

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo Genético da Glutathione Transferase: Enzima
do Metabolismo dos Xenobióticos.

Maria de Nazaré Klautau Guimarães Grisolia

Tese apresentada ao Departamento
de Genética da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto para a
obtenção do grau de Doutor em
Genética.

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Antônio Mestriner

Ribeirão Preto

Aos meus pais Antonio Carlos e Celeste,
aos meus irmãos Carlinhos, Tereza, Lúcia,
Isabel, João Cláudio e Ruth, que mesmo
distantes, em nenhum momento deixaram de
me dar carinho e incentivo.

Aos meus companheiros Cesar, Lucas e
Vitor pela compreensão e carinho
constantes.

DEDICO...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Moacyr Antonio Mestriner, chefe do Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP, pela iniciação científica, pelo ambiente de trabalho, pelas lições constantes da vida científica e por sua orientação.

Ao Prof. Dr. Sérgio Zucoloto, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP, pelo interesse e crédito nesse trabalho, que culminaram com importantes orientação e participação. Sua atenção e incentivo sempre foram um estímulo ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro H. Cabello, Chefe do Departamento de Genética da Fundação Oswaldo Cruz- Rio de Janeiro, pela orientação na análise dos dados, pelo seu constante apoio e incentivo. Suas sugestões tiveram grande importância na finalização deste trabalho.

Aos professores, funcionários e alunos de pós-graduação do Laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Genética, pela amizade e colaboração que contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários ,técnicos e docentes responsáveis pelos Serviços de Verificação de Óbitos do Departamento de

Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP,
pela excelente colaboração na coleta das amostras.

A Dra. Maria Betânia Mohler de Araújo, médica
residente do Departamento de Patologia, pela ajuda na
análise histológica das amostras.

Ao Prof. Dr. Fábio Sene , pela disposição em
colaborar com este trabalho facilitando a obtenção do
reagente necessário.

Aos pesquisadores, funcionários e pós-graduandos do
Departamento de Genética da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de
Janeiro, pela hospitalidade agradável e colaboração na
análise dos dados.

A todos os membros do Departamento de Genética e
Matemática Aplicada à Biologia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto- USP, que de algum modo colaboraram para a
execução desta tese.

A Elisabeth Barreto Beira, por toda a assistência
técnica, dedicação e amizade durante todos esses anos, que
culminaram no desenvolvimento da dissertação de mestrado e
nessa tese de doutorado.

Agradeço ao apoio das Instituições Científicas e
Educativas:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico (CNPq).

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior- CAPES.

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Objetivos	26
3. Material e Métodos	27
4. Resultados	34
4.1 Distribuição fenotípica e frequências gênicas.....	34
4.2 Distribuição da atividade enzimática.....	38
4.3 Distribuição fenotípica e da atividade enzimática no grupo dos doentes.....	43
5. Discussão	47
5.1 Frequências gênicas do sistema GST1.....	47
5.2 Associação do sistema GST1 e doenças.....	48
5.3 Distribuição da atividade enzimática.....	51
5.4 Distribuição fenotípica e da atividade enzimática no grupo dos doentes.....	54
5.5 Aspectos evolutivos da GST.....	56
6. Conclusões	58
7. Resumo	60
8. Summary.....	61
9. Bibliografia	62

1 - INTRODUÇÃO

O ser humano está em contato contínuo com agentes tóxicos de natureza muito diversificada. Esses agentes estranhos ao seu organismo, os xenobióticos, podem ser absorvidos pelo trato gastrintestinal, pulmões e ou pele, dependendo de suas características químicas e físicas. Felizmente, o organismo tem a habilidade de biotransformar e excretar esses compostos na urina, fezes e o ar. Entretanto, quando a taxa de absorção excede a taxa de eliminação, o composto tóxico pode ser acumulado em uma concentração crítica no organismo e, assim, os efeitos tóxicos são observados (FIGURA 1.1).

A toxicidade produzida pode ser através de efeitos farmacológicos, patológicos ou genotóxicos (alteração no DNA). Um exemplo de efeito farmacológico que leva à toxicidade é a depressão do sistema nervoso central causada pelos barbitúricos; um exemplo de efeito patológico é o comprometimento dos rins produzido pelo mercúrio e um exemplo de efeito genotóxico é o câncer produzido pelo gás mostarda. Geralmente, se a concentração do composto químico nos tecidos não excede um nível crítico, o efeito pode ser reversível. Os efeitos farmacológicos normalmente são reversíveis quando a concentração do composto químico nos tecidos é diminuída pela sua excreção do organismo. Os efeitos patológicos e genotóxicos podem ser reparados. Se os

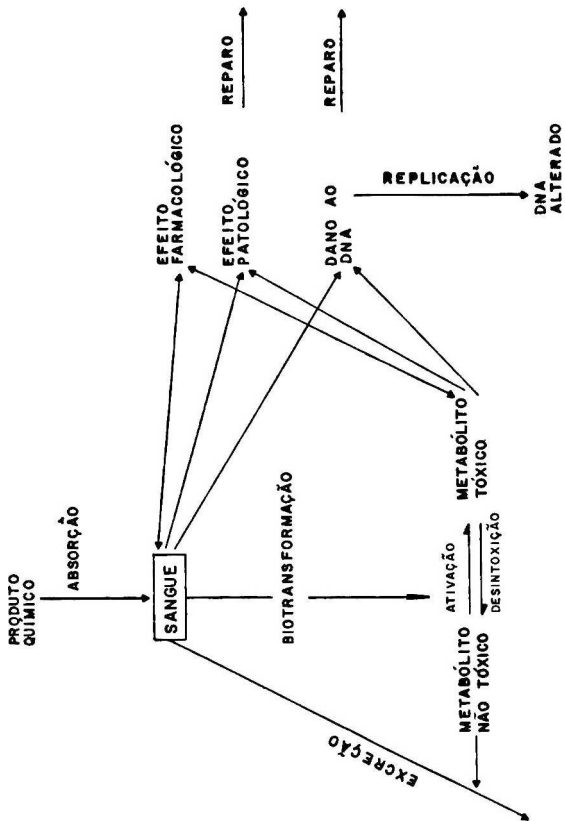


FIGURA 1.1: Representação esquemática da disposição e dos efeitos tóxicos produzidos por produtos químicos (KLASSEN, 1986).

efeitos patológicos e farmacológicos forem graves, ocorrerá morte em pouco tempo. Uma lesão no DNA, não reparada, pode resultar num processo canceroso após alguns meses, ou mesmo anos (KLAASSEN, 1986).

Muitos produtos químicos não são tóxicos "per se", mas podem ser ativados por biotransformação a metabólitos tóxicos; a resposta tóxica então é dependente do balanço da taxa de produção deste metabólito e da desintoxicação. Os efeitos tóxicos estão relacionados com a concentração do produto químico no organismo, tanto o produto administrado como também o gerado pela biotransformação no organismo. Assim, a toxicidade induzida por um produto químico é determinada pela sua taxa de absorção, distribuição, biotransformação e excreção (KLAASSEN, 1986).

Os compostos xenobióticos naturais ou sintéticos, de característica lipofílica, são rapidamente absorvidos pela pele, pulmões ou intestino e se acumulam no organismo. Os compostos lipofílicos estão presentes nos fluidos de excreção, e se difundem através das membranas, sendo absorvidos; os solúveis em água são mais facilmente excretados. Esta é uma das explicações da maior concentração de compostos lipofílicos no organismo (SIPES & GANDOLFI, 1986).

Conseqüentemente, os animais desenvolveram vários processos bioquímicos que convertem os compostos lipofílicos a metabólitos hidrossolúveis. Esses processos são chamados de biotransformação e são, geralmente, de natureza

enzimática. Assim, a biotransformação é a soma dos processos pelos quais um xenobiótico está sujeito às modificações químicas por um organismo vivo. O resultado final das reações de biotransformação é um metabólito quimicamente distinto e mais hidrossolúvel que o produto original. Logo, a reabsorção é diminuída e a excreção definitiva é feita pelas vias urinárias, biliares e fecais (SIPES & GANDOLFI, 1986).

