cisteína é feito por três vias (Figura 8): **via do sulfinato de cisteína**, **via da β-eliminação** e **via da transaminação** (ou via do mercaptopiruvato). Nos mamíferos, a oxidação directa da cisteína a sulfinato de cisteína, que corresponde a cerca de metade do catabolismo da cisteína, e a β-eliminação, são as duas principais vias de degradação da cisteína. A via da transaminação parece ser pouco importante. Com efeito, embora se observe transaminação da cisteína em homogenatos, parece pouco provável que a cisteína seja um bom substrato para reacções de transaminação *in vivo*. Com efeito, o Km para a cisteína do enzima cisteína:2-oxoglutarato amino transferase é 22 mM enquanto que o Km do mesmo enzima para o aspartato é cerca de 0,05-0,06 mM. Tendo em conta as concentrações fisiológicas de cisteína e de aspartato, é pouco provável que ocorra a transaminação da cisteína na presença de aspartato. No entanto, doentes com uma deficiência genética do enzima 3-mercaptopiruvato enxofre transferase excretam níveis baixos do persulfureto misto do 3-mercaptolactato e cisteína, o que sugere que, pelo menos uma pequena parte da cisteína é metabolizada por transaminação *in vivo*.

Na via da β-eliminação, a cisteína, sob a forma de cistina é clivada pelo enzima γ-cistationase para formar tiocisteína, piruvato e amónia (Figura 8). Pode-se libertar enxofre (S°) a partir da tiocisteína ou, na presença de cisteína ou outros tióis, a tiocisteína pode formar cistina ou outro persulfureto formando-se igualmente sulfureto (HS^-). Na via da transaminação, a cisteína forma por transaminação 3-mercaptopiruvato, que é metabolizado para formar piruvato e sulfureto. O sulfureto formado em todas estas vias pode ser oxidado a sulfito através da formação de um intermediário, o tiosulfato, e por sua vez o sulfito pode ser oxidado a sulfato.

A via do sulfinato de cisteína começa com a oxidação da cisteína a cisteína sulfinato (Figura 9). Duas reacções alternativas podem ocorrer. O sulfinato de cisteína pode ser descarboxilado para formar hipotaurina, ou pode ser transaminado, numa reacção catalisada pelo aspartato aminotransferase, para formar 3-sulfinilopiruvato, o qual por sua

vez forma piruvato e sulfito, através de uma reacção não enzimática. A partição do sulfinato de cisteína entre a transaminação e a descarboxilação é variável com a espécie. Cerca de 70-90% do cisteína sulfinato oxidado por hepatócitos de rato, por ratos ou murganhos intactos é convertido em hipotaurina e taurina, o que indica que em condições normais, o rato e o murganho metabolizam o cisteína sulfinato predominantemente para formar taurina e não piruvato e sulfito. Nos humanos, a fracção descarboxilada é menor do que no rato. Nos gatos, que são deficientes em sulfinato de cisteína descarboxilase, praticamente não se forma hipotaurina, o que conduz à cegueira quando a taurina está ausente da dieta.

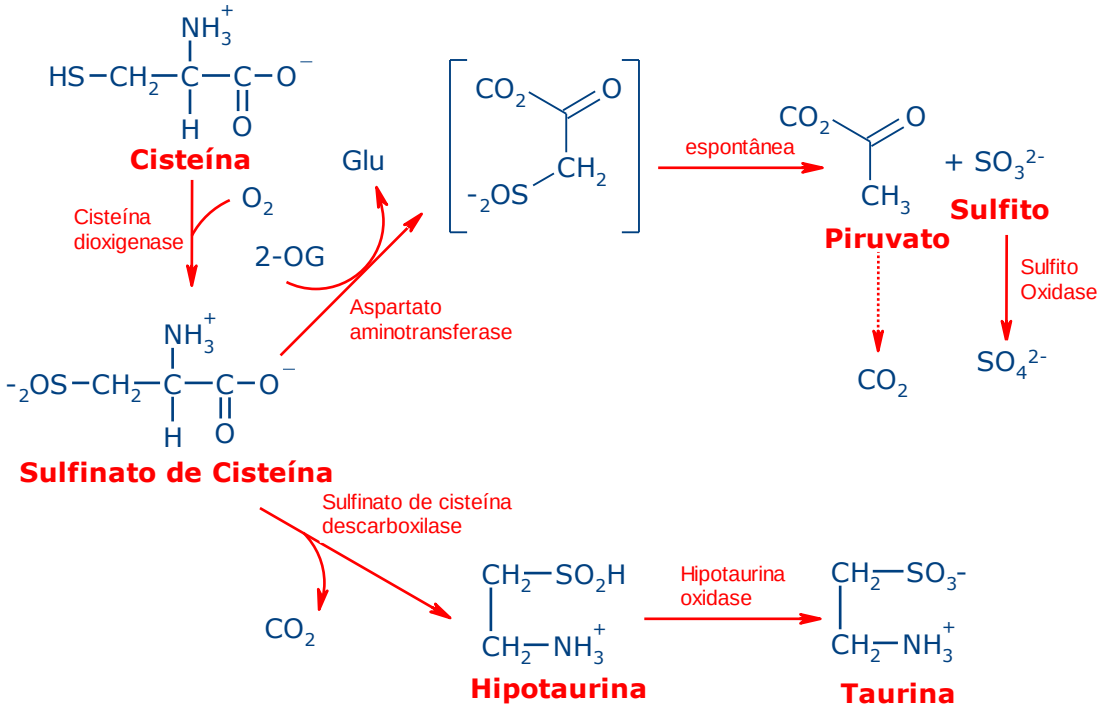


Figura 9. Via do sulfinato de cisteína (adaptado de [21]). Os enzimas que catalisam as reacções são: Cisteína dioxigenase [EC 1.13.11.20]; cisteína sulfinato descarboxilase [EC 4.1.1.29]; aspartato aminotransferase [EC 2.6.1.1] e sulfito oxidase [EC 1.8.3.1].

No fígado, a regulação do metabolismo da cisteína parece ser sobretudo função da quantidade de cisteína disponível para ser utilizada pelos hepatócitos. Com efeito, estudos em hepatócitos de rato [22] indicam que, quando a disponibilidade em cisteína é baixa a formação de glutationo, sulfato e taurina corresponde respectivamente a 90%, 10% e 1% do metabolismo da cisteína. Quando a disponibilidade de cisteína é alta, a formação de glutationo, sulfato e taurina corresponde respectivamente a 19%, 47% e 34% do metabolismo da cisteína.

Cerca de 90% da hipotaurina formada a partir do sulfinato de cisteína é oxidada a taurina através de uma reacção enzimática mal caracterizada que parece requerer NAD^+, Cu^{2+} e O_2. A taurina é utilizada para a conjugação de ácidos biliares (estando portanto envolvida na absorção de lípidos) e para a conjugação de alguns xenobióticos, mas estas reacções consomem apenas uma pequena percentagem da quantidade total de taurina. Mais recentemente foi-lhe atribuído um papel na fagocitose. Os neutrófilos produzem grandes quantidades de taurina. A taurina é um β-aminoácido que oxidado pelo ácido hipocloroso (formado pelo sistema mieloperoxidase/H_2O_2/Cl^-) pode produzir taurina cloramina que é bastante mais estável que as cloraminas formadas a partir de α-aminoácidos. Por outro lado, a taurina cloramina é bastante menos oxidante que o ácido hipocloroso e portanto a taurina atenua a acção biocida do ácido hipocloroso podendo proteger as células de autólise. O sulfato (que corresponde ao estado máximo de oxidação

dos compostos de enxofre produzidos nos seres vivos) é usado essencialmente em reacções de conjugação, quer com esteróides, quer com xenobióticos.

COENZIMA A

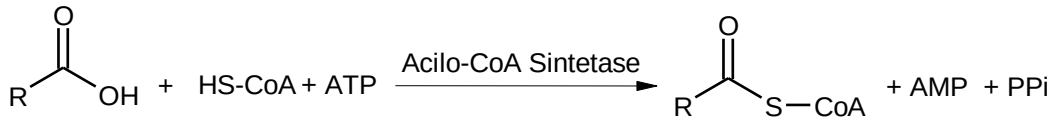
O coenzima A (CoA), descoberto por Lipmann em 1945, é o cofactor para as acetilações e acilações biológicas. A maior parte do CoA existente nos tecidos está sob a forma de tioéster, os chamados derivados do CoA, como o acetilo-CoA e os acilo-CoA, mas parte existe igualmente sob a forma de tiol e de persulfureto. Os tioésteres tem propriedades "especiais":

1. São compostos com uma alta energia livre de hidrólise, sendo essa hidrólise espontânea bastante rápida a pH>7.

$$\text{Acetilo-CoA} + H_2O \rightleftharpoons \text{Acetato} + \text{CoA} + H^+ \qquad \Delta G^{o\prime} = -7{,}5 \text{ kcal/mole}$$

2. São bons agentes acilantes.
3. Comparados com os ésteres vulgares, provocam a activação do carbono α ao grupo acilo.

Assim, entre as funções biológicas importantes do CoA encontra-se a activação dos ácidos gordos a acilos-CoA de modo a poderem ser oxidados, activação essa que é catalisada pelos acilo-CoA sintetases (também conhecidos por tiocinases):



Outro tioéster do CoA com um papel central no metabolismo celular é o acetilo-CoA, que se forma no mitocôndrio a partir do piruvato produzido na glicólise e a partir dos ácidos gordos. O acetilo-CoA entra depois no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs).

Nos mamíferos, o CoA é sintetizado a partir do pantotenato, uma vitamina, através das reacções indicadas na Figura 10.

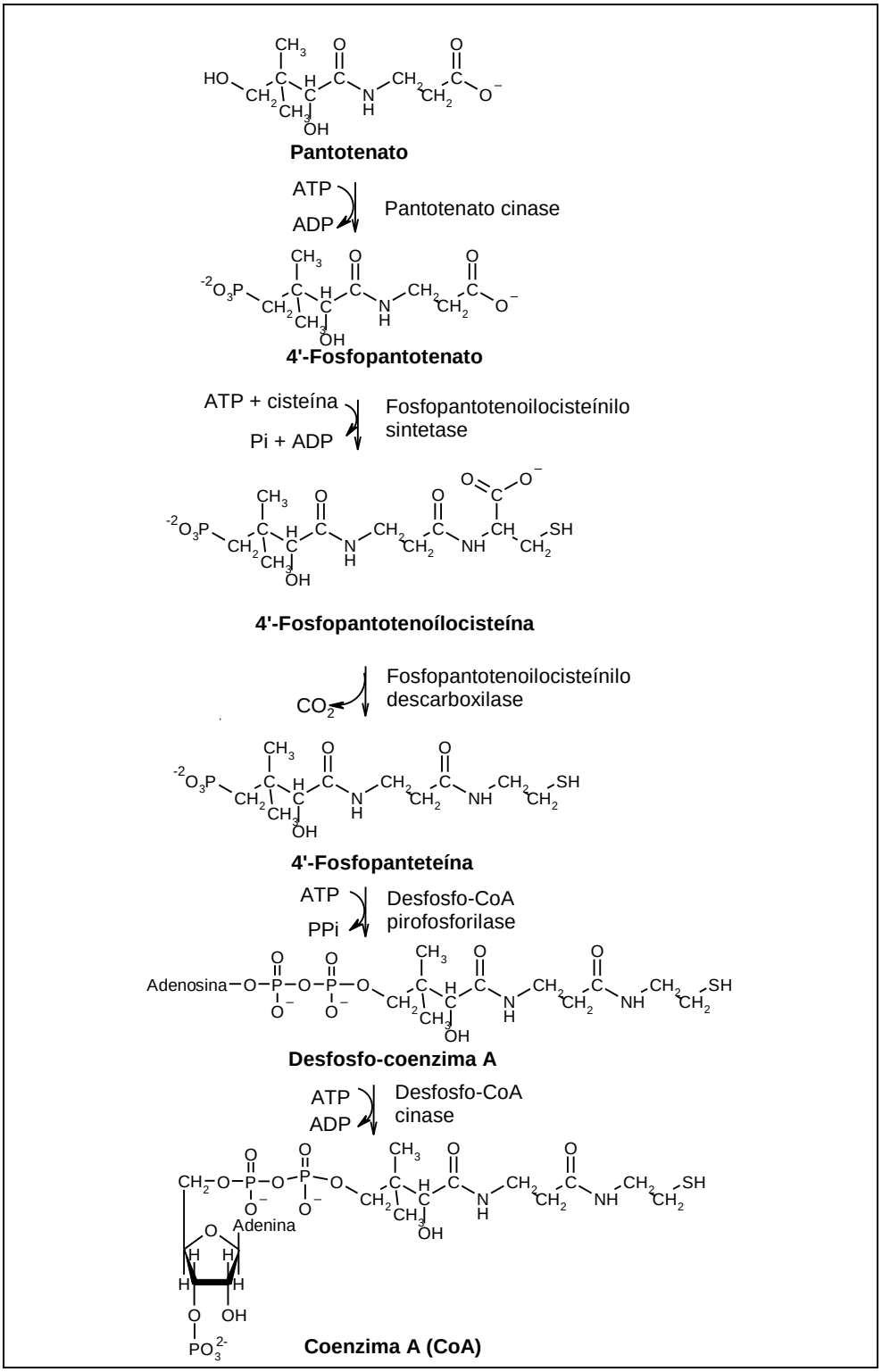


Figura 10. A biossíntese do coenzima A a partir do pantotenato.

ÁCIDO α-LIPÓICO

O ácido α-lipóico[5], que foi isolado pela primeira vez por Reed em 1951, é um composto insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos. Embora após o seu isolamento tenha sido inicialmente classificado como vitamina, mais tarde descobriu-se que podia ser sintetizado pelos animais. No entanto, não se conhece a via enzimática completa para esta síntese *de novo*. Alguns estudos indicam que o octanoato serve de percursor imediato da cadeia de 8 carbonos de acilo gordo (ver [23]) e que a cisteína é a fonte de enxofre.

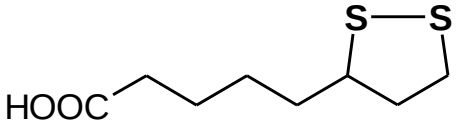


Figura 11. Estrutura do ácido α-lipóico.

Nas células, o ácido α-lipóico, encontra-se essencialmente sob a forma de lipoamida, e funciona como cofactor nos complexos multienzimáticos mitocondriais que catalisam a descarboxilação oxidativa de 1-oxoácidos como o piruvato, o 1-oxoglutarato e os 1-oxoácidos de cadeia ramificada (Figura 12). Assim, tem um papel essencial no metabolismo oxidativo e durante muito tempo pensou-se que este era a sua única função metabólica.

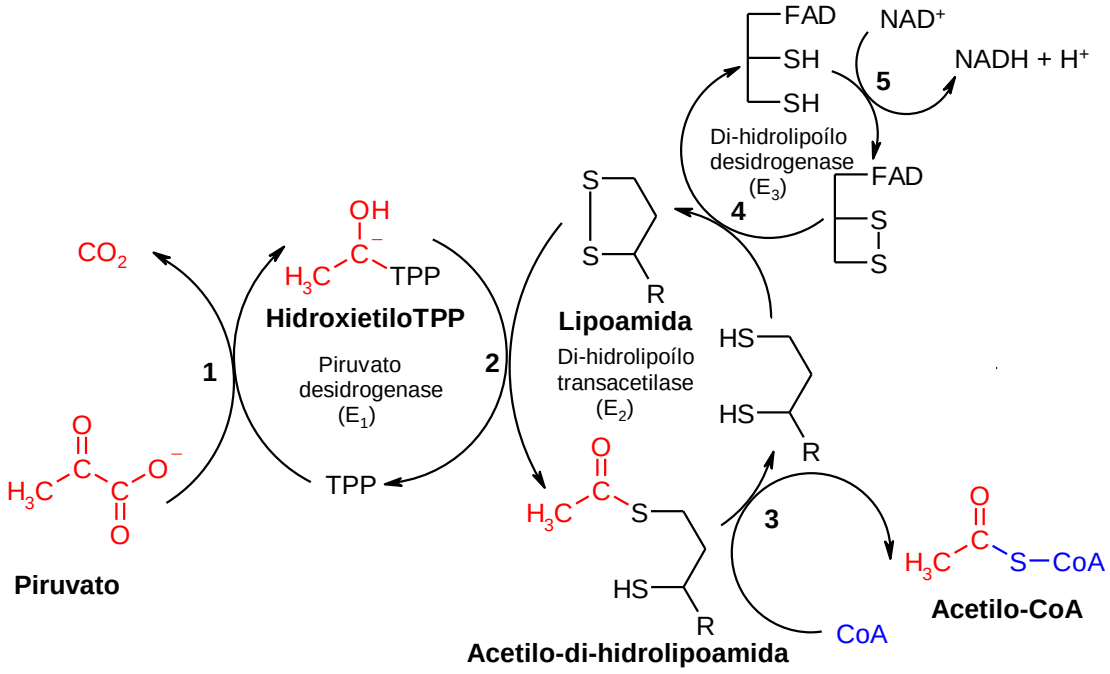


Figura 12 – As cinco reacções catalisadas pelo complexo multienzimático piruvato desidrogenase. O E_1 (piruvato desidrogenase) contém pirofosfato de tiamina (TPP) e catalisa as reacções 1 e 2. O E_2 (di-hidrolipoílo transacetilase) contém lipoamida, que consiste no ácido α-lipóico ligado por uma ligação amida a um grupo ε-amino de um resíduo de lisina e catalisa a reacção 3. O E_3 (di-hidrolipoílo desidrogenase) contém FAD e um persulfureto activo em termos redox e catalisa as reacções 4 e 5.

[5] É conhecido por diversos nomes incluindo ácido tioctico, ácido 1-ditiolano-3-pentanóico, ácido 1,2-ditiolano-3-valérico e ácido 6,8-tioctico.

Mais recentemente, tem sido dada uma grande atenção às possíveis funções antioxidantes do ácido α-lipóico e da sua forma reduzida ácido di-hidrolipóico (ver [23]). Com efeito, o lipoato e o di-hidrolipoato reagem com espécies reactivas de oxigénio como o radical superóxido, radical hidroxilo, ácido hipocloroso, radical peroxilo e dioxigénio singuleto. Parece proteger as membranas da peroxidação lipídica interactuando com o ascorbato e o glutationo, os quais podem regenerar o α-tocoferol (Figura 13). O lipoato pode igualmente funcionar como regulador redox de proteínas como a mioglobina, tiorredoxina, e o factor de transcrição NF-*k*B.

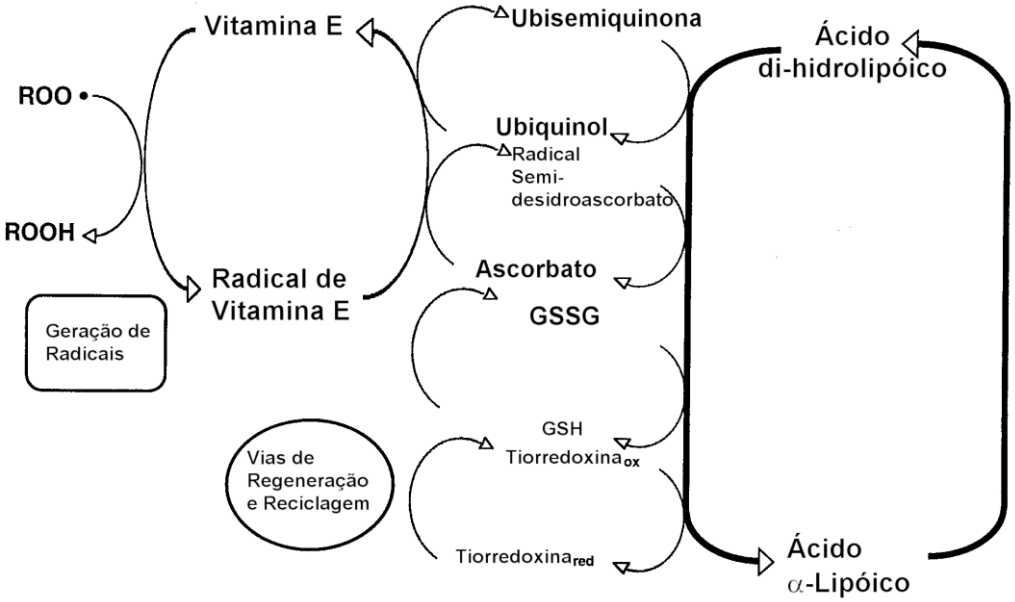


Figura 13. O ácido di-hidrolipoico reduz (recicla) os principais antioxidantes celulares – vitamina C, E, glutationo, tiorredoxina e ubiquinol (adaptado de [23]).

GLUTATIONO

Em 1888, de Rey-Pailhade [24] descobriu, em leveduras, um composto que hidrogenava espontaneamente o enxofre, tendo por isso dado-lhe o nome de *philothion*. Em 1921, Hopkins [25] extraiu a partir do músculo, do fígado e da levedura um composto contendo enxofre para o qual propôs o nome de *glutathione*. Hopkins inicialmente pensou que este composto se tratava de um dipéptido contendo glutamato e cisteína e concluiu que o glutationo[6] era idêntico ao *philothion* descoberto por de Rey-Pailhade. Em 1927, Hunter e Eagles [27] sugeriram que, contrariamente à sugestão inicial de Hopkins, o glutationo não era um dipéptido mas sim um tripéptido. Em 1929, Hopkins [28] provou que o tripéptido continha para além de glutamato e cisteína, glicina. Estudos feitos por Pirie e Pinhey [29], usando métodos electrométricos, e por Kendall *et al.* [30], usando métodos de degradação química levaram à conclusão que a estrutura do glutationo era L-γ-glutamilo-L-cisteínilo-glicina (Figura 14).

[6]A tradução de *glutathione* usada neste trabalho é a de glutationo, embora outros autores usem outros nomes, nomeadamente, glutatião e glutationa [26].

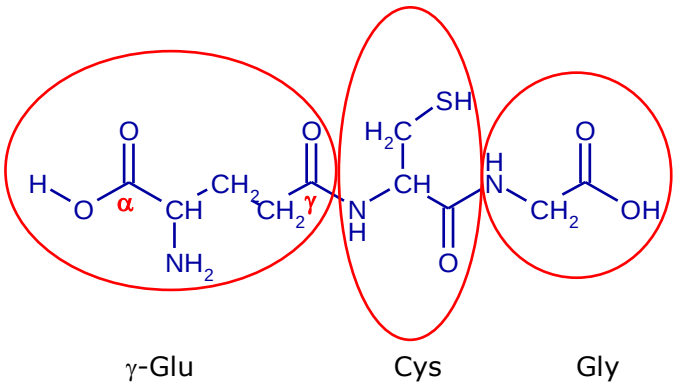


Figura 14. Estrutura do glutationo reduzido (GSH) explicitando-se os resíduos dos aminoácidos constituintes do tripéptido γ-Glu-Cys-Gly (adaptado de [31]).

O glutationo encontra-se largamente distribuído nas células de animais, de plantas e em muitos microorganismos. É o principal tiol não proteico e existe, sobretudo intracelularmente, em concentrações relativamente altas (Tabela 6), com predominância da forma reduzida, que é um tiol (GSH), sobre a forma oxidada, que é um persulfureto (GSSG). Existe igualmente uma quantidade significativa de glutationo sob a forma de persulfuretos mistos, sobretudo com proteínas.

Tabela 6. Concentrações de GSH, GSSG e de persulfuretos mistos do glutationo (GSSR) em amostras biológicas (adaptado de [32]). *Os valores estão expressos em µmole/g de tecido; # valores expressos em µmole/ml)

Fonte	GSH + GSSG	GSH	GSSG	GSSR
Fígado*				
Humano	1,1			
Rato				
Alimentado		7,3	0,020	2,1
Jejum		4,4		
Perfundido	5,6	5,5	0,018	
Hepatócitos isolados		3,1	0,007	
Fetal		3,4		
Murganho		8,6	0,084	
Rim*				
Rato	2,8		0,006	
Murganho		3,3	0,004	
Coração*				
Rato, perfundido		1,1	0,014	
Murganho		0,9	0,006	
Tecido nervoso (rato)*				
Cortex cerebral		2,0	0,014	
Cérebro	1,8		0,002	
Adipócitos (rato)*	3,0		0,001	
Eritrócitos#				
Humanos	2,3		0,004	
Sangue total #				
Humano	1.2			
Rato	1,2		0,002	
Plasma#				
Humanos	0,0003			
Rato	0,02		0,002	0,089
Murganho	0,028			
Bílis (rato)*	2,2	1,4	0,38	

Existem três características na estrutura do glutationo que determinam as suas funções e metabolismo [31]. A primeira característica é o facto de ser um tiol, devido à presença do grupo sulfidrilo no resíduo de cisteína. É este grupo sulfidrilo, o principal responsável pelas muitas e variadas funções biológicas do GSH. A segunda característica, consiste no facto de os resíduos de glutamato N-terminal e de cisteína estarem ligados através de uma ligação péptidica γ e não α. Esta ligação γ-glutamilo é resistente a todos os peptidases intracelulares, sendo apenas quebrada pelo transferase do γ-glutamilo que se encontra na superfície externa de certas membranas celulares. Esta especificidade na degradação confere ao glutationo uma grande estabilidade intracelular (resistência à degradação por peptidases), e determina qual o tipo de células que podem metabolizar o GSH extracelular. Uma terceira característica estrutural com impacto metabólico, é a presença de glicina C-terminal, que protege o péptido da degradação intracelular pelo ciclotransferase do γ-glutamilo e que completa a especificidade estrutural dos enzimas dependentes do GSH. Além disso, a presença de glicina (e simultaneamente de glutamato) ajuda a diminuir a capacidade do GSH complexar metais, fazendo com que a velocidade de autoxidação do seu grupo sulfidrilo seja menor que a velocidade de autoxidação da do grupo sulfidrilo da cisteína [33].

Dentro das diversas funções biológicas do GSH (Figura 15), podem evidenciar-se:

- Armazenamento e transporte de cisteína entre os diversos órgãos [34];
- Tampão redox celular de modo a manter um dado potencial redox tiol/persulfureto [35];
- Sinalização celular [36];
- Desintoxicação de compostos exógenos e endógenos através da formação de conjugados do GSH e de derivados do ácido mercaptúrico [37];
- Protecção contra o *stress* oxidativo actuando como antioxidante, quer através da reacção com radicais [38], quer através da redução de hidroperóxidos catalisada pelos peroxidases do GSH [39];
- Redução de ligações persulfureto de proteínas e de outras moléculas mantendo-as no estado reduzido [40];
- Modulação da actividade de diversos enzimas através de reacções de S-tiolação [8];
- Redução do ácido desidroascórbico (vitamina C) [41];
- Transporte de aminoácidos através de membranas celulares através do ciclo do γ-glutamilo [42];
- Envolvimento na síntese dos leucotrienos [43];
- Diferenciação celular [44];
- Regulação da transcrição do DNA [45];
- Redução de ribonucleótidos a desoxiribonucleótidos [46];
- Cofactor de diversos enzimas por ex. glioxalase, desidrogenase do formaldeído e isomerase do maleilolactoacetato.

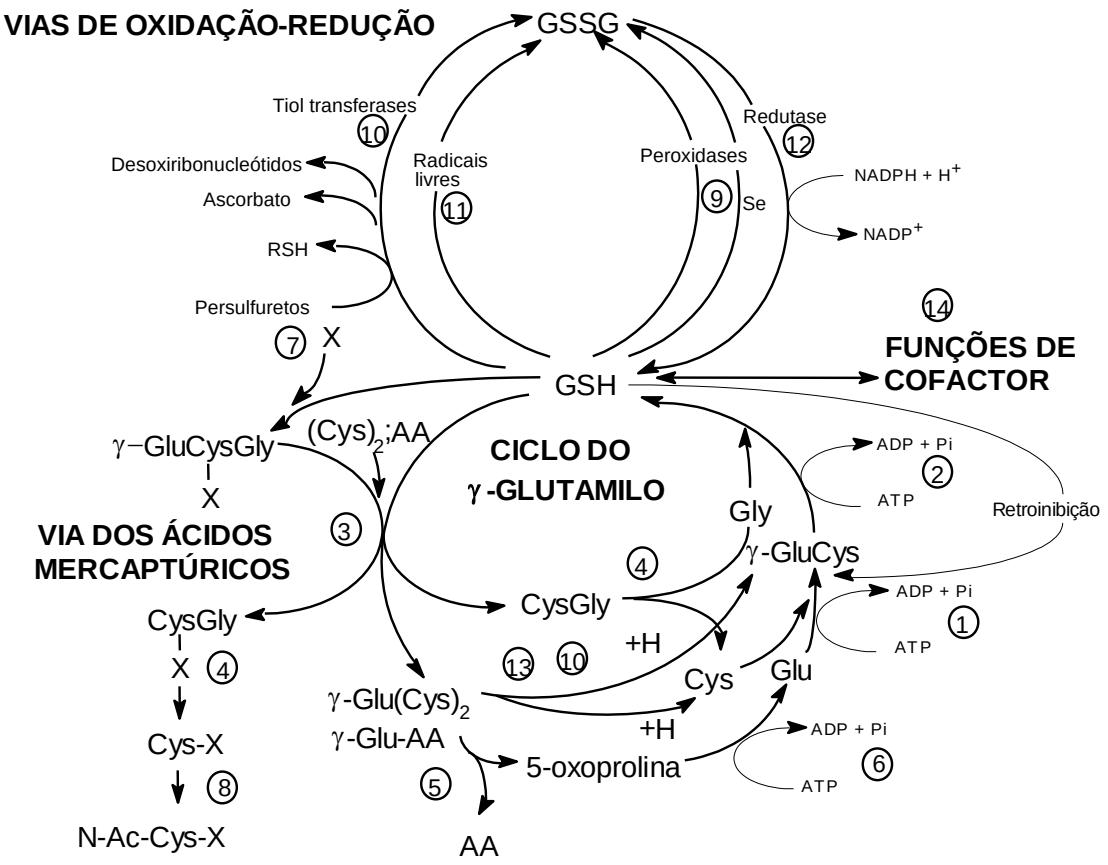


Figura 15. Esquema geral da bioquímica do GSH (adaptado de [47]). AA, aminoácidos; X, compostos que reagem com o GSH para formar conjugados. (1) sintetase da γ-glutamilocisteína, EC 6.3.2.2; (2) sintetase do GSH, EC 6.3.2.3; (3) transferase do γ-glutamilo, EC 2.3.2.2; (4) dipeptidases, EC 3.4.13.11 e aminopeptidase M, EC 3.4.11.2; (5) ciclotransferase do γ-glutamilo, EC 2.3.2.4; (6) 5-oxoprolinase, EC 3.5.2.9; (7) GSH S-transferases, EC 2.3.1.18; (8) transferase do grupo N-acetilo, EC 2.3.1.80; (9) peroxidases do GSH (dependentes do selénio, EC 1.11.1.9 e EC 1.11.1.12 e não-dependentes do selénio); (10) tiol transferases, por ex. glutarredoxina, EC 1.8.4.1; (11) reacção de radicais livres com o GSH; (12) redutase do GSSG, EC 1.6.4.2; (13) transporte da γ-Glu(Cys)$_2$; (14) o GSH é cofactor de diversos enzimas por ex, desidrogenase do formaldeído, isomerase do maleilolactoacetato, glioxalase, isomerases dos endoperóxidos de prostaglandinas.

Absorção e distribuição nos tecidos

O GSH está presente na maioria das plantas e dos tecidos animais usados na dieta humana. Muito deste GSH é biodisponível, pois estudos em ratos demonstraram que o GSH intacto pode ser absorvido pelas células do tracto gastrointestinal, as quais permitem a passagem do GSH do lume para a circulação vascular do intestino delgado, através de sistemas de transporte do GSH para dentro das células, quer dependentes, quer independentes do Na^+ [48].

O GSH é imediatamente oxidado pelo processamento e preparação dos alimentos, e muitos alimentos contém compostos electrófilos reactivos que podem reagir com o GSH, mesmo depois dos alimentos serem ingeridos. Assim, medidas analíticas precisas do conteúdo em GSH dos alimentos apenas fornecem um índice do GSH que entra no tracto gastrointestinal. Além disso, também estão presentes nos alimentos formas oxidadas do GSH como o GSSG que, após redução no intestino pelo GSSG redutase, podem

igualmente ficar biodisponíveis. Os conteúdos em GSH de diversos alimentos representativos estão indicados na Tabela 7.

Tabela 7– Conteúdo total em glutationo de diversos alimentos (adaptado de [49]). Os valores de GSH representam o GSH total recuperado após redução com o ditiotreitol, expresso como média ± erro padrão da média por 100 g de peso fresco.

Alimento	**GSH (mg/100g)**
Vegetais	
Espargos (frescos, cozinhados)	28,3 ± 5,4
Cenouras (cruas)	7,9 ± 1,5
Cenouras (frescas, cozinhadas)	5,8 ± 1,5
Cenouras (enlatadas, aquecidas)	0
Batatas (frescas, cozinhadas)	13,6 ± 2,5
Frutos	
Laranjas (frescas)	7,3 ± 0,8
Sumo de laranja (congelado,	4,2 ± 0,1
reconstituído)	3,3 ± 0,5
Maçãs (frescas)	0
Sumo de maçã (engarrafado)	
Carnes	
Frango (frito)	13,1 ± 2,8
Presunto (fervido)	23,3 ± 6,5
Bife (frito)	17,5 ± 0,8
Bacon (frito)	5,0 ± 0,7
Cereais	
Pão de trigo	1,2 ± 0,4
Arroz	1,6 ± 0,1
Lacticínios	
Leite	0
Queijo	0

Uma vez que o GSH da dieta é apenas uma pequena fracção do total de aminoácidos contendo enxofre da dieta, e que a quantidade de GSH consumida num dia é apenas uma pequena fracção do GSH total do corpo, parece pouco provável que seja detectável um aumento provocado pelo GSH da dieta no GSH sistémico, com a excepção do plasma, onde as concentrações de GSH são baixas [49]. Com efeito, em ratos e em murganhos foram detectados aumentos da concentração plasmática de GSH, mas não na concentração de GSH dos diversos tecidos, após administração oral de GSH [49]. Embora estes aumentos de GSH plasmático após administração oral sejam transientes, podem ser importantes na desintoxicação de espécies reactivas presentes no sangue ou na protecção das superfícies das células contra danos oxidativos. Além disso, o facto de se ter observado que os níveis plasmáticos de GSH eram baixos em doentes com determinadas doenças como o alcoolismo, infecção com o HIV e cirrose hepática, fez aumentar o interesse na possibilidade de aumentar o nível plasmático de GSH através do uso farmacológico de GSH oral. No entanto, em estudos feitos em humanos em que foi dada uma dose oral de 3 g de GSH não se detectou qualquer aumento significativo do GSH plasmático, provavelmente devido às diferenças existentes na actividade do γ-glutamilo transferase hepático a qual nos humanos é cerca de uma ordem de grandeza superior quando comparada com os ratos [50].

Mais importante para a determinação dos níveis de GSH nos tecidos, nomeadamente no fígado, parece ser a quantidade de cisteína e metionina ingeridas na dieta. Nos ratos e em murganhos, o jejum durante 24 h faz decrescer o nível hepático de GSH para cerca de metade; depois de novamente alimentados, o nível volta ao normal ao fim de 4h. Estas variações dos níveis de GSH estão relacionadas com a quantidade de comida e com a quantidade de cisteína (ou metionina) ingerida (Figura 16).

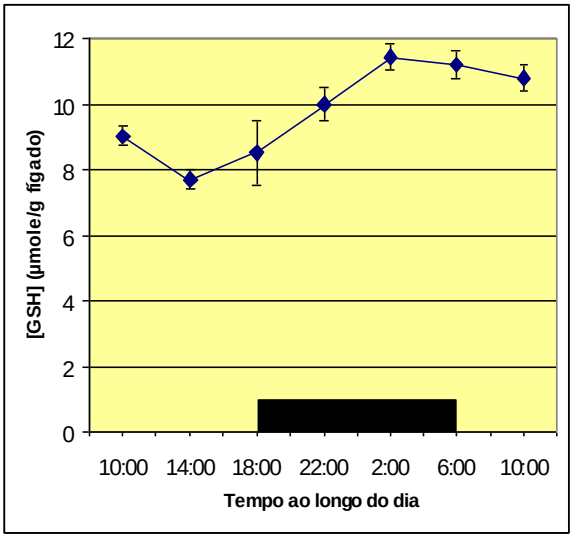


Figura 16. Variação circadiana na concentração hepática de glutationo em murganhos machos (adaptado de [51]). A mancha preta corresponde ao período sem luz em que os murganhos se alimentam.

Biossíntese e biodegradação do GSH

Embora todos os tipos de células possuam uma capacidade aparente de exportar glutationo [52], quer sob a forma de GSH, de GSSG ou de conjugados do GSH, a maior parte das células parece não possuir um sistema para o transporte de glutationo intacto para dentro das células, com a excepção das células do intestino [48] (e possivelmente do rim [53]). Assim, a maioria das células obtêm GSH, indirectamente, através de 3 sistemas (Figura 17) [54]:

1. Hidrólise do GSH extracelular através das reacções catalisadas pelo γ-glutamilo transferase e dipeptidases, formando-se cisteína, glutamato e glicina, seguida da entrada destes aminoácidos nas células através de transportadores (Figura 18) e da sua subsequente utilização para a síntese intracelular do GSH.
2. Formação a partir do GSH extracelular, de γ-glutamilocist(e)ina (preferencialmente) ou de outros γ-glutamiloaminoácidos e de cisteíniloglicina, através da reacção catalisada pelo γ-glutamilo transferase, seguida do seu transporte para dentro da célula, degradação nos aminoácidos constituintes do GSH, e síntese intracelular do GSH. O transporte de GSH extracelular através da membrana ocorre através da reacção de transferência do grupo γ-glutamilo com a cisteína, cistina ou outros aminoácidos.
3. Formação de γ-glutamiloglutationo e cisteíniloglicina a partir do GSH extracelular pela reacção catalisada pelo γ-glutamilo transferase, seguida de transporte e conversão em GSH através da reacção catalisada pelo γ-glutamilociclotransferase.

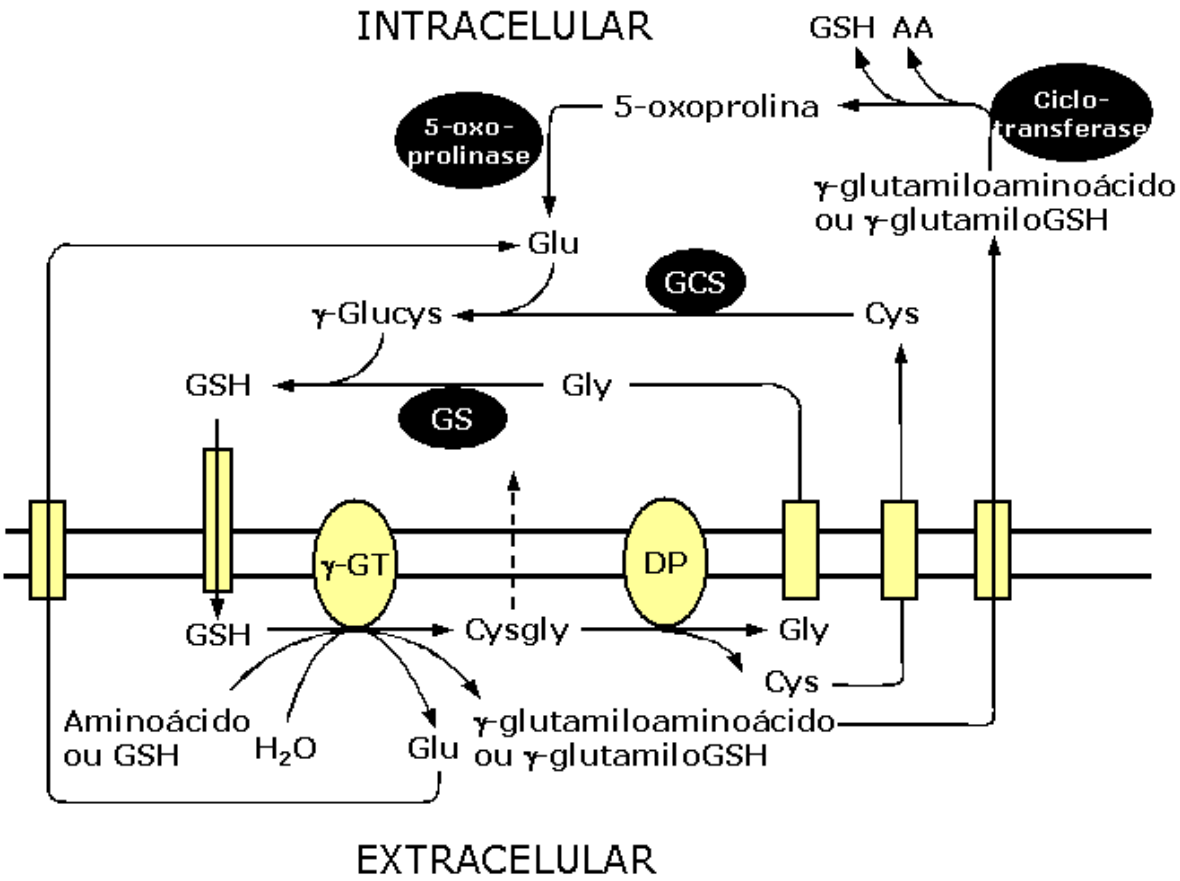


Figura 17. Esquema metabólico da entrada indirecta do GSH para dentro das células, através da membrana plasmática e sua subsequente síntese intracelular (ciclo do γ-glutamilo). γ-GT, γ-glutamilo transferase; DP, dipeptidases; Ciclotransferase, γ-glutamilo ciclotransferase; GCS, γ-glutamilo-cisteína sintetase; GS, GSH sintetase; AA, aminoácido. Estão indicados igualmente os transportadores de GSH, γ-glutamiloaminoácidos, Glu, Gly e Cys.

Deste modo, as células obtêm GSH sobretudo através de síntese feita intracelularmente no citosol, a partir dos seus aminoácidos constituintes. O GSH mitocondrial é obtido por transporte a partir do GSH citosólico. O GSH existente extracelularmente, por exemplo no plasma, é obtido principalmente por exportação do GSH sintetizado dentro dos hepatócitos.

O GSH é sintetizado no citosol a partir dos seus aminoácidos constituintes, L-glutamato, L-cisteína e L-glicina através de duas reacções que envolvem o uso de ATP catalisadas pelo γ-glutamilocisteína sintetase (L-glutamato: L-cisteína γ-ligase, EC 6.3.2.2) e pelo GSH sintetase (L-γ-glutamilo-L-cisteína: glicina ligase, EC 6.3.2.3) (Figura 17) [55;56].