Nos animais, várias enzimas são capazes de biotransformar (metabolizar) compostos xenobióticos lipossolúveis, de tal modo a torná-los mais hidrossolúveis. Essas reações enzimáticas são de dois tipos: reações da fase I, que envolve oxidação, redução e hidrólise; e reações da fase II, que consiste em reações de conjugação (FIGURA 1. 2)

A principal função das reações da fase I é introduzir um grupo funcional -OH, -SH, NH₂, -COOH, no substrato. Estes grupos permitem que o composto seja submetido às reações da fase II. Nesta segunda fase, as enzimas utilizam o grupo funcional para conjugação do composto estranho ou metabólito derivado da fase I com uma molécula endógena (ácido glucorônico, sulfato, glutatona, glicose e cisteína), originando um complexo hidrofílico e ionizável em pH fisiológico. Assim, a excreção do xenobiótico eleva-se, pela sua facilidade em participar do sistema de transporte, através das membranas celulares, que envolvem os produtos conjugados com moléculas endógenas (SIPES & GANDOLFI, 1986; GONZALEZ & NEBERT, 1990).

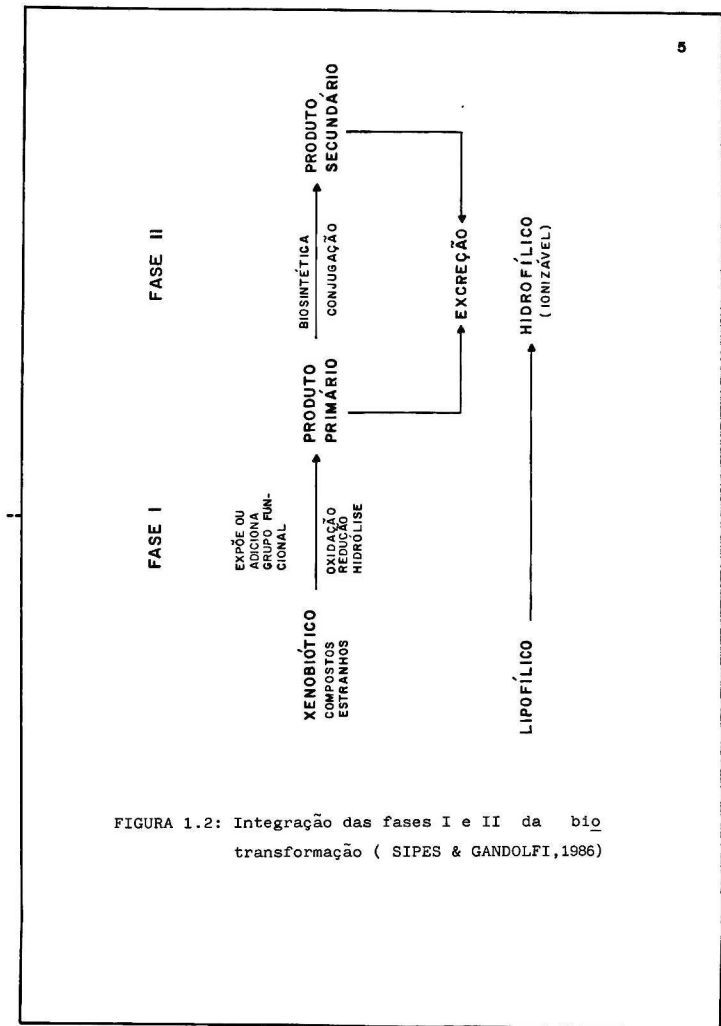


FIGURA 1.2: Integração das fases I e II da bio transformação (SIPES & GANDOLFI,1986)

A maioria dos xenobióticos é considerada inerte quanto à carcinogenicidade. Para que tenham atividade carcinogênica, mutagênica e/ou tóxica é necessária a sua ativação pelas enzimas hepáticas. A regulação coordenada dos genes das enzimas da fase I e da fase II, em cada célula, é portanto um fator importante que assegura a liberação metabólica de substâncias estranhas ao organismo, com um risco mínimo de acumulação de intermediários que podem levar a doenças (NEBERT, 1991 e VESSEL, 1991).

A biotransformação de xenobióticos está sujeita à interferência de fatores intrínsecos relacionados ao próprio composto, e também de variáveis do hospedeiro como: espécie, linhagem, idade, sexo, indução e inibição enzimática, nutrição e estado de saúde (SIPES & GANDOLFI, 1986).

As diferenças individuais na biotransformação estão sob controle genético. Essas diferenças, muitas vezes, estão na variação da resposta biológica observada a xenobióticos. As respostas farmacológicas atípicas podem resultar de defeitos genéticos e podem estar associadas com atividade enzimática alterada. Essas variações hereditárias na biotransformação são encontradas em humanos e animais e são classificadas como farmacogenéticas.

Na fase II, a glutathione S-transferase (GST-EC 2.5.1.18) é o sistema enzimático principal do metabolismo. A GST é uma família de enzimas diméricas que catalizam o passo inicial na formação dos derivados N-acetilcisteína (ácido mercaptúrico) de diversos

xenobióticos. Essas enzimas estão localizadas no citoplasma e no retículo endoplasmático. Porém, a atividade das formas expressas no citosol são geralmente 5 a 40 vezes maior do que a atividade microsomal. As enzimas são ubíquas, com maior atividade nos testículos, fígado, intestino, rins e glândula adrenal (MORGENSTERN e cols., 1982; SIPES & GANDOLFI, 1986).

A função principal da GST é catalisar a conjugação de compostos eletrofílicos hidrofóbicos, com cofator tripeptídico glutationa (GSH), que é composto de glicina, ácido glutâmico e cisteína. Essa reação do grupo sulfidril nucleofílico da glutationa com compostos que contêm átomos de carbono eletrofílico, resulta na formação de um tio-éter ligado entre o átomo de carbono e o grupo sulfidril (FIGURA 1.3). Como uma família de isoenzimas, o sistema enzimático GST é capaz de metabolizar uma grande variedade de compostos, os quais apresentam três características em comum: são hidrofóbicos, contêm um átomo de carbono eletrofílico e reagem não enzimaticamente com a glutationa em uma pequena taxa. É importante notar que essas transferases servem como proteínas ligantes para compostos que não são substratos para reação enzimática. Os domínios lipofílicos das transferases servem como sítio de ligação para compostos de origem exógena e endógena. Assim, a GST pode servir como enzima e também como proteína de estocagem ou transporte (CHASSEAUD, 1979; SIPES & GANDOLFI, 1986 e SMITH & COKL, 1977).

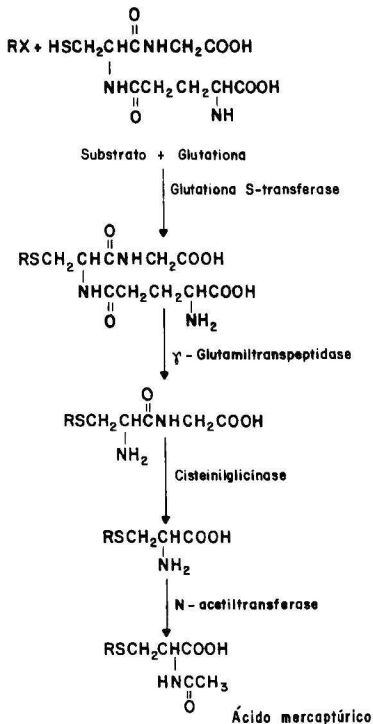


FIGURA 1.3: Conjugação da glutatona e biossíntese do ácido mercaptúrico (SIPES & GANDOLFI, 1986).

A glutationa conjugada é subsequentemente clivada a derivados de cisteína, que são acetilados para formar conjugados N-acetilcisteína (ácido mercaptúrico), os quais são excretados na urina. A perda do ácido glutâmico da glutationa conjugada é catalisada pela enzima gama-glutamyltranspeptidase. A cisteinilglicinase catalisa a perda da glicina para produzir a cisteína conjugada e as N-acetil transferase acetilam o grupo amina da cisteína para formar derivados do ácido mercaptúrico. Desse modo, a GST previne a reação dos compostos xenobióticos com os constituintes celulares essenciais (SIPES & GANDOLFI, 1986).

Além da biotransformação, as GSTs metabolizam também compostos endógenos, incluindo os hidroperóxidos lipídicos e a prostaglandina H₂. As GSTs se ligam não covalentemente a vários ânions, como sais biliares e a bilirubina, que inibem a atividade da enzima. Acredita-se que as GSTs tenham um importante papel no transporte destes ânions através dos hepatócitos para a bile (JAKOBY, 1985; DOUGLAS, 1987 e HOWIE e cols., 1989).

As GSTs representam uma família gênica complexa de enzimas diméricas normalmente presentes em grandes quantidades, representando cerca de 10% das proteínas extraídas do fígado de rato e cerca de 2% do fígado humano (CHASSEAUD, 1979). A maioria dos estudos sobre as GSTs foram realizados com fígados de ratos e humanos, mas essas enzimas já foram detectadas em todos os tecidos de mamíferos, e

outros organismos, como insetos, algas, fungos, protozoários e bactérias (JAKOBY, 1985).