O γ-glutamilocisteína sintetase é constituído por duas subunidades, de 74 kDa (conhecida por H de *Heavy*) e 24 kDa (conhecida por L de *Light*). As duas subunidades ligam-se através de uma ligação persulfureto. A subunidade H é a subunidade catalítica, enquanto que L é a subunidade regulatória [57]. Ao ligar-se à subunidade H baixa o Km para o glutamato e diminui a inibição pelo GSH. A síntese do GSH é regulada pela disponibilidade em cisteína e pela actividade do γ-glutamilocisteína sintetase [55;56]. A cisteína existe intracelularmente em muito menor quantidade que o glutamato e que a glicina e assim, a reacção catalisada pelo γ-glutamilocisteína sintetase parece ser o passo limitante na velocidade de síntese de GSH. Portanto, para a manutenção do GSH em níveis adequados, é da maior importância a concentração intracelular de cisteína. Por outro lado, o γ-glutamilocisteína sintetase, está sujeito a retroinibição não alostérea pelo GSH e pela γ-glutamilocisteína. Esta retroinibição é parcialmente diminuída por conjugados do glutationo [58].

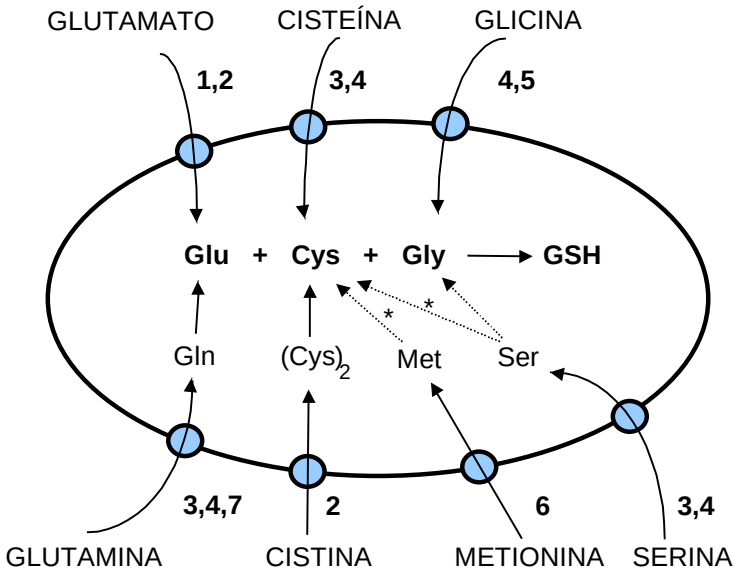


Figura 18. Sistemas de transporte para dentro das células dos aminoácidos percursores do GSH (adaptado de [55]). 1, Sistema X^-_{AG}, dependente do sódio e específico para aminoácidos aniónicos como o aspartato e glutamato; **2**, Sistema X^-_C, independente do sódio e específico para aminoácidos aniónicos como a cistina e glutamato mas não o aspartato; **3**, Sistema ASC, dependente do sódio transporta aminoácidos neutros alifáticos como a alanina, cisteína, serina e glutamina; **4**, Sistema A, dependente do sódio, transporta aminoácidos neutros alifáticos e com pequenas cadeias laterais não ramificadas como a glicina, serina, cisteína e glutamina; **5**, Sistema Gly, dependente do sódio, específico para a glicina; **6**, Sistema L, independente do sódio, específico para aminoácidos neutros com cadeias laterais grandes ramificadas e apolares como por ex. a metionina; **7**, Sistema N, dependente do sódio, específico para aminoácidos contendo cadeias laterais com azoto como por ex. a glutamina; * via da cistationina.

Outro dos modos de aumentar a síntese de GSH é aumentar a expressão do γ-glutamilocisteína sintetase. A expressão do gene que codifica a subunidade H do γ-glutamilocisteína sintetase aumenta em resposta a muitos agentes que provocam a diminuição dos níveis de GSH. Assim, é provável que a regulação transcricional do γ-glutamilocisteína sintetase seja igualmente um elemento importante no controlo da concentração intracelular do GSH [59].

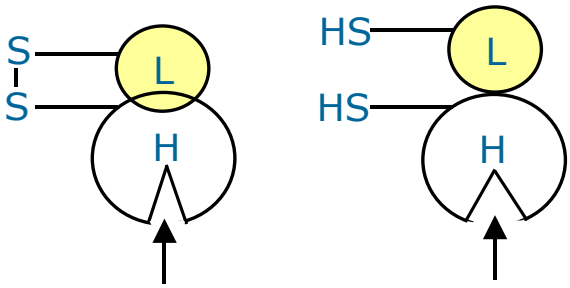


Figura 19. Esquema das formas reduzida e oxidada do γ-glutamilocisteína sintetase (adaptado de [57]). O local de ligação do glutamato está indicado pela seta. O GSH também interactua com este local para além de interactuar noutro local. Os locais de ligação para o glutamato, cisteína e ATP estão localizados na subunidade pesada (H). L, subunidade leve.

Os níveis de GSH do núcleo e dos mitocôndrios são regulados independentemente dos níveis citosólicos. Esta regulação independente é facilmente demonstrada usando

butionina sulfoximida (BSO) um inibidor do γ-glutamilocisteína sintetase. Embora o BSO consiga diminuir os níveis intracelulares totais de GSH em cerca de 90%, os reservatórios de GSH nuclear e mitocondrial são relativamente resistentes à depleção do GSH mediada pelo BSO. O BSO depleta o reservatório citosólico do GSH em 8 h enquanto que o reservatório nuclear só fica depletado às 24 h. Os mitocôndrios não possuem os enzimas necessários à síntese do GSH e importam o GSH do citosol através de transportadores. Estudos recentes indicam que o GSH é transportado através do transportador de dicarboxilatos e através do transportador do oxoglutarato [60].Os mitocôndrios são a principal fonte celular de espécies reactivas de oxigénio uma vez que na cadeia respiratória se forma $O_2^{\bullet -}$, o qual forma H_2O_2 por acção do Mn-superóxido dismutase. Uma vez que a redução do H_2O_2 mitocondrial é feita através do GSH peroxidase, é fundamental o papel do GSH na homeostase mitocondrial.

Contrariamente à síntese, que é feita intracelularmente, a degradação do glutationo (sob a forma de GSH, GSSG e GSH S-conjugados) nos seus aminoácidos constituintes é feita sobretudo extracelularmente. O processo inicia-se com o transporte do glutationo (sob a forma de GSH, GSSG e de conjugados do GSH) para fora das células (Figura 17). A velocidade de exportação é variável conforme o tipo de células, sendo lenta nos linfócitos e nos fibroblastos e rápida nos hepatócitos e nas células renais. O fígado é o principal órgão a exportar glutationo. Com efeito, o transporte de GSH para fora do fígado contribui com mais de 90% do fluxo total de entrada do GSH na circulação e o *turnover* do GSH hepático, no estado basal, é devido quase inteiramente à exportação de GSH do fígado [61]. O fígado exporta tanto GSH como GSSG como GSH S-conjugados mas, na ausência de *stress* oxidativo, ou de ingestão de xenobióticos, a maior parte do glutationo exportado está na forma reduzida. Este GSH do fígado pode ser exportado para o plasma através da membrana sinusoidal e para a bílis através da membrana canalicular. Quanto ao GSSG e GSH S-conjugados são essencialmente exportados para a bílis. Este processo de exportação é mediado por sistemas de transporte e não por difusão [52]. Além disso, parece ser igualmente da maior importância para a obtenção de glutationo por diversos órgãos.

Após o transporte, a degradação é iniciada pela acção do γ-glutamilo transferase (Figura 17), um enzima que se encontra localizado na membrana plasmática e que possui o seu centro activo orientado para o lado exterior da membrana, e que catalisa a transferência do grupo γ-glutamilo do glutationo (GSH, GSSG e conjugados do GSH) para um aceitador, que pode ser a água (hidrólise do glutationo), um aminoácido, ou um péptido (por exemplo, o próprio GSH).

Através desta acção do γ-glutamilo transferase pode formar-se glutamato e cisteíniloglicina quando a água é o aceitador, um γ-glutamiloaminoácido e cisteíniloglicina quando o grupo γ-glutamilo do glutationo é transferido para um aminoácido aceitador, ou γ-glutamiloglutationo e cisteíniloglicina quando o grupo γ-glutamilo do glutationo é transferido para outra molécula de GSH. Entre os aminoácidos aceitadores o melhor parece ser a cistina, embora outros aminoácidos neutros, como a metionina e a glutamina, sejam igualmente bons aceitadores. Pensava-se inicialmente que a reacção de autotransferência do grupo γ-glutamilo seria desprezável para concentrações fisiológicas de glutationo, mas este ponto de vista foi posteriormente posto em causa, quando se descobriu a existência *in vivo* de γ-glutamiloglutationo na bílis e no rim (ver [38]). Quanto às outras duas reacções, a de transferência do grupo γ-glutamilo e a de hidrólise do GSH a sua importância relativa *in vivo* não está totalmente estabelecida (ver [38]).

A cisteíniloglicina pode ser hidrolisada extracelularmente (ou intracelularmente após transporte) formando-se cisteína e glicina através de uma reacção catalisada por dipeptidases ou pelo aminopeptidase M (Figura 17). Por sua vez, o γ-glutamiloaminoácido (ou péptido), após transporte para dentro das células, vai formar 5-oxoprolina numa reacção catalisada pelo ciclotransferase do γ-glutamilo. Finalmente, a 5-oxoprolina é transformada em glutamato numa reacção catalisada pelo 5-oxoprolinase (Figura 17).

O conjunto de seis reacções catalisadas enzimaticamente, responsáveis pela biossíntese e biodegradação do glutationo, constitui um diciclo ao qual foi dado o nome de **ciclo do γ-glutamilo**. O facto do γ-glutamilo transferase se encontrar na membrana e de os outros enzimas do ciclo se encontrarem localizados no citosol levou Alton Meister [42] a

propor em 1973 que estas reacções estão acopladas ao transporte de aminoácidos para dentro das células (sob a forma de γ-glutamiloaminoácidos) em alguns órgãos como, por exemplo, o rim, em que a actividade do γ-glutamilo transferase é alta. No entanto, esta proposta de Meister tem gerado alguma controvérsia. Entre os argumentos a favor do funcionamento do ciclo do γ-glutamilo no transporte de aminoácidos, encontra-se o facto de, *in vivo*, a formação da γ-glutamilocist(e)ína ser catalisada pelo γ-glutamilo transferase, de se ter observado o transporte para dentro de células de rim de γ-glutamilocist(e)ína que é subsequentemente usada para a síntese de GSH e da inibição do γ-glutamilo transferase em monocamadas de células de carcinoma humano resultar numa diminuição da entrada de aminoácidos. Entre os argumentos contra, encontra-se o facto de a inibição do γ-glutamilo transferase não resultar em acidúria devido à acumulação de aminoácidos, e o facto de não diminuir a velocidade de entrada de aminoácidos em vesículas de membranas *brush border* renais, e em células isoladas de hepatomas ascíticos, quando se adicionam inibidores do γ-glutamilo transferase. No eritrócito, também não se observou a entrada de aminoácidos envolvendo a actuação do γ-glutamilo transferase. Outro argumento contra o funcionamento do ciclo do γ-glutamilo no transporte de aminoácidos, é o facto de se gastar demasiada energia, havendo vias mais "económicas" para a célula transportar aminoácidos. Outros autores defendem que, *in vivo*, o γ-glutamilo transferase actua apenas como hidrolase, não havendo formação de γ-glutamiloaminoácidos.

Metabolismo inter-órgãos do GSH

Embora o ciclo do γ-glutamilo possa funcionar num único órgão, também pode ser encarado como funcionando, não num único órgão, mas sim num conjunto de órgãos, nomeadamente o fígado, os rins, os pulmões e o intestino sendo o plasma o meio de transporte do GSH entre os diversos órgãos [31;62-64].

Neste modelo (Figura 20), considera-se que o glutationo está sujeito a um *turnover* constante no corpo, sendo o fígado, rins, intestino e pulmões os principais órgãos responsáveis pela sua homeoestase. O fígado, que tem uma actividade baixa de γ-glutamilo transferase, é um exportador de GSH para o plasma (e para a bílis), enquanto que o rim e outros órgãos, com actividades altas de γ-glutamilo transferase, captam o GSH do plasma para futura utilização. O GSH presente no plasma e na bílis pode suportar os níveis extra-hepáticos de GSH de duas maneiras: (a) o GSH e GSSG podem ser hidrolisados, particularmente pelo γ-glutamilo transferase das membranas *brush border* do rim e do intestino, fornecendo a esses tecidos cisteína, que pode ser utilizada para a síntese de GSH ou que retorna ao fígado; (b) o GSH do plasma pode entrar intacto em determinados epitélios. A contribuição relativa destas duas vias *in vivo* não é clara.

A hipótese de que a exportação de GSH pelo fígado é responsável pelas necessidades dos órgãos periféricos foi demonstrada, por exemplo, em estudos em ratos que foram exercitados até à exaustão [65;66]. Nestes estudos observou-se que à medida que a necessidade do músculo esquelético em GSH aumenta para combater o *stress* oxidativo do exercício, a concentração de GSH do músculo e do fígado diminui, enquanto que os seus níveis plasmáticos aumentam. Do mesmo modo, o jejum aumenta a exportação hepática de GSH, possivelmente para fornecer cisteína aos tecidos periféricos [61]. A libertação e disponibilidade do reservatório hepático de GSH são presumivelmente reguladas por factores hormonais. Com efeito, observou-se que hormonas como a vasopressina, a angiotensina II e a adrenalina aumentam a exportação sinusoidal de GSH [67]. O fígado exporta GSH para o plasma a velocidades próximas da velocidade máxima fornecendo deste modo uma fonte constante de GSH para o plasma. O GSH sintetizado no fígado e exportado para o plasma, através da membrana sinusoidal, é responsável por mais de 90% do GSH presente no plasma [61]. O fígado é praticamente o único órgão a converter eficientemente metionina em cisteína, a qual é rapidamente incorporada no GSH. Assim, Kaplowitz *et al.* [62] propuseram que a libertação hepática de GSH é um mecanismo para estabilizar e transportar cisteína para outros tecidos, a velocidades

aproximadamente constantes, de uma forma independente do fornecimento de cisteína da dieta.

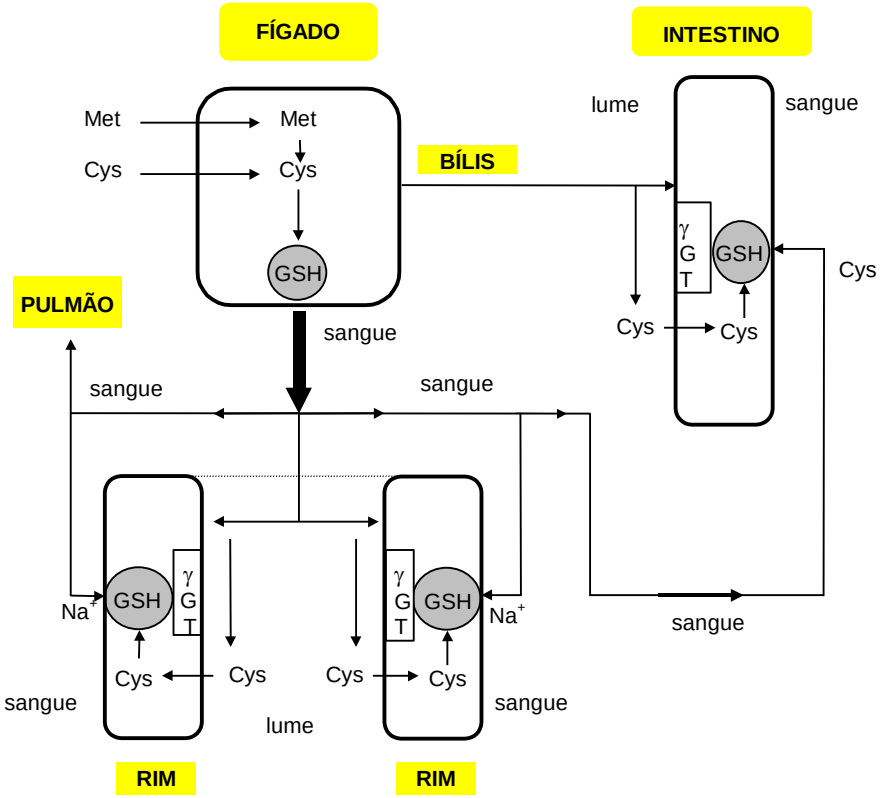


Figura 20. Modelo proposto para explicar a homeoestase inter-órgãos do glutationo no rato (adaptado de [62]). É de notar que neste modelo não se tem em conta a degradação sinusoidal do GSH existente nos humanos, os quais possuem uma maior actividade de γ-GT sinusoidal que o rato. Assim, nos humanos uma parte do GSH exportado pelo fígado é hidrolisado pelo γ-GT e pelos dipeptidases sinusoidais, e a cisteína que se forma retorna ao fígado para nova síntese do GSH [63].

Os rins são responsáveis por cerca de 80% do *clearance* do GSH do plasma [68]. Os rins captam o GSH do plasma, quer através de degradação do GSH pela acção do γ-glutamilo transferase [69], quer através de entrada directa de GSH intacto [53;68]. O pulmão, através do γ-glutamilo transferase, também pode contribuir substancialmente para o *turnover* do GSH do plasma.

Cerca de metade do GSH sintetizado no fígado é exportado para a bílis através da membrana canalicular. O destino e possível função deste GSH são bastante diferentes das do GSH exportado para a corrente sanguínea. Existem diversas funções que o GSH biliar pode desempenhar. O GSH pode ser degradado no tracto biliar e os seus aminoácidos constituintes podem potencialmente ser sujeitos a circulação intra-hepática. Existe uma considerável variação em termos de espécies na extensão da hidrólise do GSH na bílis, a qual é determinada pela expressão do γ-GT e pela velocidade de excreção do GSH (ver [63]. Nos murganhos, ocorre pouca hidrólise durante o trânsito biliar, enquanto que nos coelhos, cobaios e humanos praticamente todo o GSH é hidrolisado antes de entrar no intestino. O GSH excretado para a bílis que não foi hidrolisado, pode também pode ser transportado para o intestino e ser usado para desintoxicar agentes tóxicos presentes no lume intestinal. O GSH pode entrar intacto nos enterócitos. No entanto, não é claro se, em condições fisiológicas, o glutationo presente no lume intestinal entra intacto ou se é degradado extracelularmente pelo γ-glutamilo transferase presente na membrana *brush border* do intestino e depois ressintetizado intracelularmente.

Uma vez que o fígado é uma fonte importante de GSH, o metabolismo de xenobióticos no fígado, que pode diminuir drasticamente a concentração de GSH deste órgão, pode igualmente resultar numa depleção do GSH de outros tecidos.

Oxidação-redução do GSH

Nos sistemas biológicos o GSH oxida-se essencialmente para formar GSSG, de acordo com a reacção:

$$2GSH \rightarrow GSSG + 2H^{+} + 2e^{-} \qquad (5)$$

Todo o enorme interesse despertado pelos estudos de oxidação-redução do glutationo, efectuados em grande parte por Hopkins, veio a diminuir consideravelmente após Hopkins e Elliot (1931) terem publicado um trabalho em que estudavam a oxidação aeróbia do GSH por suspensões de fígado de rato, e outros animais. A velocidade de oxidação que encontraram era apenas uma pequena fracção da respiração do tecido e, por este motivo, deveria representar um aspecto da oxidação dos tecidos diferente da respiração. Estes autores concluíram destes estudos que a oxidação aeróbia observada não era de natureza enzimática e que o catalisador não era uma hemoproteína, o que provava que o GSH não estava envolvido na respiração, o grande tema de investigação em bioquímica na altura. É de notar que a incapacidade de Hopkins e Elliot (1931) de observar qualquer oxidação enzimática do GSH, tinha a ver com os métodos experimentais usados na época os quais tornavam praticamente impossível outra interpretação dos resultados. Só 30 anos mais tarde, foi demonstrada por Pinto [70], a existência de uma oxidação aeróbia do glutationo, que é mais importante que as reacções não enzimáticas, e que não é devida a hemoproteínas, pois forma-se quantitativamente GSSG a partir do GSH, parecendo ser essencialmente devida à catálise pelos GSH peroxidases [71]. Na altura, foi proposta pela primeira vez a existência de um ciclo redox do glutationo no fígado de rato [71].

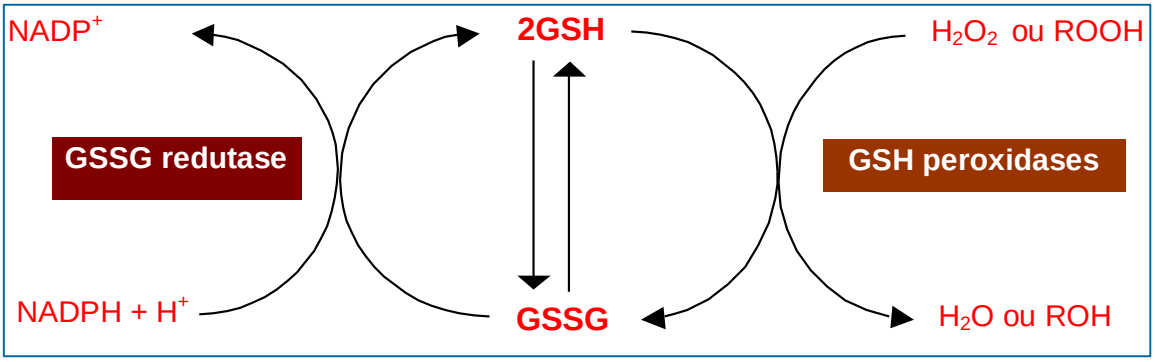


Figura 21. Ciclo redox do glutationo (adaptado de [71]). O GSH é oxidado a GSSG ao reduzir o hidroperóxido de hidrogénio e outros hidroperóxidos orgânicos (ROOH), essencialmente hidroperóxidos de lípidos, numa reacção catalisada pelos GSH peroxidases. O GSSG por sua vez é reduzido pelo NADPH numa reacção catalisada pelo GSSG redutase. O enzima desidrogenase do 6-fosfato de glucose é essencial para este ciclo ao ser o principal responsável pela formação de NADPH *in vivo*. O GSH também se pode oxidar a GSSG através de reacções não enzimáticas.