CHASSEAUD (1979) classificou as GSTs em 5 isoenzimas: GSH S-ariltransferase, GSH S-epóxidotransferase, GSH S-alquiltransferase, GSH S-aralquiltransferase e GSH S-alquenotransferase. Esta classificação foi baseada na especificidade a determinados substratos. Mais tarde, a comparação das atividades específicas das GSTs isoladas, com uma variedade de substratos, levou à conclusão de que todas estas enzimas apresentam uma sobreposição de especificidade entre elas (PABST e cols., 1973). De acordo com JACOBY e colaboradores (1984), a padronização da nomenclatura das GSTs atribui a cada subunidade enzimática de rato um numeral arábico, e as do ser humano são denotadas por letras gregas (KAMISAKA e colaboradores, 1975).

A constatação das múltiplas formas da enzima, na maioria dos casos, é obtida por cromatografia e separação eletroforética, combinadas com a medida de atividade enzimática. Utiliza-se o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato eletrofílico. O uso deste composto como "substrato geral" para as GSTs tem sido de extrema importância no reconhecimento da grande quantidade de isozimas de várias origens. Porém, algumas formas enzimáticas apresentam baixa atividade específica com o CDNB, e o uso exclusivo desse substrato pode impedir a detecção de algumas formas existentes. Essas isozimas são detectadas no ser humano, ratos, camundongos, hamster,

suínos, galináceos, macacos e outras espécies animais (cf. MANNERVIK, 1985a).

A ocorrência destas isozimas deve-se a múltiplos genes e hibridização de subunidades. A existência das várias enzimas GST, provavelmente, significa uma característica biológica importante já que todas as espécies, cuidadosamente examinadas, apresentaram múltiplas formas da enzima. Se a função principal das GSTs é a desintoxicação, as múltiplas formas (isozimas) podem dispor de uma ampla cobertura a possíveis substratos (MANNERVIK, 1985a).

MANNERVIK e colaboradores (1985b) isolaram várias enzimas GST do citosol de células de fígados humanos, de ratos e de camundongos e, de acordo com os dados de sequenciamento de aminoácidos, o ponto isoeletrico e da reação cruzada com anticorpos, dividiram-na em três classes: alfa (básicas), mu (neutras) e pi (ácidas). As isoenzimas da mesma classe apresentam identidade na sequência de aminoácidos em 75-95%, sendo de 25 a 30% nas de classes diferentes. Recentemente, MEYER e colaboradores (1991) propuseram a existência de uma nova classe, chamada teta, encontradas no fígado de rato (GST5-5) e em humanos (GST teta). Essas duas isoenzimas apresentam estruturas primárias similares e pouca relação com as outras três classes.

A classificação das múltiplas formas da GST proposta por MANNERVIK e colaboradores (1985b) pode ser utilizada como padrão para as isozimas de outras espécies de mamíferos(ver figura 1.4).

No ser humano, foram identificadas várias isozimas diferindo nos pontos isoelétricos, pesos moleculares das subunidades e na especificidade a substratos. Apresentam expressão variável entre indivíduos, tecidos e em diferentes estágios do desenvolvimento. Estas diferentes formas estão presentes abundantemente no fígado, mas também são encontradas na maioria dos órgãos. Todas as proteínas citosólicas são diméricas, apresentando composição hetero e homodiméricas de subunidades.

Em fígado humano, KAMISAKA e colaboradores (1975) isolaram múltiplas formas da GST. Posteriormente, BOARD (1981a) confirmou esses resultados e demonstrou que essa enzima apresentava um alto grau de heterogeneidade entre os indivíduos. A interpretação desses dados sugeriu a existência de no mínimo três locos autossômicos para a GST no ser humano: GST1, GST2 e GST3 (LAISNEY e cols., 1984; STRANGE e cols., 1984). As isozimas produzidas por esses locos correspondem às classes evolutivas Mu, Alfa e Pi, respectivamente (SUZUKI e cols., 1987; BOARD & WEBB, 1987; BOARD e cols., 1989). Além disso, foram detectados outros dois locos: o GST4, que codifica uma isozima específica do músculo e o GST5, que codifica uma isozima específica do cérebro. Recentemente foi identificada uma isozima, a GST6, que parece ser codificada por um outro loco. Estas três últimas isozimas também são membros da classe Mu (SUZUKI e cols. 1987 e 1991).

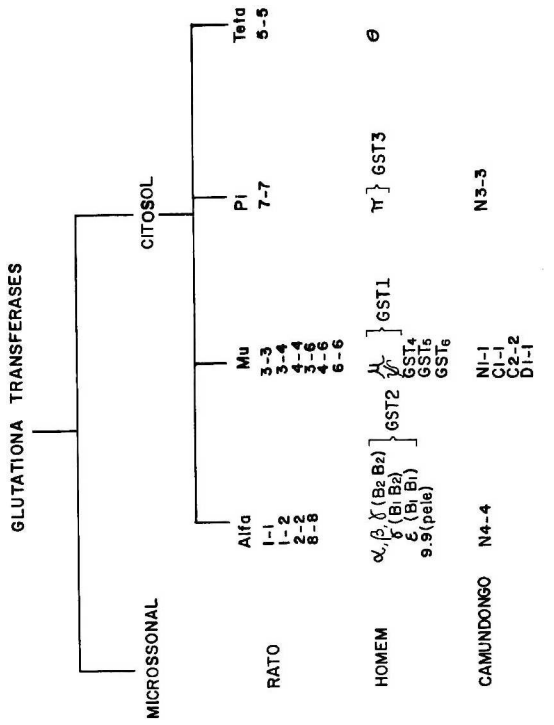


FIGURA 1.4: Classificação das GST do ser humano, de rato e camundongo (baseada nos dados de MANNERVIK, e cols.,1985b; BLADEREN,1990; MEYR e cols.,1991; SUZUKI e cols.,1991 e VORACHEK e cols.,1991).

As três classes das isozimas GST humana apresentam características distintas, mas cada classe pode representar mais do que uma forma. Essas diferentes formas de uma mesma classe não diferem significativamente em suas propriedades (TABELA 1.1 e 1.2).

TABELA 1.1: CARACTERÍSTICAS DAS DIFERENTES CLASSES DA GST HUMANA (MANNERVIK, 1985a).

PROPRIEDADE	TIPO DA ISOZIMA		
	BÁSICA(ALFA)	NEUTRA(MU)	ACIDA(PI)
SUBUNIDADE	25K	26K	23K
PONTO ISOELÉTRICO	7,5-9,0	6,6	<5,0

TABELA 1.2: ESPECIFICIDADE A SUBSTRATO DAS DIFERENTES CLASSES DA GST HUMANA (MANNERVIK, 1985a).

SUBSTRATOS	ATIVIDADE(MICROMOL.MIN.MG)		
	BÁSICA	NEUTRA	ACIDA
CDNB*	64	187	105
DCNB**	<0,065	0,032	0,11
BROMOSULFATALEINA	<0,01	<0,002	<0,002
ACIDO ETACRINICO	<0,044	0,081	0,86
OXIDO DE ESTIRENO	0,02	2,6	0,07
4,5-OXIDO DE BENZOPIRENO	0,047	0,92	0,13
CUMENO HIDROPEROXIDO	10,6	0,63	0,03
ANDROSTENO-3,17-DIONA	8,0	0,12	0,01
ACETATO DE p-NITROFENIL	0,18	0,22	0,19

*1-cloro-2,4-dinitrobenzeno ; ** 1,2-dicloro-4-nitrobenzeno

DE JONG e colaboradores (1991) compilaram os dados existentes sobre estas diferentes isozimas e concluíram que a GST humana consiste de no mínimo quatro famílias gênicas, formando uma superfamília: os genes que codificam as

subunidades da classe Alfa; os genes que codificam as subunidades da classe Mu; e provavelmente um gene para a GST Pi e um para a GST microsomal. Esses genes estão localizados em cromossomos diferentes, e novos genes ainda estão sendo adicionados a essa superfamília.

A distribuição das GSTs nos diferentes tecidos do ser humano não é uniforme. A tabela 1.3, apresenta a distribuição das diferentes classes das GSTs em alguns tecidos humanos. Entretanto, existem também estudos em outros tecidos como: pele (DEL BOCCIO e cols., 1987), útero (DI ILIO e cols., 1988a), placenta (HOWIE e cols., 1988), músculo (SHIVENDRA e cols., 1988; VORACHEK e cols., 1991), bile (HOWIE e cols., 1989), testículos (ACETO e cols., 1989; CAMPBELL e cols., 1990), cérebro (CAMPBELL e cols., 1990; SUZUKI e cols., 1991), coração (HIREL e cols., 1987; TSUCHIDA e cols., 1990) e próstata (TEW e cols., 1987). Os dados apresentados por esses trabalhos sugerem algumas isozimas tecido-específicas, ampliando ainda mais a variação tecidual, tornando-a mais complexa e longe de uma padronização. A razão dessa ampla variabilidade nos tecidos humanos não é clara, mas VOS & BLADEREN (1990) sugerem que isto possa refletir, parcialmente, adaptações às funções específicas desses tecidos.

TABELA 1.3: DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DAS DIFERENTES CLASSES DA GST NO HOMEM (VOS & BLADEREN, 1990).

TECIDO	CLASSES		
	ALFA	MU*	PI
FÍGADO	++	+/-	-
RINS	++	+/-	++
PULMÕES	±	+/-	++
INTESTINOS	++	+/-	+
ADRENAIS	++	+/-	-
ESTOMAGO	±	+/-	++
PANCREAS	±	+/-	++
ERITRÓCITOS	-	-	++

++ maiores componente; + quantidade moderada; ± menor componente; - traços ou ausente.

* isozimas da classe Mu estão ausentes aproximadamente em 40-50% dos indivíduos.

As isozimas da classe Alfa caracterizam-se pela atividade glutationa peroxidase para hidroperóxidos orgânicos (SUZUKI e cols., 1987; DEL BOCCIO e cols., 1987; STOCKMAM e cols., 1987). Esta atividade da GST pode estar envolvida na proteção às células contra efeitos tóxicos dos radicais livre e reparo de danos no DNA (TAN e cols., 1988).

BOARD & WEBB (1987), utilizando hibridização "in situ" com clones de DNAc-GST2, localizaram uma região de forte hibridização na banda cromossômica 6p12.

KAMISAKA e colaboradores (1975) foram os primeiros a descrever um esquema de purificação para as várias GSTs do tipo Alfa do fígado humano, e sugeriram que as múltiplas formas (Alfa, Beta, Gama, Delta e Epsilon) eram geradas por modificações pós-síntese, possivelmente pela desamidação. Análises comparativas de dados eletroforéticos de um grande número de indivíduos sugerem

que duas subunidades designadas GST2 tipo1 e GST2 tipo2 podem ser produtos de alelos de um único loco GST2 (BOARD,1981a). Esse conceito não foi confirmado por estudos subsequentes de STRANGE e colaboradores (1984) e LAISNEY e colaboradores (1984). Esses autores sugerem que a explicação mais provável para a variação na expressão das isoenzimas GST2 é a modificação pós-síntese. Os resultados da clonagem molecular de cDNAs que codificam ambas isozimas (TU & QUIAN,1986; BOARD & WEBB, 1987; RHOARDS e cols.,1987) têm revelado que estas duas principais isozimas, expressas no fígado humano, são bastante homólogas e diferem em somente um aminoácido. Esses dados concluem que as duas subunidades principais da classe Alfa são produtos de locos separados que apresentam diferentes níveis de expressão (BOARD & PIECE, 1987; RHOADS e cols., 1987; HAYES e cols.,1989).

A isozima conhecida como GST3 ou GST Pi é amplamente distribuída e é a forma mais abundante em muitos tecidos (SUZUKI e cols.,1987). No fígado adulto ela é detectada somente em pequenas quantidades, enquanto que as isozimas das classes Mu e Alfa são as predominantes (BOARD,1981a). Estudos imunológicos indicam que as isozimas Pi dos diferentes tecidos são todas produtos de um só loco, GST3 (HIRRELL E COLS., 1987), que está localizado no cromossomo 11q13 (LAISNEY e cols.,1983; BOARD e cols.,1989). Atualmente existem dados na literatura que supõem a multiplicidade da isozima Pi. Entretanto, ainda são

necessários estudos complementares para o esclarecimento das relações genéticas dessa isozima.

Esta isozima foi primeiro descrita nos eritrócitos (MARCUS E COLS.,1978). As análises eletroforéticas não identificaram alguma variação polimórfica determinada geneticamente (SCOTT & WRIGHT,1980; BOARD,1981a). Os estudos da atividade GST nos eritrócitos detectaram uma ampla variação inter-individual (SCOTT & WRIGHT,1980; STRANGE e cols.,1982). Há sugestões de que essa variabilidade possa ser determinada geneticamente nos grupos de esquimós estudados por SCOTT & WRIGHT (1980).

Nos últimos anos, vários trabalhos têm sugerido a possível utilização da GST Pi como marcador de tumores em uma variedade de tecidos humanos, incluindo fígado, colon, rins, cervix uterino e pulmões. A expressão dessa enzima está aumentada significativamente em alguns tecidos tumorais, refletindo-se no soro. Entretanto, essa associação não tem sido positiva em todos os casos. Alguns dados imunohistoquímicos indicam que a presença da GST Pi em tumores hepáticos não é específica para o estado neoplásico, sendo sua expressão também observada em fígado cirrótico (cf. KETTERER,1988; SHEA e cols.,1988; TSUCHIDA e cols.,1989; VOS & BLADEREM,1990).

No ser humano, a classe Mu contém várias isozimas diferentes que apresentam expressão tecido-específica. Essas isozimas GST com pontos isoelétricos entre 5,5-7,5 foram caracterizadas do fígado por vários grupos (WARHOLM e

cols.,1983; SOMA e cols.,1986; SINGH e cols.,1987; SUZUKI e cols.,1987). A grande variação no número dessas isozimas, encontrada em amostras de fígados de diferentes indivíduos, originou algumas confusões na literatura.

A primeira análise sistemática dessas isozimas foi realizada por BOARD (1981a). Quando o extrato de fígado de diferentes indivíduos é submetido à eletroforese, em pH 8,6 e subsequentemente coradas para a atividade GST, podem-se detectar vários fenótipos. Este autor propôs que essas isozimas são produtos da variação alélica de um loco gênico. A isozima mais ácida é constituída por um homodímero da subunidade do tipo1. A isozima mais neutra é a constituída pelo homodímero da subunidade do tipo2. A forma intermediária é um heterodímero das subunidades dos tipos 1 e 2. Aproximadamente 40% dos indivíduos não expressam nenhuma das subunidades GST1 e são considerados então como possuidores do fenótipo nulo. Um modelo genético para explicar a variação desses fenótipos foi proposto por BOARD (1981a) e foi confirmado por estudos posteriores (LAISNEY e cols.,1984; STRANGE e cols.,1984; HARADA e cols.,1987). Esse modelo propôs que as isozimas GST1 são produtos de variantes alélicas do loco GST1. Os quatro fenótipos detectados podem ser formados pela combinação de três alelos: GST1*1, GST1*2 e GST1*0. O fenótipo GST1 0 é caracterizado pela ausência das enzimas neutras e é homocigoto para o alelo GST1*0, enquanto os fenótipos GST1 1 é constituído pelos genótipos GST1 1-1 e GST1 1-0 e o fenótipo GST1 2 é formado pelos

genótipos GST1 2-2, GST1 2-0. O fenótipo GST1 2-1 é heterozigoto para os alelos GST1*1 e GST1*2 e possui três isozimas resultantes da combinação hetero e homodiméricas dos produtos dos dois alelos. A hipótese de três alelos fornece um ajuste excelente entre as frequências fenotípicas observadas e as esperadas em todas as populações estudadas (BOARD,1981a; LAISNEY e cols.,1984; STRANGE e cols.,1984; HARADA e cols.,1987).

Os estudos quantitativos demonstram que os extratos de fígados dos indivíduos homozigotos para o alelo GST1*0, com o CDNB como substrato, apresentam uma atividade enzimática total significativamente menor quando comparada com indivíduos que expressam os alelos GST1*1 e GST1*2 (BOARD,1981b). Além disso, BOARD (1981a) evidenciou, através dos zimogramas, que os indivíduos homozigotos para o alelo GST1*0 não expressam uma proteína inativa, visto que não há evidência para a presença de um heterodímero nos indivíduos heterozigotos para o alelos GST1*0 e os alelos GST1*1 ou GST1*2 . Subsequentemente, SUZUKI e colaboradores (1987) demonstraram imunologicamente a ausência das isozimas GST1 nos indivíduos homozigotos para o alelo GST1*0, enquanto que os homodímeros da tipo1 e do tipo2 apresentam tamanho idênticos da subunidade molecular, identidade imunológica e na sequência aminoterminal (SUZUKI e cols.,1987; BOARD e cols.,1988).