Entre os vários sistemas celulares de defesa contra o *stress* oxidativo, é extremamente importante o sistema constituído pelo GSH e pelos enzimas dependentes do GSH (GSH peroxidases, GSSG redutase, GSH S-transferases e glutarredoxina) sendo a exportação de GSSG pelas células um dos indicadores da existência de *stress* oxidativo. O papel protector do glutationo é feito, quer através de reacções de captação de radicais, quer através da redução dos hidroperóxidos de lípidos, catalisada enzimaticamente pelos GSH peroxidases, formando-se em ambos os casos GSSG. Como as células necessitam de glutationo na sua forma reduzida, o papel do GSSG redutase e do redutor NADPH é da maior importância, para manter a razão GSH/GSSG. Qualquer alteração desta razão pode

alterar o estado tiol-persulfureto celular o qual pode ter enorme influência no funcionamento das células.

GSH como captor de radicais

Os tióis podem ser facilmente oxidados para formar radicais tiílo ou outros radicais, reduzindo deste modo o agente oxidante. Esta capacidade redutora dos tióis e, sobretudo, do GSH, torna-o um antioxidante eficiente *in vivo*, mas requer a remoção subsequente dos radicais tiílo. Assim, uma das funções do GSH *in vivo* parece ser o de captor de radicais, nomeadamente de radicais centrados no carbono, ou de espécies reactivas de oxigénio ou de azoto (como o $HO^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$, ou $ONOO^-$) actuando de modo a reparar e proteger os constituintes celulares [72]. A captação de radicais pelo GSH dá origem à formação de radicais glutationilo ($GS^{\bullet}$) através da reacção:

$$R^{\bullet} + GSH \rightleftharpoons RH + GS^{\bullet} \qquad (6)$$

Um exemplo típico deste tipo de reacções de doação de hidrogénios pelo GSH é a reparação de radicais de DNA centrados na desoxiribose. O radical glutationilo não é inerte, sendo um oxidante bastante potente ($E^{o\prime}$~0,86 V). Uma vez formado, as reacções biologicamente relevantes do radical glutationilo são: a sua dimerização para formar GSSG (reacção (7)), a reacção de abstracção de átomos de hidrogénio de ácidos gordos poli-insaturados para formar radicais peroxilo (reacção (8)), e as reacções de conjugação com o anião tiolato do glutationo para formar o radical $GSSG^{\bullet-}$ (reacção (9)), ou com o dioxigénio para formar um radical peroxiglutationilo (reacção (10))

$$GS^{\bullet} + GS^{\bullet} \rightarrow GSSG \qquad (7)$$

$$GS^{\bullet} + RH + O_2 \rightarrow GSH + ROO^{\bullet} \qquad (8)$$

$$GS^{\bullet} + GS^- \rightarrow GSSG^{\bullet-} \qquad (9)$$

$$GS^{\bullet} + O_2 \qquad GSOO^{\bullet} \qquad (10)$$

Destas quatro reacções, a mais importante parece ser a conjugação com o anião tiolato, devido à elevada concentração intracelular de GSH (do qual cerca de 1% se encontra sob a forma de GS^- ao pH fisiológico). As reacções de dimerização parecem contribuir pouco para o desaparecimento dos radicais glutationilo, uma vez que é necessária uma elevada concentração de estado estacionário do $GS^{\bullet}$ para haver uma colisão bimolecular. Winterbourn [73] propôs um mecanismo para a remoção do radical glutationilo em sistemas biológicos, o qual envolve a formação do radical $GSSG^{\bullet-}$ (reacção (9)). Este radical é fortemente redutor ($E^{o\prime}$=1,6V) e pode reagir rapidamente com o dioxigénio, formando-se radical superóxido, que depois é removido através da acção dos superóxido dismutases.

$$GSSG^{\bullet-} + O_2 \rightarrow GSSG + O_2^{\bullet-} \qquad (11)$$

Alternativamente, Wardman (ver [72]) propôs que o radical ascorbilo funciona *in vivo* como captador do radical glutationilo através da reacção:

$$GS^{\bullet} + AscH^- \rightleftharpoons Asc^{\bullet-} + GSH \qquad (12)$$

O radical peroxiglutationilo pode reagir com o GSH, formando-se novamente o radical glutationilo, ou então sofrer uma reacção de terminação com outros radicais presentes no sistema:

$$GSOO^{\bullet} + GSH \rightarrow GSOOH + GS^{\bullet} \quad (13)$$

$$GSOO^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow \text{produtos não radicalares} \quad (14)$$

GSH e a peroxidação lipídica

Para além da redução dos primeiros produtos moleculares da peroxidação lipídica, os hidroperóxidos, que é catalisada pelos peroxidases do GSH, o GSH parece estar igualmente envolvido como antioxidante na fase de propagação da peroxidação, actuando em cooperação com o α-tocoferol (vitamina E) e o ascorbato na redução dos radicais peroxilo. Com efeito, o papel protector do GSH na peroxidação lipídica microssomal induzida pelo ferro conduziu à sugestão de esta protecção poder envolver uma cooperação do GSH com a vitamina E na redução dos radicais peroxilo através das reacções:

$$\text{Vit E-OH} + ROO^{\bullet} \longrightarrow \text{Vit E-O}^{\bullet} + ROOH \quad (15)$$

$$\text{Vit E-O}^{\bullet} + GSH \longrightarrow \text{Vit E-OH} + GS^{\bullet} \quad (16)$$

Alguns autores tem sugerido que a redução do radical α-tocoferoxilo (Vit E-O$^{\bullet}$) pelo GSH (reacção (16)), é catalisada pelo enzima radical de vitamina E redutase. No entanto, o ácido ascórbico é muito mais eficiente que o GSH na redução do radical α-tocoferoxilo, e tem sido sugerido que, *in vivo*, o ascorbato é o principal responsável pela redução dos radicais α-tocoferoxilo, formando-se na reacção monodesidroascorbato e desidroascorbato. Neste caso, a contribuição do GSH seria feita através da redução do desidroascorbato a ascorbato. *In vivo*, esta redução pode ser feita não enzimaticamente pelo GSH ou através de catálise enzimática pelos enzimas NADH-monodesidroascorbato redutase e GSH-desidroascorbato redutase (ver [38]).

A redução de hidroperóxidos *in vivo* para além de ser catalisada pelo catalase (que reduz apenas o hidroperóxido de hidrogénio) é catalisada pelos peroxidases do GSH através do chamado ciclo redox do glutationo (Figura 21).

GSH PEROXIDASES

Actualmente estão caracterizados diversos enzimas com actividade de peroxidase do glutationo. Quatro destes enzimas são selenoproteínas, possuindo um resíduo de selenocisteína no seu centro activo:

- uma proteína homotetramérica solúvel intracelular, descoberta em 1957 nos eritrócitos [74], conhecida como glutationo peroxidase dependente do selénio (GPx1, GSHPx; cGSHPx; GPx; cGPx; Se-GPx, [EC 1.11.1.9]);
- uma proteína monomérica intracelular que actua em hidroperóxidos de fosfolípidos, descoberta em 1982 [75], e conhecida como peroxidase do glutationo actuando em hidroperóxidos de fosfolípidos (GPx4; PHGPx, [EC 1.11.1.12]);
- uma proteína homotetramérica glicosilada que se encontra no espaço extracelular, purificada e caracterizada pela primeira vez em 1987 a partir de plasma humano [76] (GPx3; P-GSHPx);
- e uma proteína homotetramérica intracelular existente no tracto gastrointestinal descoberta em 1993 [77] (GPx2; GPx-GI; GSHPx-GI, [EC 1.11.1.9]).

Existem igualmente outros enzimas com actividade de peroxidase do glutationo que não são selenoproteínas. São por isso conhecidos por GSH peroxidases não

dependentes do selénio. Estes enzimas são GSH S-transferases que também têm actividade de peroxidase.

Todos estes GSH peroxidases catalisam a redução do peróxido de hidrogénio e de outros hidroperóxidos de alquilo (ROOH) pelo GSH, de acordo com a reacção:

$$ROOH\ (ou\ H_2O_2) + 2\ GSH \rightarrow ROH\ (ou\ H_2O) + H_2O + GSSG \qquad (17)$$

No caso do GSHPx o mecanismo catalítico está bem estabelecido e envolve alterações redox do resíduo de selenocisteína do centro activo. O primeiro passo da reacção é a oxidação de um selenol ionizado por um hidroperóxido formando-se um derivado selenénico. Para completar o ciclo catalítico, o selenol tem que ser regenerado. Isto parece ocorrer através de duas reacções consecutivas envolvendo um resíduo de ácido selenénico e GSH, com a formação intermediária de um selenopersulfureto entre o enzima e o GSH [78]:

$$E\text{-}CysSe^- + H^+ + ROOH \rightarrow E\text{-}CysSeOH + ROH \qquad k\sim10^7\text{-}10^8\ M^{-1}s^{-1}$$
$$E\text{-}CysSeOH + GSH \rightarrow E\text{-}CysSe\text{-}SG + H_2O \qquad k\sim10^5\text{-}10^6\ M^{-1}s^{-1}$$
$$E\text{-}CysSe\text{-}SG + GSH \rightarrow E\text{-}CysSe^- + GSSG + H^+$$

O GSHPx encontra-se localizado essencialmente no citosol e na matriz mitocondrial. Quanto ao PHGPx, o facto de, durante o seu processo de isolamento, ser necessário o uso de tampões homogenizadores com uma alta força iónica para aumentar a recuperação de actividade na fracção solúvel sugeria a existência de uma ligação iónica às membranas. Além disso, o enzima podia ser extraído, usando um tratamento com força iónica elevada a partir de mitocôndrios, núcleos e fracção microssomal preparados por centrifugação diferencial em sacarose. Após estudos feitos em diversos tecidos concluiu-se que o enzima, embora actue em membranas, é sobretudo citosólico. No entanto, em mitocôndrios de cérebro de rato está sobretudo localizado na membrana interna. No testículo de rato o enzima foi igualmente detectado em membranas, nomeadamente no mitocôndrio onde se encontra localizado nos locais de contacto entre a membrana interna e externa.

O GSHPx apesar de ser extremamente específico para o substrato tiólico (o GSH é o único substrato biológico com que a velocidade de reacção é apreciável), não o é para os hidroperóxidos (ver Tabela 8). Entre os hidroperóxidos que não são substratos do enzima, incluem-se o 25-hidroperoxicolesterol, o 5α-hidroperoxicolesterol, os hidroperóxidos de trilinoleína e de dilinoleína e os hidroperóxidos de fosfatidilocolina e cardiolipina. Neste último caso a actuação do GSHPx parece necessitar da actuação prévia do fosfolipase A_2 [EC 3.1.1.4]. O GSHPx-GI parece ter uma especificidade semelhante à do GSHPx

O facto do PHGPx ser uma selenoproteína com uma massa molecular (cerca de 20 kDa) semelhante às unidades polipéptidicas monómeras do GSH Px fez levantar inicialmente a hipótese de se tratar de uma cadeia polipéptidica monómera do GSH Px que teria a capacidade de reagir com hidroperóxidos de fosfolípidos. No entanto, resultados posteriores vieram a por esta hipótese em causa. Com efeito, a sequência de aminoácidos do PHGPX é bastante diferente da do GSHPx sendo a homologia de apenas 35%. Quando se alinha a sequência de aminoácidos do PHGPx com a de outros GSH peroxidases dependentes do selénio, nota-se a falta das zonas de interacção das subunidades do GSHPx identificadas por cristalografia de Raios X, e as energias de interacção das subunidades calculadas para o GSHPx bovino são consideravelmente superiores às calculadas para um modelo molecular do PHGPx. Parece razoável considerar que a natureza monomérica do PHGPX é a razão, tanto da sua capacidade de reagir com hidroperóxidos volumosos, como da sua afinidade com biomembranas. Por outro lado, os dois resíduos de arginina envolvidos na orientação do GSH no centro activo do GSH Px e do GSH Px do plasma estão mutados ou ausentes no PHGPx. Uma vez que o mecanismo de ligação do GSH proposto para o GSH Px depende da presença de pelo menos dois resíduos de arginina, o PHGPx deve ligar-se ao GSH de modo diferente. Com efeito, o PHGPx parece ser menos específico para o substrato tiólico que o GSH Px e apesar de, tal

como acontece com o GSH Px, o GSH ser o melhor substrato dador, também aceita como substratos dadores, o mercaptoetanol, a cisteína, a cisteamina, a ergotioneina, a di-hidrolipoamida e o di-hidrolipoato (ver [38]).

Contrariamente ao GSHPx, o PHGPx tem actividade de peroxidase do GSH sobre hidroperóxidos de diacilofosfolípidos. Na Tabela 8 é apresentada uma lista dos substratos aceitadores do PHGPX actualmente conhecidos. O enzima reduz todos os hidroperóxidos de lipossomas, de "ghosts" de eritrócitos e de lipoproteínas o que sugere que este tem pouca especificidade em relação aos vários tipos de hidroperóxidos existentes nas membranas.

Tabela 8 - Hidroperóxidos que são substratos do GSHPx e do PHGPx (adaptado de [38]). ND: não determinado

	Substratos do GSHPx	**Substratos do PHGPx**
Hidroperóxido de hidrogénio	+	+
Hidroperóxido de etilo	+	ND
Hidroperóxido cumeno	+	+
Hidroperóxido de t-butilo	+	+
Hidroperóxido do ácido linoleico	+	+
Hidroperóxido do ácido linolénico	+	+
Hidroperóxido de metilo linoleato	+	+
Hidroperóxido de 1-monolinoleina	+	
Hidroperóxido de linoleato de colesterilo	+	+
Hidroperóxido de linolenato de etilo	+	+
Hidroperóxido de linoleílolisofosfatidilocolina	+	ND
Hidroperóxido de fosfatidilocolina	-	+
Hidroperóxido de fosfatidiloetanolamina	-	+
Hidroperóxido de fosfatidiloserina	-	+
Hidroperóxido de cardiolipina	-	+
Hidroperóxido do ácido fosfatídico	-	+
5α-hidroperoxicolesterol	-	+
7α-hidroperoxicolesterol	-	+
7β-hidroperoxicolesterol	+	+
Hidroperóxidos de ésteres do colesterol	-	+
Hidroperóxidos de valina	+	
Hidroperóxido de albumina	+	
Hidroperóxido de prolilovaliloglicina	+	
5-hidroperoximetilo uracilo	+	
DNA peroxidado	+	
Prostaglandina G_2	+	
15-hidroperoxiprostaglandina E_1	+	
17α-hidroperoxiprogesterona	+	
17α-hidroperoxialopregnanolona	+	
17α-hidroperoxipregnanolona	+	
Hidroperóxido de timina		+

Entre os hidroperóxidos aceites como substratos pelo P-GSHPx encontram-se os hidroperóxidos de hidrogénio, de t-butilo, do ácido linoleico, do ácido araquidónico e da fosfatidilocolina mas não o hidroperóxido de linoleato de colesterilo e hidroperóxido de colesterol. O facto da concentração de GSH no plasma ser muito baixa (cerca de 10-20 µM), sugeria que *in vivo* poderiam haver outros redutores, que não o GSH, substratos do GSHPx extracelular. Recentemente descobriu-se que o NADPH e a tiorredoxina, na ausência ou na presença de tiorredoxina redutase, são dadores de electrões eficientes para o P-GSH Px [79]. O mesmo parece acontecer com a glutarredoxina.

Uma vez que os GSH peroxidases são selenoproteínas, a sua biossíntese depende da disponibilidade em selénio. Quando a concentração de selénio é limitante observa-se uma incorporação preferencial em algumas das selenoproteínas existentes nos organismos. Pensa-se que as selenoproteínas cuja actividade se mantém mais estável durante situações de deficiência de selénio são mais importante metabolicamente que aquelas cuja actividade diminui rapidamente. Por outro lado, a síntese de certas selenoproteínas durante a deficiência em selénio é acompanhada por uma diminuição dos

níveis dos mRNAs respectivos, devido a uma diminuição de estabilidade dos mRNA. Esta estabilidade diferencial dos mRNA contribui para uma síntese preferencial de determinadas selenoproteínas. Estudos envolvendo a estabilidade do mRNA dos GSH peroxidases e a deplecção destas proteínas em situações de deficiência de selénio e a velocidade de ressíntese após repleção de selénio demonstraram através destes critérios a importância relativa dos GSH peroxidases é [80]:

GI-GSHPx > PHGPx > P-GSHPx = GSHPx

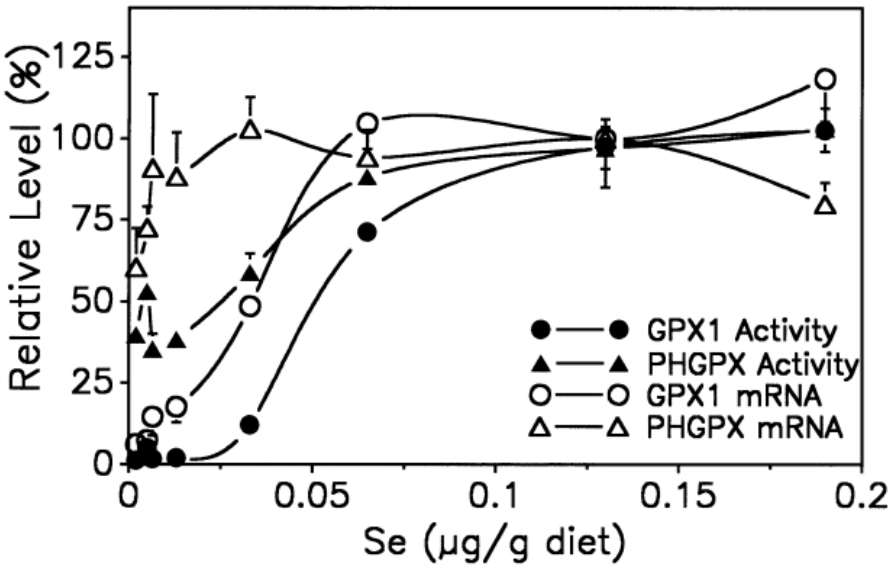


Figura 22. Actividades e níveis de mRNA do GSHPx e PHGPX em função da concentração de selénio na dieta [81].

Em termos de funções biológicas pensa-se que o GSHPx tem um papel fundamental e complementar ao catalase na redução do peróxido de hidrogénio. Estudos com murganhos *knockout* em GSHPx [82], demonstraram que o GSHPx está sobretudo envolvido na protecção contra o *stress* oxidativo, sendo o principal enzima antioxidante em mamíferos. Com efeito, apesar dos murganhos *knockout* em GSHPx terem um crescimento e desenvolvimento normais, indicando um papel limitado para o GSHPx em condições fisiológicas, na presença de paraquat os murganhos *knockout* morrem enquanto que os murganhos normais conseguem resistir a níveis elevados de *stress* oxidativo (Figura 23).

Quanto aos hidroperóxidos de diacilofosfolípidos formados pela peroxidação lipídica nas membranas celulares, tem sido sugerido que esta redução é catalisada, ou pelo GSH Px, após uma actuação prévia do enzima fosfolipase A_2 (os hidroperóxidos de diacilofosfolípidos não são substratos do GSHPx), ou então pelo PHGPx, sendo que o PHGPx parece ter o papel predominante devido à baixa actividade dos fosfolipases A_2 [83]. Para além de um papel fundamental na redução de hidroperóxidos de fosfolípidos, nos últimos anos tem sido proposto para o PHGPx, o principal GSH peroxidase presente no testículo, um papel importante na espermatogénese [84]. O GI-GSHPx parece representar uma primeira linha de defesa contra os hidroperóxidos ingeridos na dieta, enquanto que o P-GSHPx parece ter a função de linha de defesa contra a transferência de hidroperóxidos do meio extracelular para as células [80].

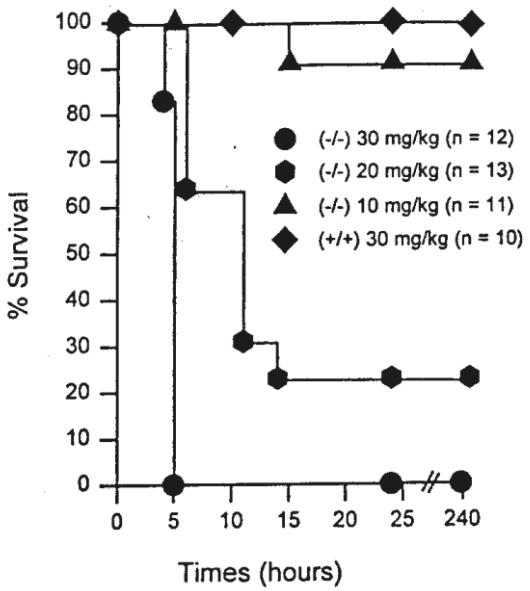


Figura 23. Sobrevivência de ratos normais (+/+) e *knockout* em GSHPx (-/-) na presença de diversas doses de paraquat [82]. O paraquat forma radical superóxido através de ciclos redox.

Nos últimos anos o paradigma dos hidroperóxidos enquanto apenas compostos tóxicos para as células modificou-se tendo começado a ser encarados como compostos com um papel importante na sinalização celular (por exemplo na activação do NF-κB mediada pelo TNF e pela IL-1), no desencadear da apoptose, e na proliferação e diferenciação celular. Assim pode acontecer que não seja vantajoso para as células a remoção total dos hidroperóxidos, mas sim a manutenção de uma certa concentração de hidroperóxidos. Assim, uma das principais funções dos GSH peroxidases parece ser a regulação de processos celulares modulados por hidroperóxidos (ver [80]).

GLUTATIONO REDUTASE

O GSSG formado nas reacções catalisadas pelos peroxidases do GSH é reduzido numa reacção dependente do NADPH catalisada pelo GSSG redutase (GSSG: NADPH oxidoredutase [EC 1.6.4.2]):

$$GSSG + NAD(P)H + H^+ \rightarrow 2\ GSH + NAD(P)^+ \qquad (18)$$

Nas células, o GSSG redutase encontra-se predominantemente no citosol, embora também esteja presente na matriz mitocondrial, fracção microssomal e núcleo. O enzima é uma flavoproteína com uma massa molecular de 44 kDa (enzima do fígado de rato). Observou-se que o GSSG redutase do fígado de rato, é inibido pelo GSH em concentrações fisiológicas, tendo-se sugerido que esta inibição permite uma manutenção controlada da razão GSH/GSSG [85]. Observou-se também a inibição competitiva deste enzima por conjugados do GSH [86], o que conduz a uma alteração da razão GSH/GSSG.

GSH e o estado tiol/persulfureto das proteínas

Os grupos sulfidrilo e as ligações persulfureto das proteínas têm frequentemente papéis fundamentais, quer em termos de catálise, quer em termos estruturais. Consequentemente, modificações no estado redox tiol/persulfureto de uma proteína podem estar associadas com alterações na sua actividade biológica, uma vez que os

resíduos de cisteína devem manter-se, ou sob a forma de tiol, ou sob a forma de persulfureto para uma actividade óptima. Um tampão redox tiol/persulfureto é uma solução de um tiol e da sua forma persulfureto que influencia, em parte, o estado redox de proteínas tiólicas que são expostas a este tampão [35]. Na maioria dos organismos, o par 2GSH/GSSG é o principal tampão redox celular devido à sua alta concentração, embora existam outros tampões redox celulares, como a tiorredoxina e a glutarredoxina, que podem ter papéis importantes na manutenção do estado redox das proteínas [35]. Assim, mudanças no estado tiol/persulfureto do glutationo constituem um sinal metabólico que pode modular as actividades biológicas de proteínas alvo específicas.

Em meio aeróbio, os grupos sulfidrilo, quer de compostos de baixa massa molecular, quer de proteínas, tendem a oxidar-se. Assim, as proteínas do meio extracelular, ou das superfícies das células, são ricas em persulfuretos que as estabilizam, como reflexo das condições oxidantes. Contudo, intracelularmente, os tióis têm geralmente de ser mantidos no estado reduzido e as proteínas intracelulares contém muitos grupos sulfidrilo, sendo raros os persulfuretos. Os grupos sulfidrilo dos resíduos de cisteína das proteínas podem ser oxidados formando-se persulfuretos, mas também se podem formar ácidos sulfénicos (PSOH), sulfínicos (PSO_2H) ou sulfónicos (PSO_3H) [8]. Enquanto que a oxidação para formar persulfuretos ou ácidos sulfénicos é reversível, o mesmo não acontece quando há oxidação para formar ácidos sulfínicos e sulfónicos os quais representam estados de oxidação bastante estáveis que não são reduzidos novamente a cisteína em condições biológicas relevantes.

Nas proteínas oxidadas podem ocorrer dois tipos essenciais de persulfuretos: persulfuretos intramoleculares entre dois resíduos de cisteína de uma proteína, e persulfuretos mistos intermoleculares entre um resíduo de cisteína de uma proteína e outro tiol (proteínas S-tioladas). Nas células, uma vez que o glutationo é o principal tiol não proteico, formam-se sobretudo persulfuretos mistos com o glutationo (proteínas S-glutatioladas). A quantidade de proteínas S-glutatioladas (Proteína-SSG) é essencialmente controlada pelo ambiente redox celular e aumenta, por exemplo, em condições de *stress* oxidativo. A formação de proteínas S-glutatioladas é feita através de dois mecanismos possíveis: pela reacção entre grupos SH das proteínas e o GSSG através de uma troca tiol-persulfureto (reacção (19)) ou, alternativamente, pela reacção do GSH com radicais tiílo (reacção (20)) ou com ácidos sulfénicos (reacção (21)), formados devido à oxidação de resíduos de cisteína por um ou por dois electrões respectivamente.

$$\text{Proteína-SH} + \text{GSSG} \rightleftharpoons \text{Proteína-SSG} + \text{GSH} \qquad (19)$$

$$\text{Proteína-S}^{\bullet} + \text{GS}^{-} + O_2 \rightarrow \text{Proteína-SSG} + O_2^{\bullet -} \qquad (20)$$

$$\text{Proteína-SOH} + \text{GSH} \rightarrow \text{Proteína-SSG} + H_2O \qquad (21)$$

As reacções de troca tiol-persulfureto são reacções reversíveis que ocorrem em dois passos com a formação de persulfuretos mistos como intermediários, havendo uma troca de equivalentes redox entre diferentes pares tiol/persulfureto, que resulta na oxidação de um tiol (R_1SH) e na redução de um persulfureto (R_2SSR_2). A reacção envolve um ataque nucleófilo pelo anião tiolato (RS^-) a um dos dois enxofres da ligação persulfureto, e a velocidade da reacção é dependente da natureza do ião RS^-.

$$\begin{array}{c} R_1SH + R_2SSR_2 \rightleftharpoons R_1SSR_2 + R_2SH \\ R_1SSR_2 + R_1SH \rightleftharpoons R_1SSR_1 + R_2SH \\ \hline 2R_1SH + R_2SSR_2 \rightleftharpoons R_1SSR_1 + 2R_2SH \end{array} \qquad (22)$$

A constante de equilíbrio para a reacção (19) é dada pela equação (22) e representa a estabilidade termodinâmica do persulfureto misto quando comparado com a estabilidade do GSSG. Quanto mais estável o persulfureto misto comparado com o GSSG maior o valor da constante de equilíbrio (K_{mix}). Assim, K_{mix} representa o potencial de oxidação para a oxidação de um tiol proteico pelo GSSG.

$$K_{mix} = \frac{[\text{Proteína}-\text{SSG}][\text{GSH}]}{[\text{Proteína}-\text{SH}][\text{GSSG}]} \quad (23)$$

O mecanismo de formação de proteínas S-glutatioladas através de reacções de troca tiol-persulfureto com o glutationo pode ter relevância em situações de *stress* oxidativo associadas com uma mudança pronunciada na razão [GSH]/[GSSG]. Em diversos modelos de *stress* oxidativo, modificações transientes na razão [GSH]/[GSSG] para valores da ordem dos 10, ou mesmo 1, podem ocorrer e, estas alterações correlacionam-se com a quantidade de persulfuretos mistos proteicos presentes nas células. Embora tenha sido sugerido que as interacções específicas GSH-proteínas deslocam o equilíbrio do persulfureto misto com a proteína na direcção da espécie S-tiolada, as constantes de equilíbrio (K_{mix}) para a maioria das proteínas são geralmente $\approx$1 [87]. Este facto indica que é pouco provável a ocorrência de S-glutatiolação dependente do GSSG como resposta a mudanças na razão [GSH]/[GSSG] dentro de um intervalo relevante para o *stress* oxidativo (ou seja, 100>[GSH]/[GSSG]>10) [8]. No entanto, descobriu-se muito recentemente que o factor de transcrição c-Jun é uma das excepções a esta regra. O local de ligação ao DNA do c-Jun contem uma cisteína com uma função criticamente importante que tem um K_{mix} de 13, ou seja, 50% da proteína fica S-glutatiolada para uma razão [GSH]/[GSSG]=13 [88].

Quanto ao mecanismo alternativo de formação de proteínas S-glutatioladas através da oxidação de resíduos de cisteína por ERO seguida de reacção com o GSH, ele foi proposto devido ao facto de se ter observado em células, usando diversos modelos de geração de ERO, a formação de proteínas S-glutatioladas mesmo quando não ocorriam alterações detectáveis na razão [GSH]/[GSSG]. Recentemente foi demonstrado que o resíduo de cisteína presente no centro activo de um fosfatase de tirosina proteica (PTP-1B) pode ser oxidado pelo H_2O_2 e pelo $O_2^{\bullet-}$ para formar um sulfenato instável, que é rapidamente convertido num persulfureto misto com o GSH, o qual é bastante mais estável [89].

Uma vez acabado o *stress* oxidativo, a inversão do processo de S-tiolação ocorre rapidamente nas células, através da inversão da reacção (19), sendo o persulfureto misto reduzido pelo GSH e formando-se GSSG o qual é reduzido pelo NADPH numa reacção catalisada pelo GSSG redutase. Esta destiolação também pode ocorrer através de catálise enzimática feita pelos proteína-persulfureto oxidoredutases.

A S-glutatiolação reversível tem um papel importante na protecção dos tióis proteicos ao impedir a sua oxidação irreversível a ácidos sulfínicos e sulfónicos, que pode levar à perda de actividade biológica. Por outro lado, cada vez mais tem-se vindo a desenvolver o paradigma da S-glutatiolação de proteínas como um mecanismo através do qual as proteínas são reguladas pelas mudanças do ambiente redox celular e pela geração de espécies reactivas de oxigénio. Estudos com células e *in vitro* têm levado à identificação de um número cada vez maior de proteínas que ficam S-tioladas durante o *stress* oxidativo e cujas funções biológicas são moduladas por S-tiolação.

TIOL:PERSULFURETO OXIDOREDUTASES

As reacções de troca tiol-persulfureto ocorrem espontaneamente a pH 7, mas foram descobertos enzimas que catalisam essas reacções, os tiol:persulfureto oxidoredutases. Dentro destes enzimas estão incluídos o tioltransferase (glutarredoxina) [EC 1.8.4.1], o proteína persulfureto isomerase [EC 5.3.4.1] e o sistema tiorredoxina/tiorredoxina redutase.

Tiol transferase (glutarredoxina)

Em 1955, Racker identificou um enzima citosólico em homogenatos de fígado de rato com a capacidade de reduzir ligações persulfureto. Estudos subsequentes associaram esta actividade com o tioltransferase, uma proteína citosólica com cerca de 11 kDa possuindo um centro activo característico contendo um ditiol. Mais recentemente, foi proposto que, devido à sua homologia estrutural, o tioltransferase e glutarredoxina eram nomes alternativos para o mesmo enzima. A glutarredoxina (Grx) é uma proteína, que foi descoberta em 1976 no *E. coli* e que possuía actividade de dador de átomos de hidrogénio (dependente do GSH) para o ribonucleótido redutase. É comum usar o nome de sistema da glutarredoxina colectivamente para o NADPH, glutationo redutase, GSH e glutarredoxina. O sistema da glutarredoxina parece ser específico para a redução de proteínas S-glutatioladas e foi proposto que este sistema tem o principal papel *in vivo* nas reacções de destiolação de proteínas [90].

Sistema tiorredoxina/tiorredoxina redutase

As tiorredoxinas (Trx) são pequenas proteínas (12 kDa) multifuncionais (Figura 24), com actividade de oxidoredutases existentes, quer em células de mamíferos, quer em procariotas. As tiorredoxinas contêm um ditiol no centro activo e, juntamente com o tiorredoxina redutase (TrxR), catalisam a redução, dependente do NADPH, de persulfuretos de diversas proteínas. Na presença de uma proteína contendo ligações persulfureto, o sistema da tiorredoxina (tiorredoxina, NADPH e tiorredoxina redutase) catalisa as reacções:

$$\text{Trx(SH)}_2 + \text{proteína-S}_2 \rightarrow \text{Trx-S}_2 + \text{proteína-(SH)}_2 \qquad (24)$$

$$\text{Trx-S}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{Tiorredoxina redutase}} \text{Trx(SH)}_2 + \text{NADP}^+ \qquad (25)$$

Nos humanos existe uma tiorredoxina citosólica (Trx1) e uma mitocondrial (Trx2). Todas as tiorredoxinas que se conhecem possuem a mesma estrutura tridimensional ("thioredoxin fold") (Figura 25a). Esta consiste num cerne central de 5 folhas β rodeadas por quatro hélices α, e uma sequência típica no centro activo –Cys-Gly-Pro-Cys-, que está localizada no término de uma folha β (β_2) e no início de uma longa hélice α (ver [91]) . O resíduo de cisteína N-terminal do centro activo tem um valor de pKa baixo[7] actuando como nucleófilo na redução dos persulfuretos das proteínas. O mecanismo envolve um persulfureto misto transiente como intermediário e uma troca de tiol-persulfureto rápida num ambiente hidrófobo. A reacção é reversível e a tiorredoxina pode reduzir ou formar persulfuretos dependendo do potencial redox do seu substrato. O baixo potencial redox da tiorredoxina (-270 mV no caso da Trx de *E. coli*), assegura que a tiorredoxina reduzida seja o principal redutor ditiólico no citosol (ver [91]). Entre os persulfuretos proteicos que são alvos específicos da Trx incluem-se os enzimas ribonucleótido redutase e proteína persulfureto isomerase e diversos factores de transcrição, incluindo o p53, NF-κB e o AP-1 (via Ref-1). A Trx também é um dador de electrões específico para muitos peroxirredoxinas (tiorredoxina peroxidases), enzimas que reduzem hidroperóxidos. A Trx reduzida também inibe a apoptose através de uma ligação ao cinase regulador do sinal apoptótico 1 (ASK-1), ligação esta que deixa de existir quando a Trx está oxidada [91] (Figura 24).

[7] A cisteína tem um pKa de 8,35. No entanto, os resíduos de cisteína nas proteínas podem ter valores de pka bastante mais baixos devido ao ambiente electrostático que os rodeiam. Assim, muitos resíduos de cisteína estão ionizados ao pH fisiológico, sendo por isso muito mais reactivos.

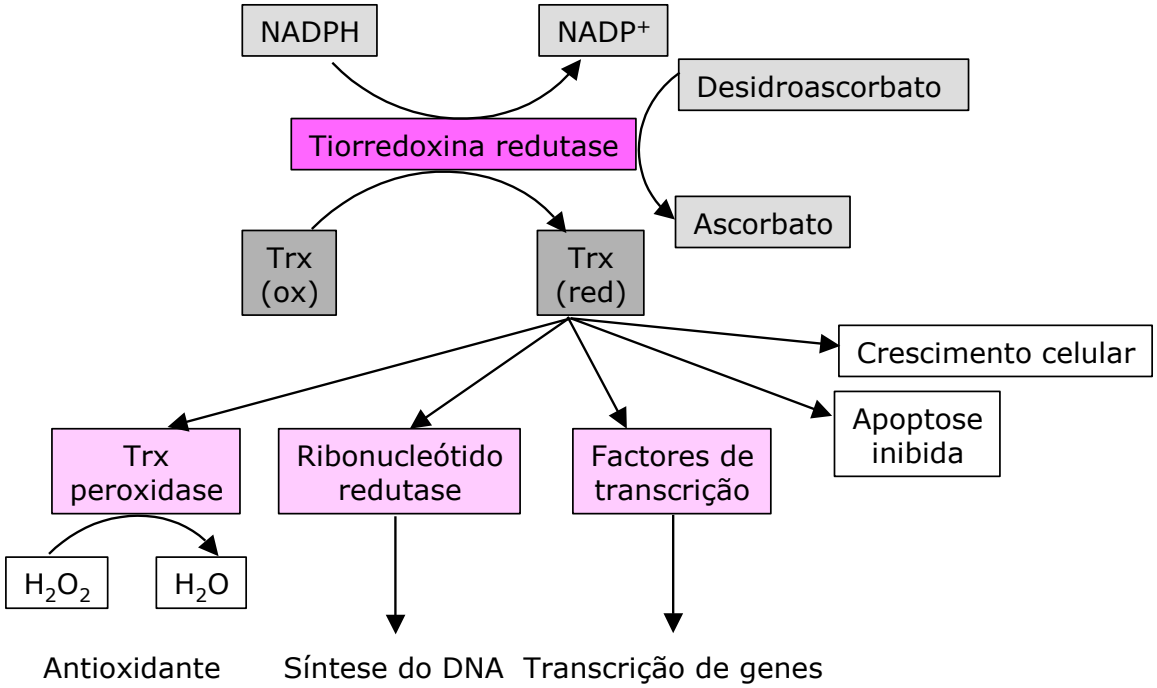


Figura 24. Funções do sistema tiorredoxina/tiorredoxina redutase (adaptado de [92]).

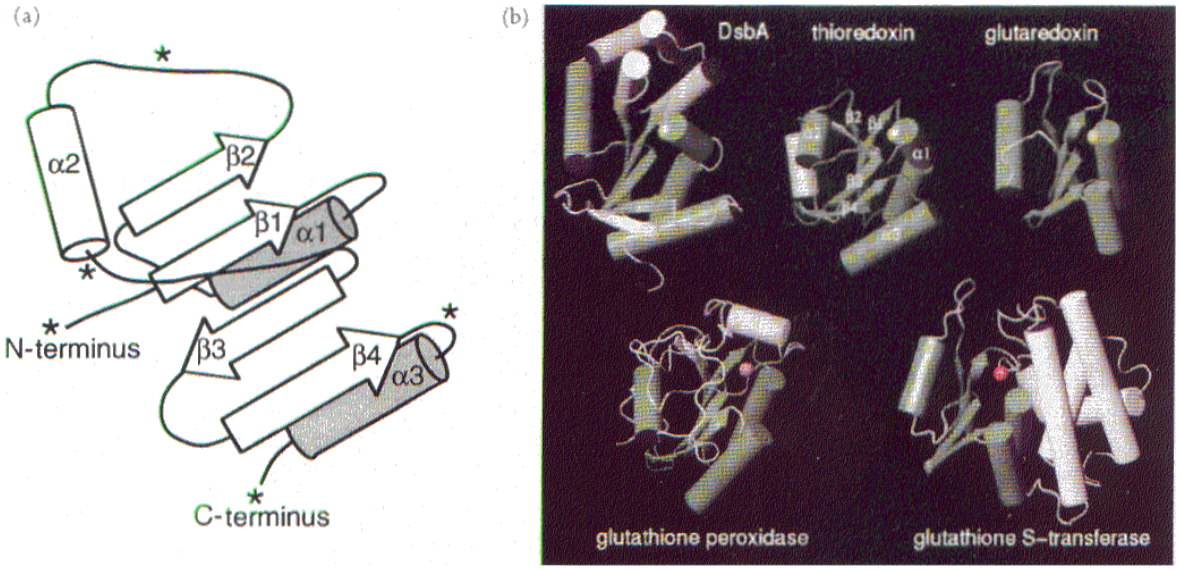


Figura 25. A superfamília das tiorredoxinas [93]. Composição estrutural de cinco proteínas contendo um "thioredoxin fold". (a) O enrolamento tioredoxina consiste em cerca de 80 resíduos de aminoácidos e envolve folhas β (β1-4) e hélices α (α1-3). Um motivo N-terminal β1α1β2 está ligado a um motivo C-terminal β3β4α3 através de um *loop* de resíduos contendo igualmente uma hélice α2. (b) Comparação estrutural de cinco proteínas demonstrando a presença de enrolamentos tipo tiorredoxina (a cinzento).

Existe uma grande superfamília de proteínas que contêm um ou mais domínios tipo tiorredoxina. Tais proteínas contendo um enrolamento tipo tiorredoxina ("thioredoxin fold") existem em todos os organismos e podem ser agrupadas em pelo menos seis classes: tiorredoxinas, glutarredoxinas, DsbA, proteína persulfureto isomerase, glutationo transferases e glutationo peroxidases [94]. Embora a homologia de sequência entre estas

seis classes de proteínas seja limitada e as suas funções ou actividades não sejam as mesmas, existe uma semelhança funcional comum a quatro dos seus membros. As tiorredoxinas, glutarredoxinas, DsBA e proteína persulfureto isomerases são todas proteínas com actividade redox contendo o motivo –Cys-Xaa1-Xaa2-Cys- no centro activo (em que Xaa representa qualquer dos 19 aminoácidos que ocorrem naturalmente com a excepção da cisteína). Além disso, as duas classes remanescentes, os glutationo transferases e os glutationo peroxidases, embora não possuam o motivo –Cys-Xaa1-Xaa2-Cys- no centro activo, partilham com as glutarredoxinas uma interacção específica com o GSH.

Os tiorredoxina redutases de mamíferos são uma família de nucleótidos de piridina persulfureto oxidoredutases contendo selénio, com identidade de sequência e também mecanística, incluindo um centro catalítico redox conservado -Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys-, com os glutationo redutases [92]. Os TrxR catalisam a redução dependente do NADPH da tiorredoxina e de outros compostos endógenos (por exemplo, L-cistina) e exógenos. Esta baixa especificidade dos TRxR de mamíferos é devida à presença de um segundo centro activo redox C-terminal -Cys-SeCys-. A disponibilidade em selénio é um factor chave para a regulação da actividade do TrxR *in vivo*.