Uma isozima com pI de 6,6 chamada GST Mu foi purificada do fígado humano e bem caracterizada por WARHOLM

e colaboradores (1981,1983). Foi observado que essa isozima está ausente em várias amostras estudadas. Uma outra isozima com pI de 5,5 designada GST Psi também foi purificada do fígado humano por SINGH e colaboradores (1987). Ambas GST Mu e GST Psi apresentam sequências aminoterminal idênticas às das isozimas GST1 (SINGH e cols.,1987; BOARD e cols.,1988). Em adição, a similaridade de suas subunidades moleculares e pIs sugerem que a GST1 tipo1 é equivalente a GST Psi e a GST1 tipo2 é equivalente a GST Mu.

SEIDEGARD e colaboradores (1984) demonstraram a existência de uma isozima GST expressa em linfócitos, com alta atividade para o óxido de trans estilbeno como substrato. Essa isozima foi designada GST-tSBO e está frequentemente deficiente (SEIDEGARD & PERO,1985). Esta frequência da deficiência é semelhante a da GST Mu no fígado. Estudos subsequentes de SEIDEGARD e colaboradores (1987, 1988) demonstraram a identidade da GST Mu e GST-tSBO.

Dois clones contendo cDNA codificadores das isozimas GST1 foram isolados e sequenciados por SEIDEGARD e colaboradores (1988) e DE JONG e colaboradores (1988). A comparação das sequências desses clones revela só uma substituição de base (C -- G) na região codificadora, posição 172, convertendo Asn para Lis (DE JONG e cols.,1988). Essa diferença resulta na variação de carga que é compatível com a diferença entre as GST1 tipo1 e GST1 tipo 2. Assim, esses

clones de cDNA codificam as isozimas GST1 tipo1 ou GST Psi e GST1 tipo2 ou GST Mu.

SEIDEGARD e colaboradores (1988) demonstraram que os indivíduos deficientes na GST-tSBO apresentam uma deleção de um fragmento de DNA genômico de aproximadamente 8Kb. BOARD e colaboradores (1990) estudaram indivíduos com diferentes fenótipos GST1 incluindo a deficiência GST1 e confirmaram essa deleção nos indivíduos homocigotos para o alelo GST1*0 (nulo), que podem ser detectadas com várias enzimas de restrição.

Algumas evidências demonstraram a existência de proteínas adicionais da classe Mu, indicando que o polimorfismo genético dessas enzimas pode ser ainda mais complexo. As isozimas GST4 e GST5 descritas por LAISNEY e colaboradores (1984) e SUZUKI e colaboradores (1987) foram detectadas no músculo esquelético e cérebro, respectivamente. A isozima GST6, detectada em vários tecidos, apresenta variação individual e não está sempre presente (SUZUKI e cols.,1987). Os fatores que regulam essa expressão variável ainda não foram determinados.

CAMPBELL e colaboradores (1990) isolaram e caracterizaram uma isozima GST Mu detectada em testículos e cérebros (GST-T/B) que também está presente nos indivíduos que não apresentam a isozima Mu hepática. Recentemente, TSUCHIDA e colaboradores (1990) purificaram e caracterizaram 5 subunidades da classe Mu do coração e da aorta. Essas subunidades são formadas por combinações hetero e

homodiméricas, sendo identificadas duas isozimas como GST1 e GST4 e duas outras parecem ser produtos de genes adicionais da classe Mu com expressão tecido-específica. A relação entre as isozimas da classe Mu bem caracterizadas está apresentada na figura 1.5. Entretanto, existem evidências de que enzimas adicionais ainda podem ser incluídas nesse grupo (BOARD e cols.,1990).

A localização cromossômica dos genes da GST da classe Mu apresenta resultados contraditórios. Com a hibridização "in situ" (cDNA GST1) DE JONG e colaboradores (1988) identificaram a região p31 do cromossomo 1. Ao contrário, ISLAM e colaboradores (1989) evidenciaram essas seqüências no cromossomo 3, com células híbridas humano/roedor. Em 1991, DE JONG e colaboradores analisaram um painel de células somáticas híbridas humano-camundongo com uma sonda de cDNA-GST Mu. Desses resultados, os autores concluíram que as isozimas da classe Mu são codificadas por uma família multigênica dispersa, cujos genes se localizam em três cromossomos diferentes, 1, 6 e 13.

BOARD (1981a) sugeriu que a deficiência da GST1 pode aumentar a suscetibilidade individual a certos compostos derivados do ambiente. Foi demonstrado por WARHOLM e colaboradores (1983) e MANNERVIK & DANIELSON (1988) que uma das características principais das isozimas GST Mu é a atividade específica com os epóxidos. Por exemplo: o substrato óxido de trans estilbeno é utilizado pelas GST Mu

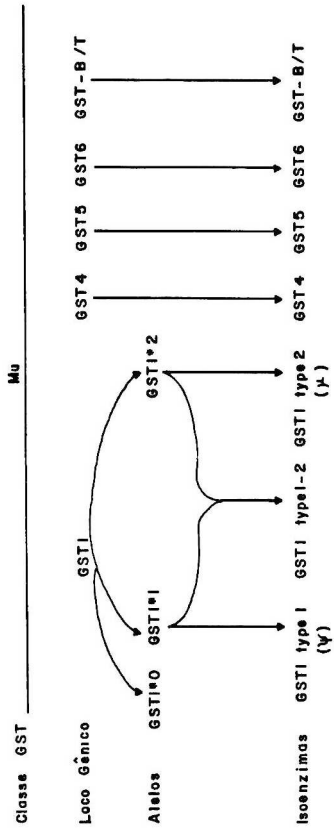


FIGURA 1.5: Relação das GST da classe Mu bem caracterizadas no ser humano (BOARD e cols., 1990).

mas não é reativo com as isozimas GST2 (classe Alfa) ou GUSTAR (classe Pi) (SEIDEGARD e cols.,1987; BOARD e cols.,1990).

Assim, essa alta seleção para substratos sugere que indivíduos deficientes para GST1 podem ser menos hábeis para metabolizar epóxidos e, logo, mais suscetíveis a danos celulares e genéticos por tais compostos. Sustentando essa hipótese, SEIDEGARD e colaboradores (1986) descreveram uma frequência elevada de deficientes da GST-tSBO em pessoas fumantes com câncer de pulmão comparadas com fumantes sem câncer. HARADA e colaboradores (1987), também encontraram uma frequência maior do fenótipo GST1 0 nos indivíduos com doenças hepáticas do que nos indivíduos com fígados normais.

Essa suscetibilidade diferenciada nos indivíduos deficientes para a GST1 pode ser relevante a vários tipos de órgãos e cânceres e ao metabolismo de alguns agentes farmacológicos . Entretanto, ainda são necessários vários estudos em diferentes populações para confirmar esta hipótese (BOARD e cols.,1990).

Dessa forma, propusemos-no a analisar o polimorfismo do loco GST1 e a atividade específica da GST total no fígado humano, numa contribuição ao conhecimento da genética deste sistema enzimático.

2 - OBJETIVOS

Neste contexto, os objetivos propostos foram:

- estudar a distribuição da atividade enzimática total nos diferentes fenótipos da GST1;
- verificar efeitos de variáveis biológicas e ou ambientais na distribuição de frequências do loco GST1 e na distribuição da atividade enzimática;
- comparar as distribuições dos fenótipos e da atividade enzimática total entre indivíduos que apresentam hepatopatas e indivíduos com histologia normal;
- investigar a incidência da alelo nulo em pacientes com desordens hepáticas;
- estimar as frequências gênicas da GST1 numa população mestiça e comparar com os dados da literatura de diferentes grupos raciais.

3 - MATERIAL E METODOS

AMOSTRA

A amostra estudada consta de 156 fragmentos de fígados humano (3 - 5 g) colhidos durante as autópsias do Serviço de Verificação de Óbitos do Interior (SVO) e do Serviço de Verificação de Óbitos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HC-USP), sob a responsabilidade do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), no período de maio/89 a julho/91. Como na literatura não existem dados sobre a estabilidade da GST após o óbito, limitamos a nossa coleta somente a tecidos com até 18 horas pós-morte.

A amostra do SVO foi colhida ao acaso durante o ano de 1990. Com base no diagnóstico macroscópico, a amostra do HC foi colhida alternando um fígado normal e um fígado histologicamente afetado, durante o período de novembro de 1990 a julho de 1991.

Os fragmentos de fígados colhidos foram lavadas em água corrente, colocadas em recipientes com suas respectivas identificações e congeladas a -70°C . No laboratório, o tecido foi cortado em pedaços pequenos e homogeneizado (sempre a 4°C) com adição de igual volume de tampão fosfato pH 6,5 (10mM). O homogeneizado foi centrifugado a $20.000\text{g}/4^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado, dividido em duas partes e congelado a -20°C até o momento das análises.