Proteína persulfureto isomerase (PDI)

O PDI é um membro da superfamília da tiorredoxina. A sua estrutura inclui dois centros activos redox contendo dois resíduos de cisteína, localizados dentro de domínios com uma elevada semelhança de sequência com a tiorredoxina, separados por outros dois domínios relacionados com a tiorredoxina, que não contêm resíduos de cisteína reactivos. Nas células de mamíferos, e na levedura o PDI encontra-se no lume do retículo endoplasmático, sendo uma proteína altamente abundante que pode constituir aproximadamente 0,8% do total das proteínas celulares. No retículo endoplasmático, o PDI catalisa as reacções de formação, isomerização e redução de persulfuretos, tendo igualmente actividade de *chaperone in vivo* e *in vitro* [94]. As actividades de oxidoredutase e isomerase do PDI, tal como na tiorredoxina, são devidas à reactividade dos resíduos de cisteína N-terminais em duas caixas semelhantes à tiorredoxina (-Cys-Gly-His-Cys-), que se encontram dentro dos domínios a e a' da proteína e que podem funcionar independentemente uma da outra (Figura 26). O resíduo de cisteína N-terminal do primeiro centro activo do PDI tem um pKa de 4,5 e encontra-se parcialmente estabilizado quer pelo grupo imidazole do resíduo de histidina vizinho (dentro da sequência Cys-Gly-His-Cys-) quer pelas cargas positivas que se encontram na zona N-terminal de uma hélice α que existe logo depois do resíduo de cisteína. Assim, a forma persulfureto da proteína é muito menos estável que o persulfureto correspondente da tiorredoxina, o que se reflecte na função oxidativa do PDI, em contraste com a função redutora da tiorredoxina.

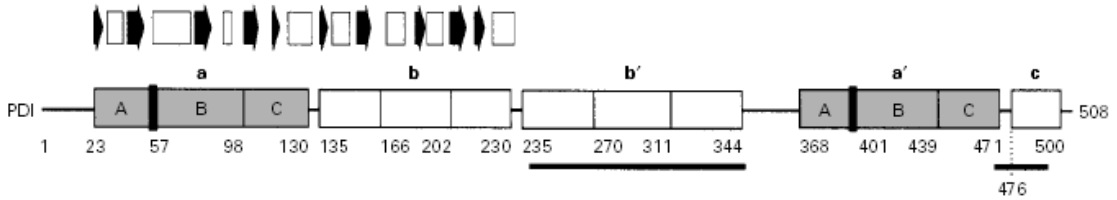


Figura 26. Estruturas dos domínios do proteína persulfureto isomerase [94]. Os domínios estão indicados da seguinte forma: *a* e *a´* (caixas cinzentas) são domínios redox activos com um enrolamento tipo tiorredoxina, *b* and *b´* são domínios redox inactivos com um enrolamento tipo tiorredoxina, e *c* é um possível local de ligação ao cálcio. As posições dos elementos da estrutura secundária são mostrados acima da estrutura dos domínios (os elementos em hélices α e em folhas β estão representados por caixas e setas respectivamente). As barras horizontais abaixo da estrutura dos domínios indicam possíveis locais de ligação a péptidos. Os números abaixo das caixas indicam os resíduos de aminoácidos correspondentes da proteína humana.

A actividade redox do PDI depende do potencial redox do meio, que se reflecte na razão [GSH]/[GSSG] do retículo endoplasmático que é ≈ 2. Trabalhos recentes sugerem que equivalentes oxidantes podem entrar no retículo através de transporte electrónico envolvendo a proteína Ero1p (Endoplasmic reticulum oxidizing 1 protein), resultando possivelmente na oxidação directa do GSH ou das proteínas nascentes. Neste último caso, o principal papel do PDI seria o de isomerase e a actividade seria independente do GSSG. Na realidade, o PDI catalisa preferencialmente a oxidação de proteínas através da formação de um persulfureto misto entre a proteína e o glutationo. O potencial redox do PDI é cerca de +180 mV, muito mais oxidante que o da tiorredoxina [94].

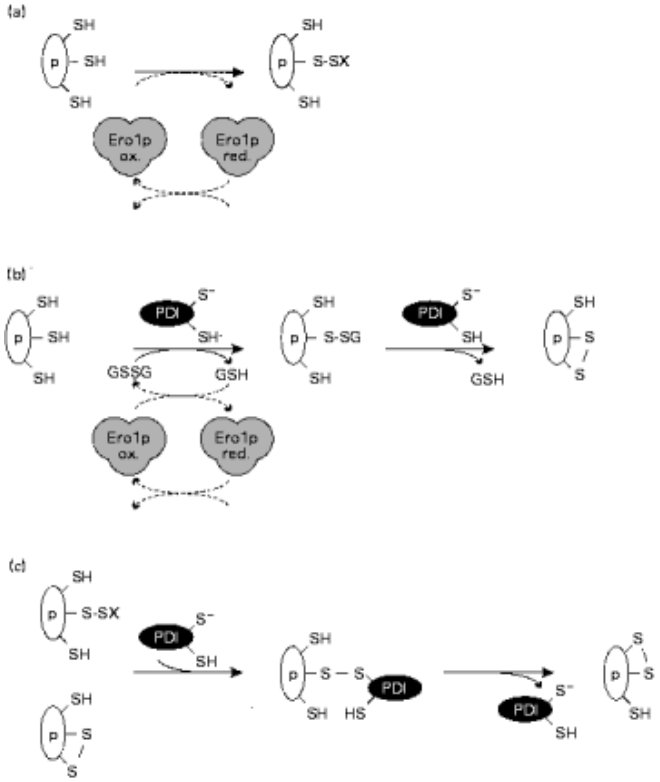


Figura 27. Possíveis mecanismos de formação, redução e isomerização de ligações persulfureto [94]. A formação de uma ligação persulfureto numa proteína substrato pode ser catalisada directamente (a) ou indirectamente (b) pelo Ero1p. O PDI também pode catalisar a reacção (b). A isomerização de ligações persulfureto é catalisada pelo PDI usando que o persulfureto misto proteína/GSH (b) quer qualquer outro persulfureto inter ou intramolecular (c) como substrato. S- indica o resíduo N- terminal de cisteína mais reactivo (sob a forma de tiolato). De notar que a via de oxidação directa (a) seguida da via de isomerização (c) obvia a necessidade de glutationo. A fonte de equivalentes oxidantes para a regeneração da Ero1p oxidada a partir da forma reduzida não é conhecida.

Papel do par GSSG/2GSH na regulação redox

Nas células, a energia é obtida através do movimento de electrões de substratos orgânicos oxidáveis para o dioxigénio, o que resulta num ambiente redutor nas células e tecidos. Os pares redox nas células reagem ao fluxo de electrões, ou seja, a mudanças no ambiente redutor/oxidante. Alguns destes pares redox estão ligados uns aos outros de modo a formar um conjunto de pares relacionados. Outros conjuntos de pares podem ser independentes uns dos outros caso as energias de activação para as reacções sejam altas e não existam sistemas enzimáticos para os ligar cineticamente. O ambiente redox celular é um reflexo do estado destes pares [95].

Historicamente o estado redox foi definido como a razão das formas oxidada e reduzida interconvertíveis de um par redox específico. Por exemplo, Krebs [96], que no final dos anos 60 se concentrou no par NAD^+/NADH, definiu o estado redox do NADH como a razão [NAD^+ livre]/[NADH livre]. No entanto, esta definição não entra em conta com o facto de que para se ter um conhecimento completo de alguns pares redox (por exemplo, o par GSSG/2GSH) ser necessário conhecer concentrações absolutas. Assim, Schafer e Buettner [95] propuseram uma nova definição de estado redox: O **estado redox** de um par redox é definido pelo potencial de redução da meia célula e a capacidade redutora desse par.

Nos últimos anos, o termo estado redox tem sido utilizado, não apenas para descrever o estado de um determinado par redox mas sim, de um modo mais geral, para descrever o ambiente redox de uma célula. No entanto, é desadequado utilizar o termo estado redox em sistemas que têm muitos pares redox interligados como as células e os tecidos. Portanto, Schafer e Buettner [95] sugerem que se deve usar o termo **ambiente redox** para estes sistemas, e definem ambiente redox de um conjunto de pares redox interligados como o somatório dos produtos do potencial de redução e da capacidade redutora dos pares redox interligados presentes. Nesta definição, o potencial de redução pode ser encarado como uma voltagem e a capacidade redutora será a carga total armazenada, ou seja, o número total de electrões disponíveis. A capacidade redutora pode ser estimada determinando a concentração da espécie reduzida num par redox, e o potencial de redução pode ser estimado utilizando a equação de Nernst. Matematicamente isto pode ser expresso pela equação [95]:

$$\text{Ambiente redox} = \sum_{i=1}^{n(par)} E_i \times [\text{espécie reduzida}] \qquad (26)$$

O potencial de redução entre dois pares redox numa pilha electroquímica é dado pela equação de Nernst. Considerando-se dois pares redox:

$$aRed_1 + bOx_2 \rightleftharpoons cOx_1 + dRed_2 \qquad (27)$$

$$Q = \frac{[Ox_1]^c [Red_2]^d}{[Red_1]^a [Ox_2]^b} \qquad (28)$$

$$\Delta E = \Delta E^o - \frac{RT}{nF} \ln Q \qquad (29)$$

Na equação de Nernst (equação 29), ΔE^o é a força electromotriz em condições padrão, R é a constante dos gases (8,314 J $K^{-1}mol^{-1}$), T é a temperatura (em Kelvin) e F é a constante de Faraday (9,6485 x 10^4 C mol^{-1}) e o potencial é dado em Volt. Para uma temperatura de 25ºC (298,15 K) e convertendo o ln em log, a equação de Nernst pode ser escrita do seguinte modo:

$$\Delta E = \Delta E^o - \frac{59{,}1\ mV}{n} \log Q \qquad (30)$$

O pH é um factor importante na equação de Nernst. O potencial a um dado pH pode ser calculado a partir da equação (31), em que $E^o{}'$ é o potencial a pH 7 e $\Delta E/\Delta pH$ é a mudança em E se o pH aumenta 1 unidade sendo dependente do número de electrões e do número de protões envolvidos no processo.

$$E_{pH} = E^o{}' + ((pH-7{,}0) \times (\Delta E/\Delta pH))\ mV \qquad (31)$$

No caso do par GSSG/2GSH temos que, a 25ºC:

$$E_{7,4} = -240 + ((7,4-7,0) \times (-59,1))\ mV = -264\ mV \quad (32)$$

$$E_{7,3} = -240 + ((7,3-7,0) \times (-59,1))\ mV = -258\ mV \quad (33)$$

Os três pares redox presentes nas células mais importantes para a determinação do ambiente redox celular são os sistemas do $NADP^+$/NADPH, tiorredoxina (Trx_{ox}/Trx_{red}) e glutationo (GSSG/2GSH) [95]. Dentro destes três sistemas, o sistema do glutationo é o mais importante, uma vez que a concentração de glutationo é cerca de 500-1000 vezes maior que as concentrações de Trx_{red} e de NADPH e, portanto, as variações no tampão GSSG/2GSH reflectem directamente as alterações no estado redox intracelular.

O NADPH é a principal fonte de electrões para a biossíntese redutora. Como tal, é uma fonte importante de electrões para o glutationo, fornecendo-lhe dois electrões ao ser oxidado de NADPH a $NADP^+$.

$$NADP^+ + 2e^- + H^+ \rightarrow NADPH \quad E^o{}' = -315\ mV \text{ a } 25^oC, pH\ 7 \quad (34)$$

Para este par o potencial de semipilha E_{hc} é dado por.

$$E_{hc} = -315 - (59,1/2) \log ([NADPH]/[NADP^+])\ mV \text{ a } 25^oC, pH\ 7 \quad (35)$$

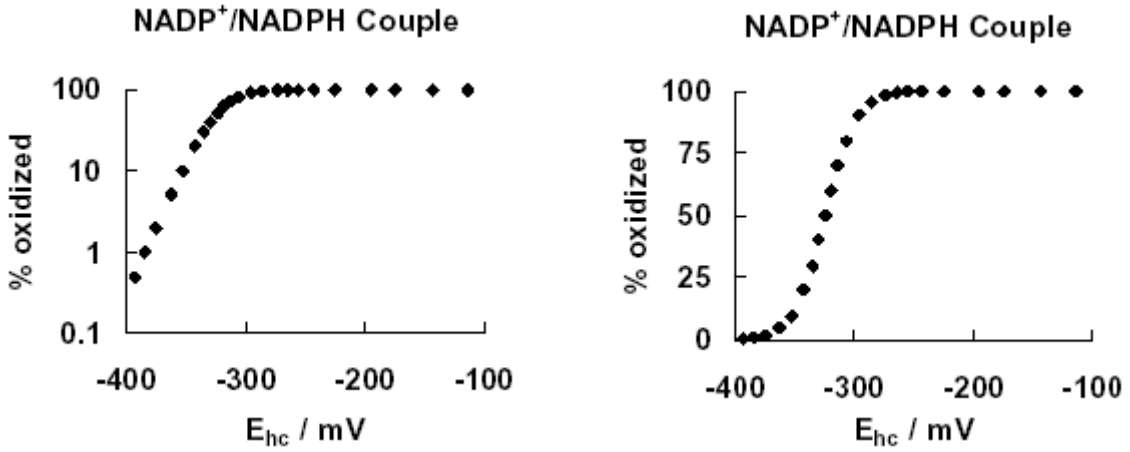


Figura 28. O potencial de redução de semipilha para o par $NADP^+$/NADPH torna-se mais positivo com o aumento da concentração de $NADP^+$ [95]. Os gráficos linear e logarítmico dão perspectivas diferentes do comportamento deste par redox.

Tal como é demonstrado na Figura 28, o potencial de semipilha para o par $NADP^+$/NADPH é dependente da razão das formas oxidadas e reduzidas. No entanto, é independente das concentrações de $NADP^+$ e de NADPH, bastando a sua razão para determinar o potencial. Nas células e tecidos a razão [NADPH]/[$NADP^+$] tende a ser aproximadamente 100:1 [95].

O outro sistema redox importante nas células é o sistema da tiorredoxina e a equação de Nernst para o potencial de semipilha deste sistema é dada pela equação (38), sendo que o valor de $E^o{}'$ para as diversas tiorredoxinas pode variar de –270 a -190 mV.

$$E_{hc} = E^o{}' - (59,1/2) \log ([T(SH)_2]/[TSS])\ mV \text{ a } 25^oC, pH\ 7 \quad (36)$$

O glutationo é considerado como sendo o principal tampão redox tiol-persulfureto nas células [87;95]. É frequente encontrar-se na literatura científica estimativas do ambiente redox celular através de determinações da razão [GSH]/[GSSG], o que é conveniente pois uma vez que as unidades se dividem não se torna necessário determinar as concentrações absolutas. No entanto, contrariamente ao sistema $NADP^+$/NADPH, as

concentrações absolutas dos componentes do par redox GSSG/2GSH tem um impacto no potencial de redução [95]. A reacção de meia pilha para o par GSSG/2GSH é:

$$GSSG + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2\ GSH \qquad (37)$$

Assim, a equação de Nernst para o potencial de redução da semipilha GSSG/2GSH terá a forma:

$$E_{hc} = -240 - (59{,}1/2)\ \log\ ([GSH]^2/[GSSG])\ mV \ \text{ a } 25^{o}C,\ pH\ 7 \qquad (38)$$

É importante notar que na equação 38 a concentração de GSH entra como um termo ao quadrado, o que significa que o potencial de redução é dependente, não só da razão [GSH]/[GSSG] como, também, da concentração absoluta de GSH (ver Figura 29), a qual contribui para o tamponamento do ambiente redox celular.

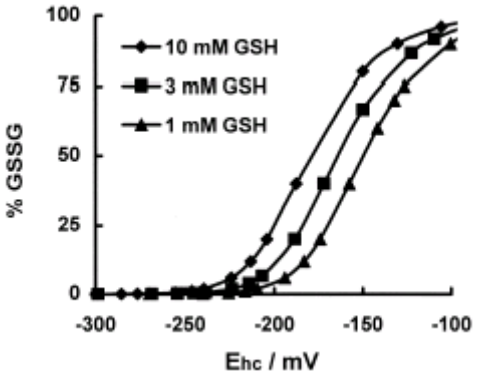


Figura 29. O potencial de redução da semipilha GSSG/2GSH é dependente tanto da razão [GSH]/[GSSG] como da concentração de GSH [95]. As concentrações de GSH 1, 3 e 10 mM representam concentrações iniciais de GSH antes de haver qualquer oxidação. Por exemplo, se para a concentração de GSH = 3 mM, 10% do GSH está oxidado, então [GSH]=2,7 mM e [GSSG]=0,3 mM. Este gráfico demonstra que para razões idênticas [GSH]/[GSSG] se obtêm diferentes potenciais de redução quando a concentração de GSH muda. Por exemplo, se 1% do GSH se oxidar a GSSG, obtém-se E=-250 mV ou E=-220 mV para uma concentração inicial de GSH de 10 mM ou 1 mM respectivamente.

Os três sistemas redox NADP+/NADPH, GSSG/2GSH e Trx_{ox}/Trx_{red} não são sistemas isolados. Tanto o sistema da Trx como o sistema do GSH usam o NADPH como fonte de equivalentes redutores e, portanto, estão ligados termodinamicamente uns aos outros [95]. Assim, o ambiente celular das células e tecidos é influenciado pelos potenciais de semipilha destes pares redox interligados (Figura 30). Na Figura 30 demonstra-se claramente porque é que o NADPH é a força condutora termodinâmica para os sistemas do GSH e da tiorredoxina.

Quando se aplica a definição de ambiente redox dada anteriormente torna-se perceptível porque é que o sistema do glutationo é o principal tampão redox das células. Se o GSH e o NADPH são a principal fonte de equivalentes redutores para a determinação do ambiente redox, então, assumindo que numa célula típica a [GSH] $\approx$ 5 mM, E_{hc} (GSSG/2GSH)=-240 mV e [NADPH] $\approx$ 0,1 mM e E_{hc} ($NADP^+$/NADPH)=-370 mV [95] então, a partir da equação 26 tem-se que o ambiente redox é dado por:

$$\text{Ambiente redox} = (5\ mM \times -240\ mV) + (0{,}1\ mM \times -370\ mV)$$
$$= (-1200) + (-40)\ mV\ mM = -1240\ mV\ mM$$

Assim, pode-se ver claramente que a principal contribuição para o ambiente redox celular é dada pelo par GSSG/2GSH.

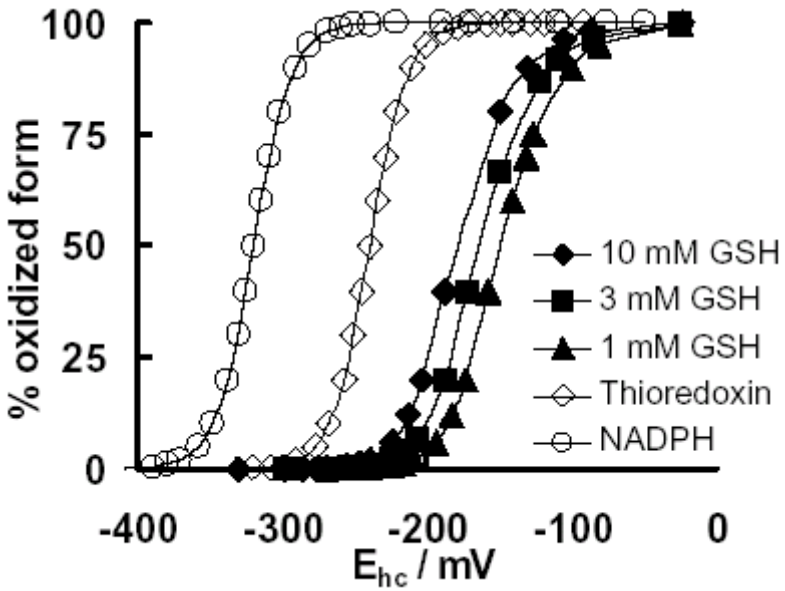


Figura 30. O par NADP$^+$/NADPH fornece os equivalentes redutores necessários para os sistemas da tiorredoxina e do GSH [95]. Para o par NADP$^+$/NADPH ser uma fonte eficiente de equivalentes redutores para o sistema do GSH estes dois sistemas não deverão estar em equilíbrio. Isto acontece porque numa célula o potencial do par NADP$^+$/NADPH é da ordem dos –375 mV enquanto que o do par GSH/GSSG é da ordem dos –240 mV. Assim, estes dois pares redox que estão ligados pelo enzima GSSG redutase parecem estar deslocados do equilíbrio por um factor de 1000 ou mesmo superior.

Conjugação do GSH

Os organismos vivos são expostos a muitos compostos químicos sintéticos ou ocorrendo na natureza presentes, quer no ambiente, quer nos alimentos os quais são potencialmente tóxicos. Estes xenobióticos são frequentemente tóxicos ou mesmo carcinogéneos e, a capacidade de sobreviver à ameaça causada por estes compostos endógenos e/ou xenobióticos representa provavelmente uma adaptação biológica fundamental para a sobrevivência dos organismos.

As células possuem um conjunto de enzimas capazes de catalisar a metabolização de um grande conjunto de diferentes estruturas químicas e grupos funcionais. A desintoxicação enzimática dos xenobióticos foi dividida em três fases distintas que actuam de um modo coordenado [97]. Nas fases I e II há uma conversão de um xenobiótico hidrófobo não polar numa forma mais hidrófila e, eventualmente, menos tóxica que depois pode ser eliminada mais facilmente pelas células. A fase I é catalisada sobretudo pelo sistema do citocromo P450, sendo as reacções de oxidação dos xenobióticos as mais frequentes. Os enzimas da fase II catalisam a conjugação de xenobióticos activados com um substrato solúvel em água como o GSH, UDP-ácido glucurónico ou glicina. Quantitativamente a conjugação com o GSH, que é catalisada pelos GSH S-transferases (GSTs) é a principal reacção da fase II em muitas espécies [97]. Na fase III há a eliminação dos conjugados formados na fase II. A libertação dos conjugados do glutationo pelas células é um processo dependente do ATP mediado por glicoproteínas integrais de membrana pertencentes à família da proteína de resistência a multifármacos (MDR - **M**ultidrug **R**esistance **P**rotein) [98].

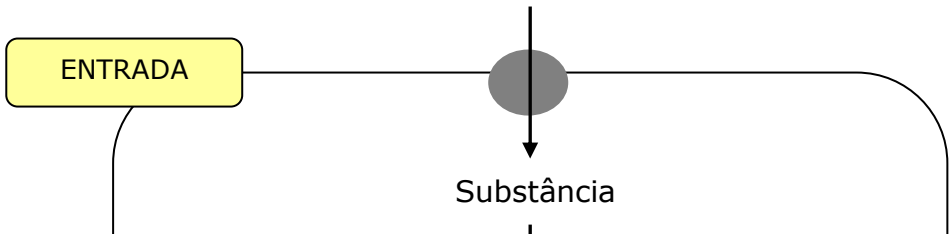


Figura 31. Transporte e desintoxicação de substâncias endógenas, fármacos e carcinogéneos (adaptado de [98]). Os conjugados com o glutationo, glucuronato ou sulfato são exportados das células por membros da família das MRPs.

Via dos ácidos mercaptúricos

O estudo dos processos de desintoxicação de xenobióticos em que o GSH está envolvido, foi iniciado em 1879 quando Baumann e Preusse e também Gaffe, mostraram que a administração de mono-halogenobenzenos a cães levava à excreção na urina de complexos instáveis contendo resíduos de acetilocisteína, os quais, após tratamento com ácido, formavam ácidos mercaptúricos (compostos contendo resíduos de N-acetilo-L-cisteína) (ver [38]). Em 1959, Barnes *et al.* propuseram que a primeira etapa na formação dos ácidos mercaptúricos era a formação no fígado de um S-conjugado do xenobiótico com o glutationo. No mesmo ano, Bray *et al.* demonstraram a catálise pelo γ-glutamilo transferase da formação de um S-conjugado do xenobiótico com a CysGly. Este é então hidrolisado libertando-se glicina e um S-conjugado de cisteína através de uma reacção catalisada por dipeptidases. Em 1961, Booth *et al.* demonstraram a existência no sobrenadante de homogenato de fígado de rato, de um enzima que catalisava a conjugação do glutationo com alguns xenobióticos, incluindo alguns que são metabolizados a ácidos mercaptúricos. Este enzima, a que foi dado na época o nome de GSH S-arilotransferase, era específico para o GSH, mas aceitava como substratos uma grande variedade de outros compostos. Com a demonstração da ocorrência *in vivo* da reacção final da biossíntese dos ácidos mercaptúricos, a acetilação do derivado de cisteína, completou-se o conhecimento sobre a sequência total das reacções de formação dos ácidos mercaptúricos (Figura 32).

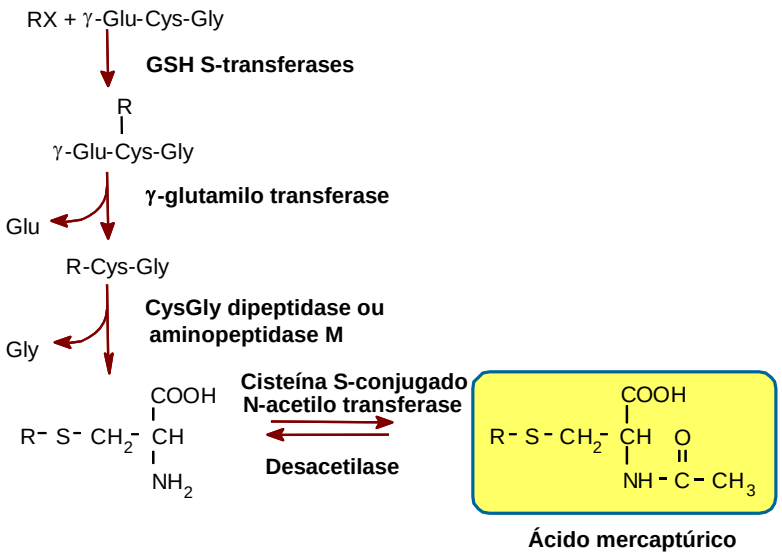


Figura 32. Via dos ácidos mercaptúricos. RX, aceitador electrófilo.

Transporte inter-órgãos e metabolismo dos GSH S-conjugados

Embora a conjugação do GSH com electrófilos para formar GSH S-conjugados seja sobretudo feita no fígado pela acção dos GSH S-transferases, a sua posterior biotransformação a metabolitos que são, quer excretados, quer convertidos em intermediários reactivos tóxicos, ocorre igualmente noutros órgãos [99-101]. Este modelo inter-órgãos surgiu sobretudo a partir de estudos da biossíntese de ácidos mercaptúricos no rato e no murganho (Figura 33). Nestas espécies, a actividade do γ-glutamilo transferase no fígado é muito baixa quando comparada com o rim e portanto este enzima tem um papel secundário na formação de ácidos mercaptúricos. No entanto, noutras espécies em que a actividade do γ-glutamilo transferase hepático é bastante superior, como, por exemplo, o cobaio, o porco e o homem, a síntese intra-hepática de ácidos mercaptúricos é bastante mais importante.

Como referido anteriormente, os conjugados do GSH sintetizados no fígado são excretados preferencialmente para a bílis, embora também possam ser transportados para o plasma, desde que a formação de conjugados seja muito elevada. Após a secreção na bílis, os GSH S-conjugados, ou são transportados intactos para o intestino delgado, ou então são degradados pela acção sequencial do γ-GT e cisteíniloglicina dipeptidase ou aminopeptidases M, que se encontram presentes na membrana luminal do epitélio biliar e na membrana canalicular dos hepatócitos [102], formando-se cisteína S-conjugados. Os cisteína S-conjugados também se formam a partir dos GSH S-conjugados no epitélio do intestino delgado.

Uma vez que o intestino delgado tem uma baixa actividade de N-acetilação, a formação de ácidos mercaptúricos a partir de S-conjugados da cisteína neste órgão não é significativa. Quando formados, estes são excretados nas fezes. A via mais importante de metabolização parece ser a entrada dos S-conjugados da cisteína na circulação entero-hepática ou, então, a sua translocação para os rins, onde podem ser N-acetilados para formar os ácidos mercaptúricos correspondentes através da reacção catalisada pelo cisteína S-conjugado N-acetilotransferase [E.C. 2.3.2.80]. Alternativamente, os cisteína S-conjugados podem ser metabolizados pela microflora intestinal. Neste último caso, os ácidos mercaptúricos podem ser excretados nas fezes. Com efeito, as bactérias do intestino possuem o enzima conjugado de cisteína β-liase [EC 4.4.1.13] [103] que catalisa

a quebra de ligações C-S de alguns conjugados de cisteína para produzir um tiol através da reacção [104]:

$$\text{Cys-R} \rightarrow \text{R-SH} + \text{piruvato} + NH_3 \qquad (39)$$

O metabolito tiólico pode ser excretado como tal, convertido num derivado metilotiólico através de uma reacção catalisada pelo enzima tiol S-metilotransferase [EC 2.1.1.9] ou conjugado com o ácido glucurónico para formar S-glucorónidos [104]. Os derivados metilotiólicos podem ser oxidados a sulfóxidos ou sulfonas antes de serem excretados nas fezes e na urina [104].

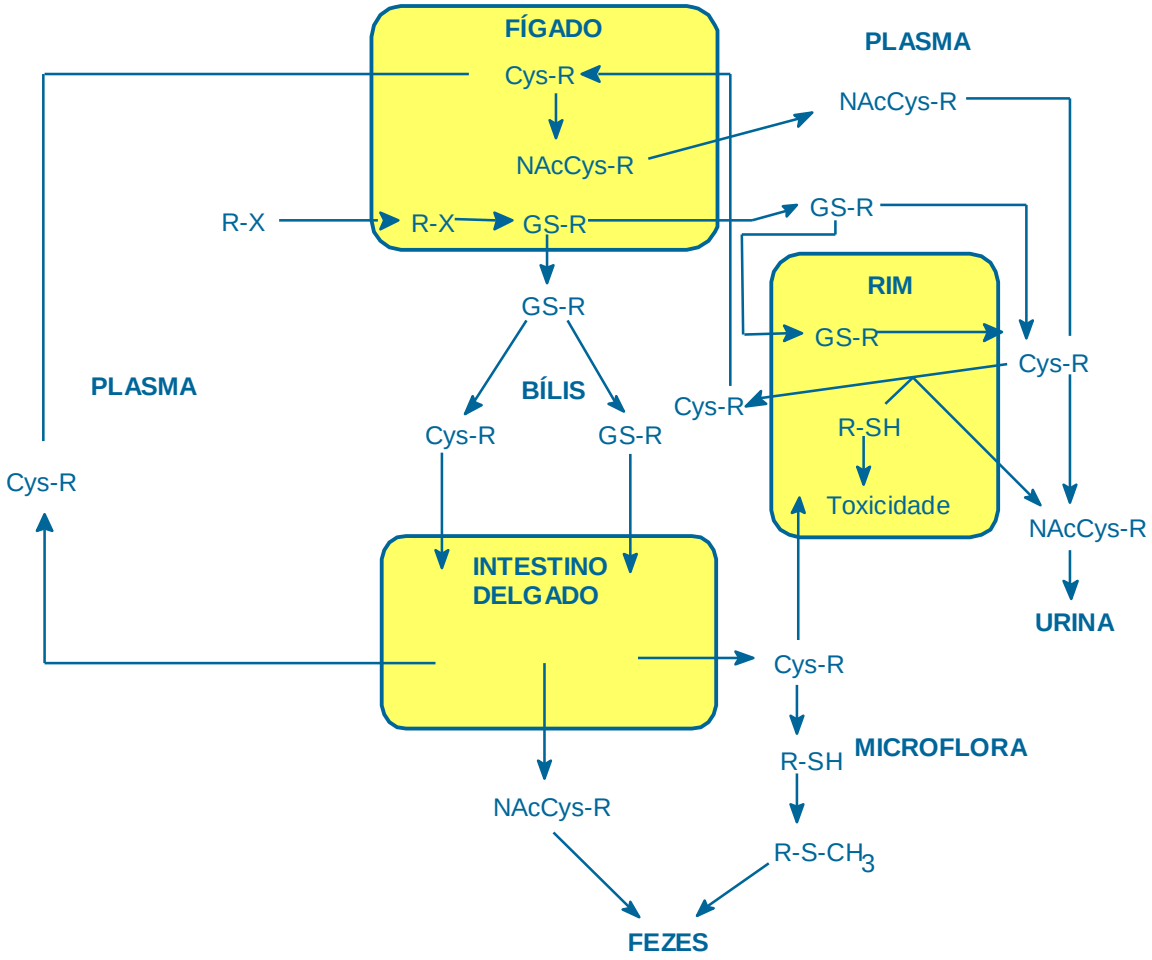


Figura 33. Transporte inter-órgãos e metabolismo dos GSH S-conjugados (adaptado de [101]). R-X, por exemplo haletos de alquilo ou arilo; GS-R, GSH S-conjugado; Cys-R, cisteína S-conjugado; NAcCys-R, ácido mercaptúrico.

GSH S-transferases

Os GSH S-transferases [EC 2.3.1.18] são enzimas que catalisam reacções entre compostos electrófilos (RX) e o glutationo, formando-se como produto um conjugado com o GSH.

$$\text{GSH} + \text{RX} \rightarrow \text{GS-R} + \text{HX} \qquad (40)$$

Segundo esta definição, os GSH S-transferases (GST) podem utilizar como substrato qualquer composto electrófilo, desde que este possua um átomo suficientemente electronegativo, seja ele de carbono, enxofre, azoto ou oxigénio. O conjunto de compostos contendo centros electrófilos substratos dos GST é extremamente grande e inclui, por exemplo, compostos carcinogéneos e metabolitos carcinogéneos como a aflatoxina B_1 e o benzo[*a*]pireno, pesticidas como o DDT, e fármacos utilizados na quimioterapia contra o cancro como o 1,3-*bis*-(2-cloroetilo)-1-nitrosoureia (BCNU) e o *melphalan* (Figura 34). Nestas reacções, o GSH encontra-se sob a forma de anião tiolato (GS^-), actuando, portanto, como nucleófilo. É de notar que muitas destas reacções de conjugação também ocorrem espontaneamente e que uma das funções dos GST é a promoção da activação do GSH através da formação do anião tiolato, baixando o pKa do grupo sulfidrilo do GSH para um valor entre 6 e 7, quando este se encontra ligado ao centro activo dos GST [97].

´ Alguns dos GST também catalisam a redução de certos hidroperóxidos pelo GSH, formando-se o hidroxiácido respectivo e GSSG, sendo este tipo de actividade enzimática conhecida por peroxidase do GSH não dependente do selénio. Este tipo de reacção representa um ataque nucleófilo do GSH a um átomo de oxigénio electrófilo e pensa-se que a reacção envolve dois passos, sendo apenas um deles catalítico, formando-se como intermediário o ácido sulfénico do glutationo:

$$ROOH + GS^- + H^+ \xrightarrow{GST} ROH + [GSOH] \qquad (41)$$

$$[GSOH] + GS^- + H^+ \xrightarrow{\text{não enzimática}} GSSG + H_2O \qquad (42)$$

Os GSH S-transferases são, na sua maior parte, enzimas citosólicos, embora se tenha identificado um GSH S-transferase ligado à membrana, conhecido como GSH S-transferase microssomal, que se encontra presente no retículo endoplasmático, na membrana mitocondrial externa e na membrana plasmática. Recentemente foram detectados dois GST na matriz mitocondrial e um GST no núcleo.

Os GSH S-transferases citosólicos tem todos em comum o facto de serem dímeros com subunidades com uma massa molecular de aproximadamente 25 kDa. No rato, o animal que se encontra melhor estudado, foram caracterizadas pelo menos 13 subunidades (Tabela 9). Cada uma das subunidades tem um centro activo composto de duas regiões funcionais distintas, um local G hidrófilo que se liga ao GSH e um local H adjacente hidrófobo que se liga a uma enorme variedade de electrófilos [105]. Com base nas diferenças de estrutura entre os diversos isoenzimas os GST foram divididos em diversas classes. Nos vertebrados estão descritas 7 classes de GST citosólicos: α, μ, κ, π, σ, τ e ζ. Não existem critérios claramente estabelecidos para a extensão de semelhança necessária para colocar um GST numa determinada classe. É geralmente aceite que os GST que possuem mais de 40% de identidade são incluídos na mesma classe, e que aqueles que possuem menos de 30% de identidade são incluídos em classes diferentes [106]. Para esta divisão em classes tem sido posta em destaque a estrutura primária na região N-terminal, quer porque dentro das classes esta região tende a ser mais conservada que as outras, quer porque contem uma parte importante do centro activo, ou seja um resíduo de tirosina, serina ou cisteína que interage com o grupo SH do GSH de modo a baixar o seu pKa. Todavia deverá ter-se em atenção que este critério de identidade é arbitrário e que é difícil a classificação de GST que tem uma homologia limitada com enzimas das classes alfa, mu, pi, sigma e teta. Em particular, a definição de GST da classe sigma e teta é imprecisa e deverá ser usada com cuidado para enzimas não presentes em mamíferos. De qualquer modo, a hipótese de que as classes representam diferentes famílias de GST é suportada pelo facto dos seus genes possuírem estruturas distintas e de estarem localizados em diferentes cromossomas [97].

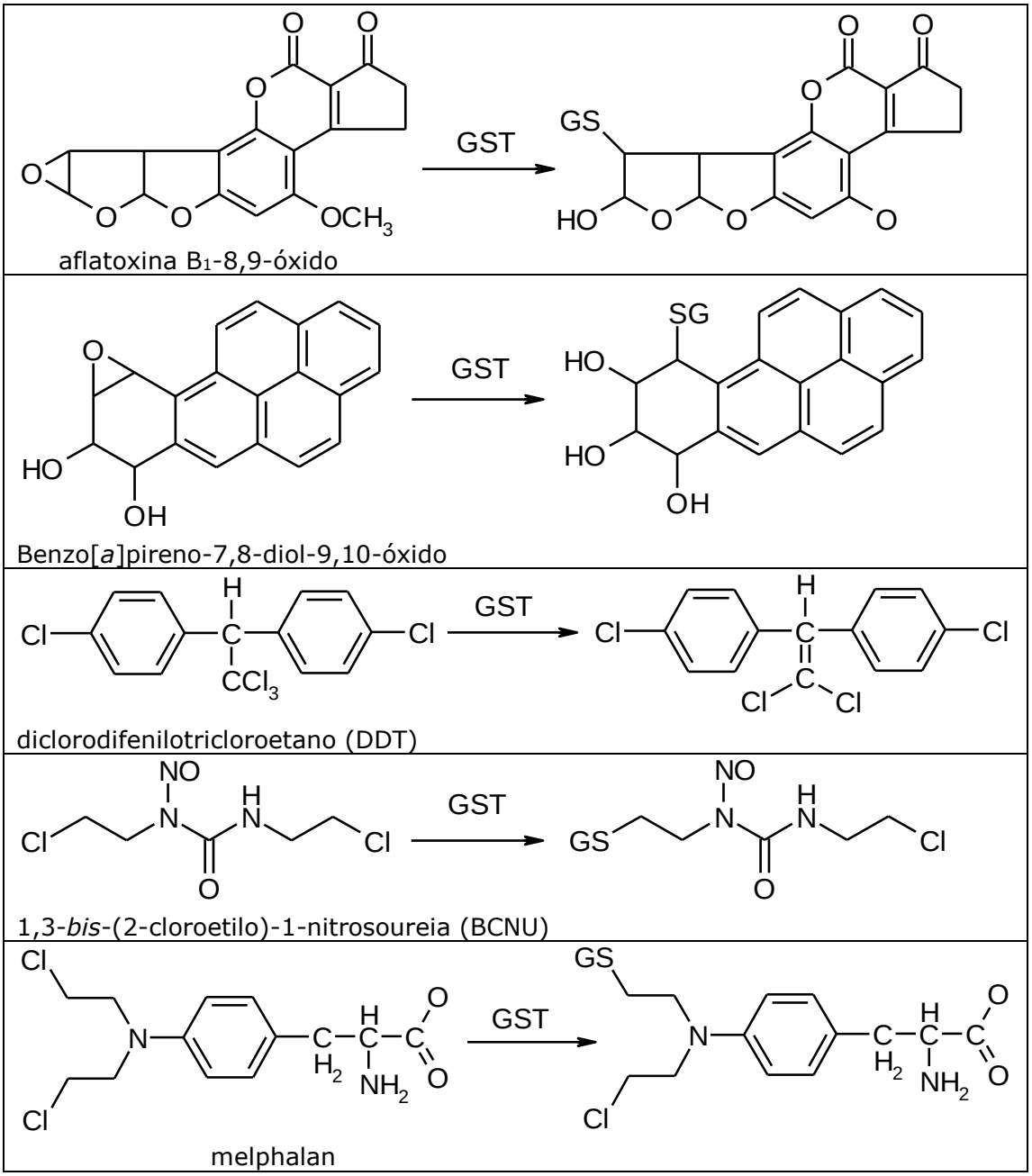


Figura 34. Exemplos de alguns dos substratos dos GST.

Como é típico para as famílias multigénicas de enzimas, a nomenclatura para os GSTs tornou-se após alguns anos de investigação na área extremamente confusa devido à ausência de uma terminologia universalmente aceite (Tabela 9 e Tabela 10). Em 1992 foi proposta uma nomenclatura para os GST humanos [107] que foi posteriormente alargada para outras espécies. Esta nomenclatura identifica cada GST por espécie usando letras minúsculas antes do "GST" (h para humano, r para rato, etc) seguida de uma letra maiúscula identificando a classe (A, K, M, P, S, T, Z), depois um número denotando a subfamília (1,2,3,...) e em alguns casos uma letra minúscula para indicar as variantes alélicas do mesmo gene (a, b, c,...).

Os GSH S-transferases estão presentes em grandes quantidades, representando normalmente cerca de 10% da proteína total do fígado de rato e, quando induzidos, cerca de 20% da proteína total do fígado de rato. Os GSH S-transferases citosólicos foram encontrados em todos os tecidos de mamíferos testados, assim como em insectos, protozoários, algas, fungos mas nas bactérias apenas foram encontrados os enzimas da família θ.

Tabela 9. Diferentes nomenclaturas usadas na literatura para os GSH S-transferases citosólicos do rato (adaptado de [108]). A nomenclatura actualmente aceite, proposta por Mannervik *et al*. [107], foi inicialmente proposta para os GSH S-transferases de humanos. Esta nomenclatura baseia-se nas classes, a qual está indicada por uma letra maiúscula e o prefixo em letra pequena indica a espécie de onde se isolou os GST. [a] Bass *et al.* (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **492**, 163-175; [b]Jakoby *et al.* (1984) *Biochem. Pharmacol*., **33**, 2539-2540; [c] Mannervik e Jenson (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 9909-9912.