Cada tecido colhido recebia o número da autópsia e era registrado de acordo com um protocolo pré-estabelecido. Este registro contém dados de variáveis biológicas e/ou ambientais e da histologia do fígado. Além das informações macro e microscópicas fornecidas pelas equipes das autópsias, as lâminas destes tecidos eram reanalisadas para a uniformização do diagnóstico. Baseados nesse diagnóstico histológico, os fígados colhidos foram classificados como histologicamente normal (n = 73) e doentes (n = 79), ou seja, os que apresentaram alterações histológicas..

MÉTODOS LABORATORIAIS

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

A caracterização fenotípica foi baseada nos trabalhos de BOARD (1980 e 1981a), que utilizou a eletroforese horizontal em gel de amido seguida de coloração histoquímica específica para GST.

O sistema de eletroforese horizontal padronizado em nosso laboratório para a GST teve como suporte amido-agarose (2% e 0,8%). O sistema tampão utilizado foi Tris (0,1M), EDTA (0,01M), anidrido maleico (0,1M) e cloreto de magnésio (0,01M) em pH 7,4 nas cubas. O gel foi preparado com 80 ml de tampão da cuba diluído 1:15 e colocado em placa de vidro (20 X 20 cm) nivelada. Uma parte do sobrenadante de cada amostra foi descongelada, embebida em pequenos pedaços de papel Watman nº 3 e aplicada no gel. Este gel permitia a

aplicação de 16 amostras, sendo colocados 8 indivíduos diferentes e suas respectivas repetições.

A eletroforese foi feita em câmara fria (4-8 °C), utilizando-se cubas apropriadas para evitar o ressecamento do gel. As pontes eram feitas com "perfex", sendo aplicados aproximadamente 6 V/cm de gel durante 5 horas.

Após a eletroforese, era iniciada a fase de coloração. Aplicava-se, na superfícies do gel, uma mistura de reação contendo 8 mg de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (dissolvidos em 0,8 ml de etanol), 14 mg de glutatona reduzida e 20 ml de tampão fosfato pH 8,0 (0,1M). Em seguida o gel era coberto com papel de filtro comum e incubado a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, o papel de filtro era removido, o gel era lavado, com água deionizada, e cortado verticalmente ao meio, separavam-se assim, duas partes iguais. Em cada metade, coravam-se reações diferentes da segunda etapa da coloração, como descritas abaixo (figura 3.1):

- a) 0,5 g de agar eram dissolvidos em 40 ml de tampão tris/HCl pH 8,0 (0,1M), em banho-maria e no momento da aplicação sobre o gel, eram adicionados de 0,5 a 0,8 ml de uma solução de IKI (80 mM de I₂ e 120 mM de KI); as isozimas GST eram identificadas como bandas azuis em fundo branco (BOARD, 1981; com modificações).

b) 12 mg de metil-tio-tiazolil e 1 mg de 2,6-diclorofenol indofenol eram dissolvidos em 30 ml de tampão tris pH 10 (0,1M) e no momento da aplicação sobre o gel era adicionado igual volume de agar a 2%. O gel era incubado a 37 °C por 30 minutos; as isozimas GST eram identificadas como bandas incolores em fundo azul (HARADA e cols., 1987; com modificações).

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O método utilizado foi o descrito por HABIG e cols.(1974), em que uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que cataliza a formação de um micromol do produto por minuto, sob condições específicas do ensaio. A atividade específica foi definida como unidades de atividade enzimática por mg de proteínas medidas pelo método de ITZHAKI & GILL (1964), com soro albumina bovina como padrão.

A atividade enzimática foi determinada pelo monitoramento da variação na absorbância num espectrofotômetro Zeiss PMQ II. O substrato utilizado foi o CDNB. Uma mistura completa do ensaio (tabela 3.1), sem o extrato do tecido, foi utilizada como controle. Os ensaios foram conduzidos a 25 °C, em tampão fosfato de potássio pH 6,5 (0,1M), no qual a reação não enzimática é mínima. A concentração da glutatona reduzida (GSH) e do CDNB é de um milimolar num volume final de 3 ml.

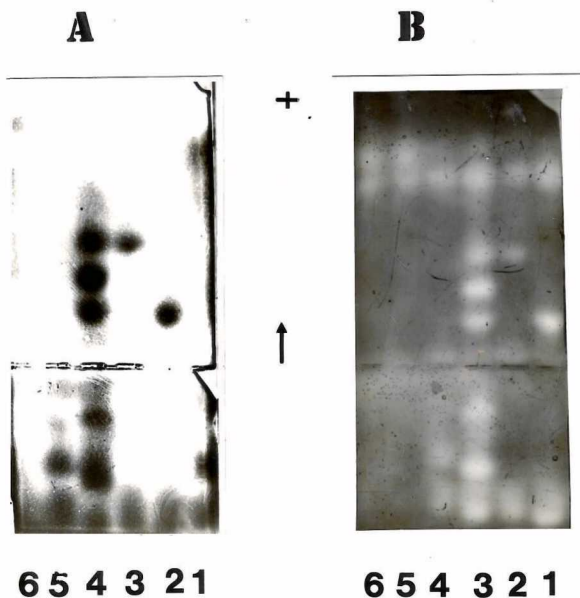


FIGURA 3.1: Zimograma da GST obtido conforme a metodologia descrita.

foto A: coloração com IKI, amostra 1,5 e 6-GST1 0
 amostra 2-GST1 2
 amostra 3-GST1 1
 amostra 4-GST1 2-1

foto B: coloração com MTT e DCIP, amostra 1-GST1 2
 amostra 2-GST1 1
 amostra 3-GST1 2-1
 amostra 4,5 e 6 GST1 0

TABELA 3.1: MISTURA COMPLETA DO ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

	BRANCO	TESTE (ml)
TAMPÃO	1,8	1,8
CDNB(5mM)	0,6	0,6
	incubar a 25°C/10'	
GSH(5mM)	0,6	0,6
	agitar	
EXTRATO	--	0,005
	agitar e iniciar a leitura	

Na maioria das amostras testadas, a variação da absorbância foi linear durante os 3 primeiros minutos, sendo todas realizadas em duplicata, tanto para o ensaio enzimático como para a dosagem de proteínas totais. Os extratos utilizados eram descongelados na hora do ensaio.

A fórmula utilizada para os cálculos das unidades de atividade enzimática foi:

$$U = \frac{A \ 340 \ X \ 3000}{9600 \ X \ V_{E} \ X \ P}$$

onde:

A 340 = é a variação da absorbância obtida por minuto em cada amostra testada.

3.000 = é o número final obtido das transformações que consideraram o volume do ensaio e mM.

9.600 = é o coeficiente de extinção molar do CDNB (HABIG e cols., 1974)

V_E = é o volume do extrato utilizado no ensaio em ml

P = é a quantidade de proteínas totais do extrato em mg/ml.

ANALISE DOS DADOS

As frequências gênicas foram estimadas por Verossimilhança Máxima utilizando-se o programa FREGEN, que faz parte do Sistema GENIOC (Programoteca do Laboratório de Genética do Instituto Oswaldo Cruz (CABELLO & KRIEGER, 1992).

As análises de variância e de regressão foram realizadas utilizando-se o Sistema SPSS-Statistical Package for Social Sciences (NORUSIS, 1986).

4 - RESULTADOS

4.1- DISTRIBUIÇÃO FENOTÍPICA E FREQUÊNCIAS GÊNICAS

Para estudar a distribuição fenotípica da GST1 utilizaram-se apenas os dados da amostra coletada no Serviço de Verificação de Óbitos (SVO). Esta amostra foi coletada ao acaso, sendo assim representa a população da região de Ribeirão Preto e possivelmente adequada para comparação com os dados da literatura.

Na tabela 4.1 apresentam-se os dados das frequências gênicas e distribuição fenotípica da GST1. O alelo GST1*0 é o mais frequente nesta amostra, seguido dos alelos GST1*1 e GST1*2. A distribuição fenotípica não está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, havendo um excesso de heterozigotos.

As variáveis biológicas analisadas foram sexo e idade. Esta amostra estudada apresenta mistura racial, assim analisou-se uma possível associação entre o tipo racial e o fenótipo da GST1. Entretanto, o $\chi^2_9 = 15,45$ ($0,05 < P < 0,10$), que não é significativo, sugere que a distribuição dos fenótipos nos grupos dos indivíduos classificados como brancos, mulatos, negros e amarelos é ao acaso. O mesmo resultado ($\chi^2_3 = 7,39$ com $0,05 < P < 0,10$) é verificado quando se analisaram apenas dois grupos, brancos e negróides (mulatos + negros). Quanto à variável sexo, observou-se que a distribuição fenotípica é ao acaso ($\chi^2_3 = 6,63$ com $0,05 < P < 0,10$).

TABELA 4.1: DISTRIBUIÇÃO FENOTÍPICA E FREQUÊNCIAS GÊNICAS DA GST1 NA AMOSTRA DE RIBEIRÃO PRETO.

FENOTIPOS	OBS.	ESP.	FREQ. GÊNICAS
GST1 0-0	46	43,023	GST1*0 = 78,39
GST1 1-1	11	14,161	GST1*1 = 11,99
GST1 2-1	05	1,614	GST1*2 = 9,62
GST1 2-2	08	11,202	$X^2 = 8,93*$
TOTAL	70		

* 0,001 > P > 0,01

As próximas análises foram efetuadas considerando-se dois grupos: os de fígados normais e os de doentes. Estes grupos foram formados com a união dos respectivos normais e doentes das duas amostras (HC e SVO).

Quando os dois grupos foram considerados, observou-se que a distribuição fenotípica entre eles é diferente ($X^2_3 = 10,72$). É interessante notar que as frequências dos alelos GST1*1 e GST1*2 diminuem bastante no grupo dos doentes em relação ao grupo dos normais. Já a frequência do alelo GST1*0 é muito maior no grupo dos doentes (TABELA 4.2).

A partição do X^2 da tabela 4.2 mostrou que o fenótipo GST1 0 é o responsável pela significância do X^2 (tabela 4.3). Logo, pode-se inferir que o fenótipo GST1 0 está associado com a histopatologia do fígado, ou seja, os indivíduos que apresentam esse fenótipo têm um risco três

vêzes maior de desenvolver doenças hepáticas. Devemos mencionar que a distribuição fenotípica nesses dois grupos não está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, havendo um excesso de heterozigotos. Porém esse resultado deve ser observado com cautela uma vez que os valores esperados na classe do fenótipo GST1 2-1 são muito reduzidos.

TABELA 4.2: DISTRIBUIÇÃO FENOTÍPICA E FREQUÊNCIAS GÊNICAS DA GST1 NOS GRUPOS DOS INDIVÍDUOS NORMAIS E DOENTES.

FENÓTIPOS	NORMAIS		DOENTES	
	OBS	ESP	OBS	ESP
GST1 0-0	35	32,4	58	56,1
GST1 1-1	10	12,9	07	8,9
GST1 2-1	07	3,7	03	0,9
GST1 2-2	21	23,8	11	12,9
	73		79	
FREQUÊNCIAS GÊNICAS				
GST1*1	12,2		6,4	
GST1*2	21,1		9,2	
GST1*0	66,3		84,2	
	$\chi^2=3,98*$		$\chi^2=5,25*$	

* **significante, com alfa = 5%**

TABELA 4.3: DISTRIBUIÇÃO DO FENÓTIPO GST1 0-0 ENTRE OS GRUPOS DOS DOENTES E DOS NORMAIS.

	NORMAIS	DOENTES
GST1 0	35	58
OUTROS FENÓTIPOS	38	21

$\chi^2 = 10,36$
 $0,001 < P < 0,005$
 risco relativo = 2,999

A distribuição dos diferentes fenótipos é ao acaso nos grupos dos indivíduos normais ($\chi^2_9 = 12,36$; $P > 0,10$) e dos doentes ($\chi^2_6 = 4,17$; $P > 0,10$) em relação ao grupo racial.

Quanto à variável sexo, observou-se que a distribuição dos fenótipos é ao acaso no grupo dos indivíduos normais ($\chi^2_3 = 5,62$; $P > 0,10$). Entretanto, a distribuição dos fenótipos no grupo dos doentes apresenta uma diferença significativa (tabela 4.4). Parece haver um número maior de homens com fenótipo GST1 0 que mulheres GST1 0.

TABELA 4.4: DISTRIBUIÇÃO DOS DIFERENTES FENÓTIPOS EM RELAÇÃO AO SEXO NO GRUPO DOS DOENTES ($\chi^2 = 9,02$ com 3 graus de liberdade, $0,01 < P < 0,05$).

	GST1 0-0	GST1 1-1	GST1 2-2	GST1 2-1	TOTAL
MASCULINO	39	06	03	01	49
FEMININO	19	01	08	02	30
	58	07	11	03	79

4.2-DISTRIBUIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A distribuição da atividade enzimática da GST na amostra total (HC e SVO) apresenta média de 0,45U e desvio padrão de 0,23U. Os valores observados não foram estatisticamente diferentes da distribuição normal. Existem entretanto, dois indivíduos que se afastam da distribuição normal, apresentando valores altos de atividade enzimática (FIGURA 4.1).

Nos dois grupos de indivíduos (os de fígado normal e os de fígado doente) as distribuições da atividade enzimática apresentam médias de 0,49U e 0,35U, respectivamente (FIGURA 4.1). A média do grupo dos doentes é cerca de 70% da média do grupo dos normais; esta diferença é estatisticamente significativa ($t = 4,21$ e $P < 0,001$).

A figura 4.2 apresenta a distribuição da atividade enzimática da GST total de acordo com os diferentes fenótipos do loco GST1. É observado aqui que tais distribuições diferem entre si. A análise de variância constatou, que a diferença de atividade enzimática encontrada entre os fenótipos, na amostra total, é significativa (TABELA 4.5). A menor média de atividade encontra-se nos indivíduos com fenótipo GST1 0 e a maior nos de fenótipo GST1 2-1. Os indivíduos com fenótipo GST1 1 e GST1 2 apresentam médias intermediárias.

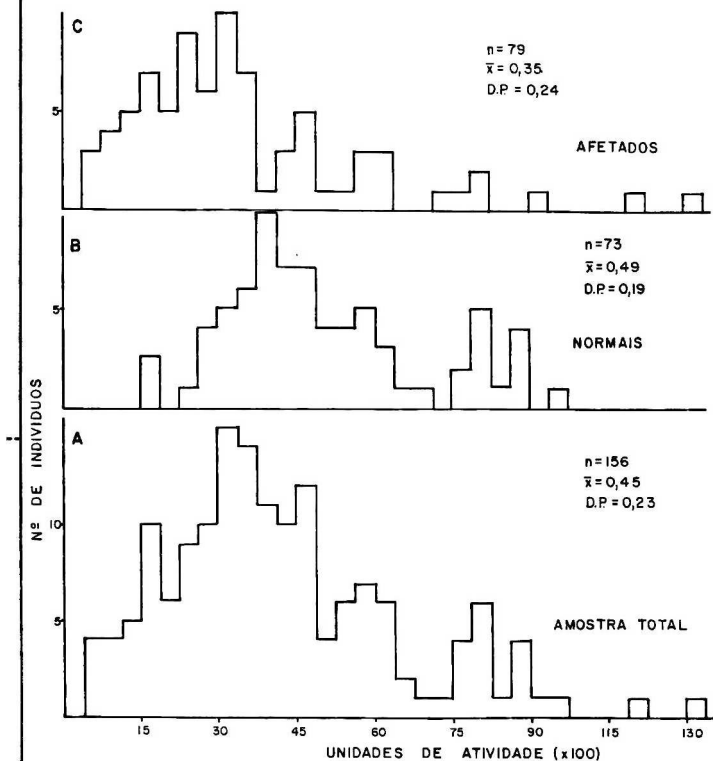


FIGURA 4.1: Distribuição da atividade enzimática da GST na amostra total(A), no grupo de indivíduos normais(B) e dos doentes(C). Uma unidade da enzi_{ma} foi definida como a quantidade capaz de con_{verter} 1 μ mol de CDNB/MIN/MG de proteína.