Classe	Nomenclatura de Mannervik *et al.* (1992)	Subunidade[a]	Nomenclatura de Jakoby *et al.* (1984) [b]	Nomenclatura de Mannervik e Jensson (1982)[c]	Nome original
α	rGSTA1-1	Ya_1Ya_1	1_a-1_a	L_2	Ligandina
α	rGSTA2-2	Ya_2Ya_2	1_b-1_b	L_2	Ligandina
α	rGSTA1-3	Ya_1Yc_1	1-2	BL	B
α	rGSTA3-3	Yc_1Yc_1	2-2	B_2	AA
μ	rGSTM1-1	Yb_1Yb_1	3-3	A_2	A
μ	rGSTM1-2	Yb_1Yb_2	3-4	AC	C
μ	rGSTM2-2	Yb_2Yb_2	4-4	C_2	D
θ	rGSTT1-1	—	5-5	—	E
μ	rGSTM3-3	Yb_3Yb_3	6-6	—	—
π	rGSTP1-1	YpYp	7-7	—	P
α	rGSTA4-4	YkYk	8-8	—	K
μ	rGSTM5-5	Yn_2 Yn_2	9-9		—
α	rGSTA5-5	Yc_2 Yc_2	10-10		—
μ	rGSTM6-6	YoYo	11-11		—
θ	rGSTT2-2	YrsYrs	12-12		M
θ	rGSTT3-3	—	13-13		Mitocondrial

Tabela 10- Diferentes nomenclaturas usadas na literatura para os GSH S-transferases humanos (adaptado de [108]). Nas colunas correspondentes às nomenclaturas alternativas cada coluna representa a nomenclatura usada num dado laboratório. Para detalhes ver [108]. LTC4S= Leucotrieno C4 sintase

Classe	Isoenzima	Nomenclatura alternativa					
α	hGSTA1-1	—	B_1B_1	ε	$\alpha_x\alpha_x$	—	—
α	hGSTA1-2	—	B_1B_2	δ	—	—	—
α	hGSTA2-2	—	B_2B_2	α-γ	$\alpha_y\alpha_y$	—	—
α	hGSTA3-3	—	—	—	—	—	—
α	hGSTA4-4	GST 5.8	—	—	—	—	—
α	GST9.9	—	—	—	—	Pele 9.9	—
α	GST ϖ	ϖ	—	—	—	—	—
μ	hGSTM1a-1a	—	N_1N_1	—	μ	μ	M_3M_3
μ	hGSTM1a-1b	—	N_1N_1	—	—	μ	—
μ	hGSTM1b-1b	φ	N_1N_1	—	—	μ	—
μ	hGSTM1b-2	—	N_1N_2	—	—	—	M_3N_2
μ	hGSTM2-2	ζ	N_2N_2	—	—	—	N_2N_2
μ	hGSTM2-3	—	N_2N_3	—	—	—	—
μ	hGSTM3-3	—	N_3N_3	—	—	—	—
μ	hGSTM4-4	—	—	—	—		—
μ	hGSTM5-5	—	—	—	—	—	—
π	hGSTP1-1	—	λ	ρ	π	π	$Y_\pi Y_\pi$
θ	hGSTT1-1	—	—	—	θ	—	—
θ	hGSTT2-2	—	T2-2	—	—	—	—
—	Microssomal	—	—	—	—	—	—
—	LTC_4S	—	—	—	—	—	—

Embora geralmente se assuma que o principal papel biológico dos GSH S-transferases é a desintoxicação de xenobióticos electrófilos, actualmente está a dar-se mais atenção aos possíveis substratos electrófilos endógenos destes enzimas. Entre os compostos endógenos que são substratos dos GSH S-transferases encontram-se diversos hidroperóxidos. Os 4-hidroxialquenais, sobretudo o 4-hidroxinonenal, que é um dos produtos da peroxidação lipídica, são dos melhores substratos endógenos encontrados para os GSH S-transferases, nomeadamente para o GSH S-transferase 8-8 (rGSTA4-4). Nos leucócitos, o ácido araquidónico é oxidado numa reacção catalisada pelo lipoxigenase formando-se o epóxido leucotrieno A_4 que é metabolizado através da formação de um conjugado com o GSH, o leucotrieno C_4. No seu local de formação, o leucotrieno A_4 é provavelmente substrato do GSH S-transferase microssomal, mas os enzimas solúveis também o usam como substrato *in vitro*.

ABREVIATURAS

IL-1 – Interleucina-1
NF-κB – Factor nuclear κB
TNF – Factor de necrose tumoral

REFERÊNCIAS

[1] Jocelyn,P.C. (1972) *The Biochemistry of the SH Group*. Academic Press, London.
[2] Russo,A. & Bump,E.A. (1988) Detection and Quantitation of biological sulfhydryls. *Methods Biochem. Analysis*, **33,** 165-241.
[3] Fraústo da Silva,J.J.R. & Williams,R.J.P. (1994) *The biological chemistry of the elements : The inorganic chemistry of life*. Clarendon, Oxford.
[4] Cooper,A.J.L. (1983) Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu. Rev. Biochem.*, **52,** 187-222.
[5] Bick,J.A. & Leustek,T. (1998) Plant sulfur metabolism--the reduction of sulfate to sulfite. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1,** 240-244.
[6] Florkin,M. (1979) Biosynthesis of methionine, cysteine and cystine. In *Compreensive Biochemistry - A History of Biochemistry. Part V. The Unravelling of Biosynthetic Pathw* (Florkin,M. & Stotz,E.H., eds), pp. 83-111. Elsevier, Amsterdam.
[7] Sturman,J.A., Gaull,G., & Raiha,N.C.R. (1970) Absence of cystathionase in human fetal liver: is cystine essential. *Science*, **169,** 74-76.
[8] Klatt,P. & Lamas,S. (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.*, **267,** 4928-4944.
[9] Hoshi,T. & Heinemann,S. (2001) Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J. Physiol.*, **531,** 1-11.
[10] Livesey,G. (1984) Methionine degradation: "anabolic and catabolic". *Trends Biochem. Sci.*, **9,** 27-29.
[11] Stipanuk,M.H. (1986) Metabolism of sulfur-containing aminoacids. *Annu. Rev. Nutr.*, **6,** 179-209.
[12] Finkelstein,J.D. & Martin,J.J. (1984) Methionine metabolism in mammals. *J. Biol. Chem.*, **259,** 9508-9513.
[13] Bender,D.A. (1975) *Amino Acid Metabolism*. John Wiley & Sons, Ltd, London.
[14] Finkelstein,J.D. & Mudd,S.H. (1967) Trans-sulfuration in mammals. *J. Biol. Chem.*, **242,** 873-880.
[15] Finkelstein,J.D., Kyle,W.E., Harris,B., & Martin,J.J. (1982) Methionine metabolism in mammals: concentration of metabolites in rat tissues. *J. Nutr.*, **112,** 1011-1018.
[16] Mudd,H.S., Finkelstein,J.D., Irreverre,F., & Laster,L. (1965) Transsulfuration in mammals. Microassays and tissue distributions of three enzymes of the pathway. *J. Biol. Chem.*, **240,** 4382-4392.
[17] Engstrom,M.A. & Benevenga,N.J. (1987) Rates of oxidation of the methionine and S-adenosylmethionine methyl carbons in isolated rat hepatocytes. *J. Nutr.*, **117,** 1820-1826.
[18] Cooper,A.J.L. (1989) Methionine transamination in vivo. *Biochem. J.*, **262,** 689-690.
[19] Wu,G. & Thompson,J.R. (1989) methionine transamination and glutamine transaminases in skeletal muscle. *Biochem. J.*, **262,** 690-691.
[20] Eloranta,T.O., Martikainen,V., & Smith,T.K. (1990) Adaptation of adenosylmethionine metabolism and methionine recycling to variations in dietary methionine in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **194,** 364-371.
[21] De La Rosa,J., Drake,M.R., & Stipanuk,M.H. (1987) Metabolism of cysteine and cysteinesulfinate in rat and cat hepatocytes. *J. Nutr.*, **117,** 549-558.
[22] Stipanuk,M.H., Coloso,R.M., Garcia,R.A.G., & Banks,M.F. (1992) Cysteine concentration regulates cysteine metabolism to glutathione, sulfate and taurine in rat hepatocytes. *J. Nutr.*, **122,** 420-427.

[23] Packer,L., Witt,E.H., & Tritschler,H.J. (1995) Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.*, **19,** 227-250.
[24] De Rey-Pailhade,J. (1888) Sur un corps d'origine organique hydrogenant le soufre a froid. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **106,** 1683-1684.
[25] Hopkins,F.G. (1921) XXXII. On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem. J.*, **15,** 286-305.
[26] Pinto,R.E. (1988) Papel central do glutatião na regulação da geração de radicais livres. *Arq. Port. Ciênc. Biol*, **XXII,** 83-89.
[27] Hunter,G. & Eagles,B.A. (1927) Glutathione. A critical study. *J. Biol. Chem.*, **72,** 147-166.
[28] Hopkins,F.G. (1929) On glutathione: a reinvestigation. *J. Biol. Chem.*, **84,** 269-320.
[29] Pirie,N.W. & Pinhey,K.G. (1929) The titration of glutathione. *J. Biol. Chem.*, **84,** 321-333.
[30] Kendall,E.C., Mason,H.L., & McKenzie,B.F. (1930) A study of glutathione. IV. Determination of the structure of glutathione. *J. Biol. Chem.*, **88,** 409-423.
[31] Deleve,L.D. & Kaplowitz,N. (1990) Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin. Liver Dis.*, **10,** 251-266.
[32] Akerboom,T.P.M. & Sies,H. (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.*, **77,** 373-382.
[33] Newton,G.L. & Fahey,R.C. (1990) Glutathione and Prokaryotes. In *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions* (Viña,J., ed), pp. 69-78. CRC Press, Boca Raton.
[34] Tateishi,N., Higashi,T., Naruse,A., Nakashima,K., & Shiozaki,H. (1977) Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J. Nutr.*, **107,** 51-60.
[35] Gilbert,H.F. (1989) Thermodynamic and kinetic constraints on thiol/disulfide exchange involving glutathione redox buffers. In *Glutathione Centennial: Molecular Perspectives and Clinical Implications* (Taniguchi,N., Higashi,T., Sakamoto,Y., & Meister,A., eds), pp. 73-87. Academic Press, San Diego.
[36] Filomeni,G., Rotilio,G., & Ciriolo,M.R. (2002) Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem. Pharmacol.*, **64,** 1057-1064.
[37] Commandeur,J.N.M., Stijntjes,G.J., & Vermeulen,N.P.E. (1995) Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. *Pharmacol. Rev.*, **47,** 271-330.
[38] Marinho,H.S. (1995) Metabolismo do glutationo no fígado de rato normal e no fígado de rato hepatomizado. PhD Thesis, University of Lisbon.
[39] Brigelius-Flohé,R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.*, **27,** 951-965.
[40] Brigelius,R. (1985) Mixed disulfides:biological functions and increase in oxidative *stress*. In *Oxidative Stress* (Sies,H., ed), pp. 243-272. Academic Press, London.
[41] Meister,A. (1994) Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.*, **269,** 9397-9400.
[42] Meister,A. (1973) On the enzymology of amino acid transport. *Science*, **180,** 33-39.
[43] Hammarstrom,S., Murphy,R.C., Samuelsson,B., Clark,D.A., Miokowsli,C., & Corey,E.J. (1979) Structure of leukotriene C. Identification of the amino acid part. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28,** 1266-1272.
[44] Kirlin,W.G., Cai,J., Thompson,S.A., Diaz,D., Kavanagh,T.J., & Jones,D.P. (1999) Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic. Biol. Med.*, **27,** 1208-1218.
[45] Arrigo,A.P. (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.*, **27,** 936-944.
[46] Holmgren,A. (1990) Glutaredoxin: structure and function. In *Glutathione: Metabolism and physiological functions* (Viña,J., ed), pp. 145-154. CRC Press, Boca Raton.
[47] Meister,A. (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.*, **263,** 17205-17208.
[48] Vincenzini,M.T., Favilli,F., & Iantomasi,T. (1992) Intestinal uptake and transmembrane transport systems of intact GSH; characteristics and possible biological role. *Biochim. Biophys. Acta*, **1113,** 13-23.
[49] Jones,D.P. (1995) Glutathione distribution in natural products: absorption and tissue distribution. *Methods Enzymol.*, **252:3-13.,** 3-13.
[50] Witschi,A., Reddy,S., Stofer,B., & Lauterburg,B.H. (1992) The systemic availability of oral glutathione. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **43,** 667-669.
[51] White,B.P., Davies,M.H., & Schnell,R.C. (1987) Circadian variations in hepatic glutathione content, γ-glutamylcysteine synthetase and γ-glutamyl transferase activities in mice. *Toxicol. Lett.*, **35,** 217-223.
[52] Akerboom,T.P.M. & Sies,H. (1990) Glutathione transport and its significance in oxidative stress. In *Glutathione: Metabolism and Function* (Viña,J., ed), pp. 45-55. CRC Press, Boca Raton.
[53] Lash,L.H. & Jones,D.P. (1984) Renal glutathione transport. *J. Biol. Chem.*, **259,** 14508-14514.
[54] Meister,A. (1991) Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol. Therap.*, **51,** 155-194.
[55] Deneke,S.M. & Fanburg,B.L. (1989) Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.*, **257,** L163-L173.
[56] Lu,S.C. (1998) Regulation of hepatic glutathione synthesis. *Semin. Liver Dis.*, **18,** 331-343.
[57] Huang,C.-S., Chang,L.-S., Anderson,M.E., & Meister,A. (1993) Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney γ-glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.*, **268,** 19675-19680.
[58] Kondo,T., Taniguchi,N., & Kawakami,Y. (1984) Significance of glutathione S-conjugate for glutathione metabolism in human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, **145,** 131-136.
[59] Lu,S.C. (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.*, **13,** 1169-1183.
[60] Chen,Z. & Lash,L.H. (1998) Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285,** 608-618.

[61] Lauterburg,B.H., Adams,J.D., & Mitchell,J.R. (1984) Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology*, **4,** 586-590.
[62] Kaplowitz,N., Aw,T.Y., & Ookhtens,M. (1985) The regulation of hepatic glutathione. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **25,** 715-744.
[63] Ookhtens,M. & Kaplowitz,N. (1998) Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin. Liver Dis.*, **18,** 313-329.
[64] Dass,P.D., Bermes Jr., E.W., & Holmes,E.W. (1992) Renal and hepatic output of glutathione in plasma and whole blood. *Biochim. Biophys. Acta*, **1156,** 99-102.
[65] Lew,H., Pyke,S., & Quintanilha,A. (1985) Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. *FEBS Lett.*, **185,** 262-266.
[66] Pyke,S., Lew,H., & Quintanilha,A. (1986) Severe depletion in liver glutathione during physical exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139,** 926-931.
[67] Sies,H. & Graf,P. (1985) Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenaline. *Biochem. J.*, **226,** 545-549.
[68] Rankin,B.B., Wells,W., & Curthoys,N.P. (1985) Rat renal peritubular transport and metabolism of plasma [35S]glutathione. *Am. J. Physiol.*, **249,** F198-F204.
[69] Anderson,M.E., Bridges,R.J., & Meister,A. (1980) Direct evidence for inter-organ transport of glutathione and that the non-filtration renal mechanism for glutathione utilization involves γ-glutamyl transpeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96,** 848-853.
[70] Pinto,R.E. (1961) Comparison of the aerobic and anaerobic reduction of oxidized glutathione in liver homogenates. *Biochem. J.*, **79,** 43-51.
[71] Pinto,R.E. & Bartley,W. (1969) The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem. J.*, **112,** 109-114.
[72] Abedinzadeh,Z. (2001) Sulfur-centered reactive intermediates derived from the oxidation of sulfur compounds of biological interest. *Can. J. Physiol Pharmacol.*, **79,** 166-170.
[73] Winterbourn,C.C. (1993) Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radic. Biol. Med.*, **14,** 85-90.
[74] Mills,G.C. (1957) Hemoglobin catabolism .I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzymes which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.*, **229,** 189-197.
[75] Maiorino,M., Ursini,F., Leonelli,M., Finato,N., & Gregolin,C. (1982) A pig heart peroxidation inhibiting protein with glutathione peroxidase activity on phospholipid hydroperoxides. *Biochem. Int.*, **5,** 575-583.
[76] Maddipati,K.R. & Marnett,L.J. (1987) Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. *J. Biol. Chem.*, **262,** 17398-17403.
[77] Chu,F.-F., Doroshow,J.H., & Esworthy,R.S. (1993) Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.*, **268,** 2571-2576.
[78] Flohé,L. (1989) The selenoprotein glutathione peroxidase. In *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects* (Dolphin,D., Poulson,R., & Avramovic,O., eds), pp. 644-731. John Wiley & Sons, New York.
[79] Björnstedt,M., Xue,J., Huang,W., Akesson,B., & Holmgren,A. (1994) The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **269,** 29382-29384.
[80] Flohé,L., Wingender,E., & Brigelius-Flohé,R. (1997) Regulation of glutathione peroxidases. In *Oxidative Stress and Signal Transduction* (Forman,H.J. & Cadenas,E., eds), pp. 415-440. Chapman & Hall, New York.
[81] Sunde,R.A., Thompson,B.M., Palm,M.D., Weiss,S.L., Thompson,K.M., & Evenson,J.K. (1997) Selenium regulation of selenium-dependent glutathione peroxidases in animals and transfected CHO cells. *Biomed. Environ. Sci.*, **10,** 346-355.
[82] de Haan,J.B., Bladier,C., Griffiths,P., Kelner,M., O'Shea,R.D., Cheung,N.S., Bronson,R.T., Silvestro,M.J., Wild,S., Zheng,S.S., Beart,P.M., Hertzog,P.J., & Kola,I. (1998) Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, **273,** 22528-22536.
[83] Antunes,F., Salvador,A., & Pinto,R.E. (1995) PHGPx and phospholipase A2/GPx: comparative importance on the reduction of hydroperoxides in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, **19,** 669-677.
[84] Roveri,A., Ursini,F., Flohe,L., & Maiorino,M. (2001) PHGPx and spermatogenesis. *BioFactors*, **14,** 213-222.
[85] Chung,P.M., Cappel,R.E., & Gilbert,H.F. (1991) Inhibition of glutathione disulfide reductase by glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, **288,** 48-53.
[86] Bilzer,M., Krauth-Siegel,R.L., Schirmer,R.H., Akerboom,T.P.M., Sies,H., & Schulz,G.E. (1984) Interaction of a glutathione S-conjugate with glutathione reductase. *Eur. J. Biochem.*, **138,** 373-378.
[87] Gilbert,H.F. (1995) Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods Enzymol.*, **251,** 8-28.
[88] Klatt,P., Molina,E.P., De Lacoba,M.G., Padilla,C.A., Martinez-Galesteo,E., Barcena,J.A., & Lamas,S. (1999) Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *FASEB J.*, **13,** 1481-1490.
[89] Barrett,W.C., DeGnore,J.P., Konig,S., Fales,H.M., Keng,Y.F., Zhang,Z.Y., Yim,M.B., & Chock,P.B. (1999) Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215. *Biochemistry*, **38,** 6699-6705.

[90] Park,E.-M. & Thomas,J.A. (1989) The mechanisms of reduction of protein mixed disulfides (dethiolation) in cardiac tissue. *Arch. Biochem. Biophys.*, **274,** 47-54.
[91] Arner,E.S. & Holmgren,A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.*, **267,** 6102-6109.
[92] Mustacich,D. & Powis,G. (2000) Thioredoxin reductase. *Biochem. J.*, **346 Pt 1:1-8,** 1-8.
[93] Halliwell,B. & Gutteridge,J.M.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.
[94] Ferrari,D.M. & Soling,H.D. (1999) The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem. J.*, **339 (Pt 1),** 1-10.
[95] Schafer,F.Q. & Buettner,G.R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.*, **30,** 1191-1212.
[96] Krebs,H.A. & Veech,R.L. (1969) Equilibrium relations between pyridine nucleotides and adenine nucleotides and their roles in the regulation of metabolic processes. *Adv. Enzyme Regul.*, **7,** 397-413.
[97] Sheehan,D., Meade,G., Foley,V.M., & Dowd,C.A. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.*, **360,** 1-16.
[98] Keppler,D. (1999) Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic. Biol. Med.*, **27,** 985-991.
[99] Inoue,M., Okajima,K., & Murino,Y. (1984) Hepato-renal cooperation in biotransformation, membrane transport, and elimination of cysteine S-conjugates of xenobiotics. *J. Biochem.*, **95,** 247-254.
[100] Inoue,M., Okajima,K., Nagase,S., & Morino,Y. (1987) Inter-organ metabolism and transport of a cysteine-S-conjugate of xenobiotics in normal and mutant analbuminemic rats. *Biochem. Pharmacol.*, **36,** 2145-2150.
[101] Dekant,W., Lash,L.H., & Anders,M.W. (1988) Fate of glutathione conjugates and bioactivation of cysteine Sconjugates by cysteine conjugate β-lyase. In ***Glutathione Conjugation. Mechanisms and Biological Significance*** (Sies,H. & Ketterer,B., eds), pp. 415-447. Academic Press, London.
[102] Ballatori,N., Jacob,R., & Boyer,J.L. (1986) Intrabiliary glutathione hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, **261,** 7860-7865.
[103] Bakke,J. & Gustafsson,J.-A. (1984) Mercapturic acid pathway metabolites of xenobiotics: generation of potentially toxic metabolites during enterohepatic circulation. *Trends Pharmacol. Sci.*, **5,** 517-521.
[104] Bakke,J.E. (1990) Biochemical and physiological dispositions of glutathione conjugates. *Drug Metab. Rev.*, **22,** 637-647.
[105] Eaton,D.L. & Bammler,T.K. (1999) Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.*, **49,** 156-164.
[106] Whalen,R. & Boyer,T.D. (1998) Human glutathione S-Transferases. *Semin. Liver Dis.*, **18,** 345-358.
[107] Mannervik,B., Awasthi,Y.C., Board,P.G., Hayes,J.D., Di Ilio,C., Ketterer,B., & Listowsky,I.X. (1992) Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.*, **282,** 305-308.
[108] Hayes,J.D. & Pulford,D.J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *CRC Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **30,** 445-600.