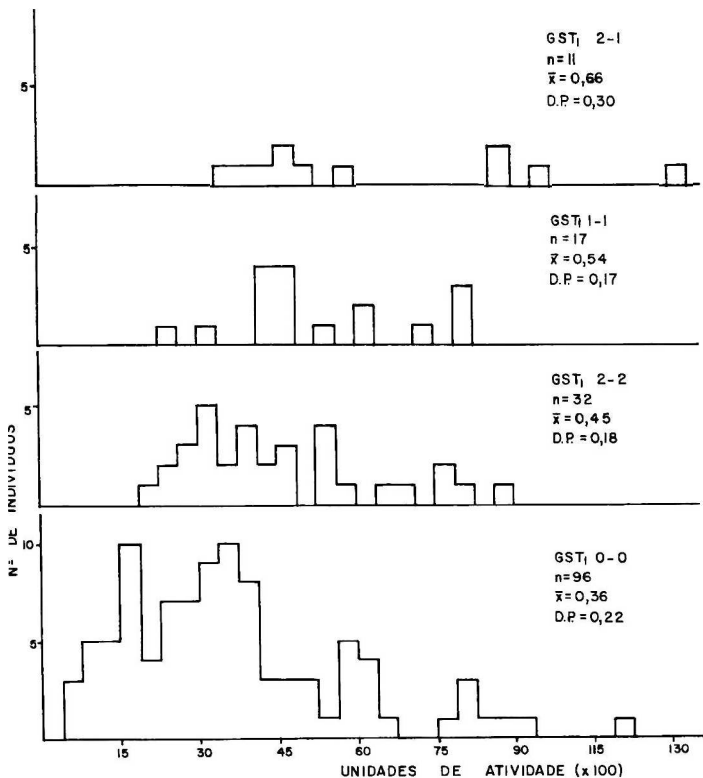


FIGURA 4.2: Distribuição da atividade enzimática da GST dividida de acordo com os fenótipos, na a mostra total.

A análise dos efeitos de variáveis biológicas e ambientais na atividade enzimática da GST utilizou o sexo, a idade, sexo x idade, idade ao quadrado, sexo x idade ao quadrado, raça, tempo de óbito e o fenótipo GST1 binarizado (ausência e presença da GST1). Para verificar os possíveis efeitos dessas variáveis realizou-se uma análise de regressão múltipla escalonada da atividade da GST sobre essas variáveis e, exceto a variável GST1, nenhuma das outras variáveis apresentou efeitos significativos sobre a atividade da GST.

Em geral, os dados da literatura que tratam da suscetibilidade a doenças em relação ao loco GST1, o fazem binarizando esse polimorfismo: considerando o fenótipo GST1 0 como ausência do loco e os outros fenótipos (GST1 1, GST1 2 e GST1 2-1) como presença do mesmo.

Seguindo esse tipo de abordagem, quando analisou-se a amostra total (FIGURA 4.3) observamos diferenças significativas entre as médias da atividade enzimática entre os dois grupos ($t = 3,74$; $P < 0,001$), sendo que a atividade média dos indivíduos que não apresentam o loco GST1 (GST1 0) é cerca de 70% da atividade dos que apresentam o loco GST1.

TABELA 4.5: ANÁLISE DE VARIANCIÁ NA AMOSTRA TOTAL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GST ENTRE OS FENÓTIPOS (* P<0,001).

FONTE DE VARIACÃO	g.l.	S.Q.	Q.M.	F	r ²
ENTRE	3	1,2083	0,4028	8,75*	0,147
DENTRO	152	6,9952	0,0460		
TOTAL	155	8,2035			

Ao considerar a ausência ou presença do loco GST1 nos grupos de indivíduos normais e doentes (FIGURA 4.4), observa-se que existe variação na distribuição da atividade enzimática, tanto entre o mesmo fenótipo dos dois grupos, como também, entre os diferentes fenótipos do mesmo grupo. A variação não é significativa apenas entre as distribuições dos indivíduos normais e doentes que apresentam o loco GST1 (TABELA 4.6).

TABELA 4.6: RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIANCIÁ DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA CONSIDERANDO A AUSÊNCIA E PRESENÇA DO LOCO GST1 E A HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO.

LOCO GST1	HISTOPATOLOGIA	FIGURA 4.4	F	P
ausência X presença	normais	B X D	4,76	P<0,05
ausência X presença	doentes	A X C	5,73	P<0,05
ausência	norm.X doentes	C X D	9,11	P<0,005
presença	norm.X doentes	A X B	2,43	P<0,10

4.3-DISTRIBUIÇÃO FENOTÍPICA E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO GRUPO DOS DOENTES.

No grupo dos indivíduos que apresentam o fígado doente (diagnóstico histopatológico ou de hepatopatias n = 79) existem diferentes patologias, mas somente a esteatose (n = 24) e a hepatopatia alcoólica (n = 15) apresentaram números de indivíduos suficientes para formarem grupos independentes e serem analisados como tais.

Nesse grupo de indivíduos doentes, observamos uma frequência significativamente maior do alelo GST1*0 e uma atividade média significativamente menor do que no grupo dos normais. Na tabela 4.7, apresenta-se a distribuição dos fenótipos e a média da atividade enzimática nos diferentes grupos dos doentes. Verifica-se que 93% dos indivíduos que apresentam hepatopatia alcoólica são GST1 0 e, este mesmo grupo apresenta a menor média de atividade enzimática entre os doentes. Nos grupos de esteatose e outras hepatopatias (histopatológicas), 79% e 63% dos indivíduos são GST1 0, respectivamente. E as médias de atividade enzimática nesses dois últimos grupos, parecem não ser diferentes.

A distribuição da atividade enzimática da GST, entre esses 3 grupos diferentes de doentes, foi avaliada pela análise de variância, que mostra uma diferença não significante entre esses grupos ($F = 2,48$; $0,10 > P > 0,05$). Entretanto, observa-se que a média dos que apresentaram

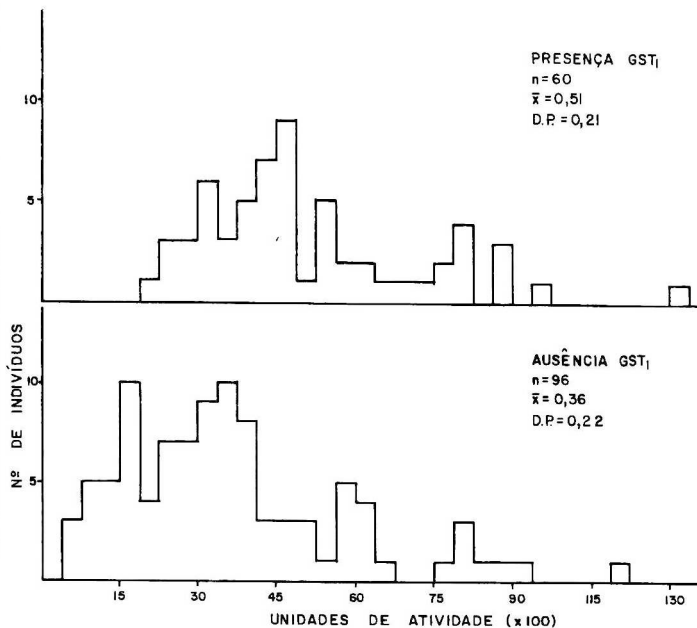


FIGURA 4.3: Distribuição da atividade enzimática da GST na amostra total de acordo com a presença e a aus sência do loco GST1.

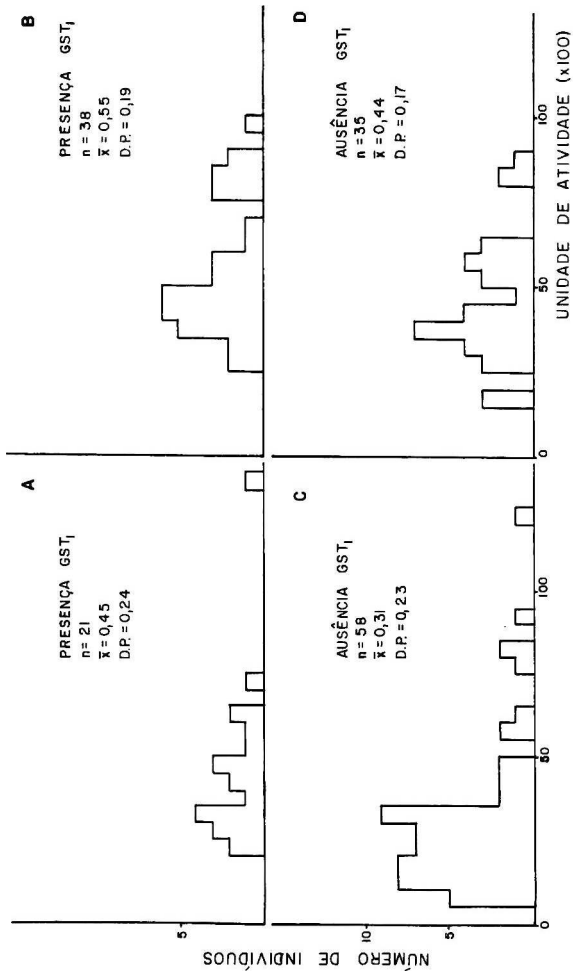


FIGURA 4.4: Distribuição da atividade enzimática da GST₁, de acordo com a presença e a ausência do loco GST₁, nos grupos dos indivíduos doentes (A e C) e dos normais (B e D).

hepatopatia alcoólica é menor quando comparada com o grupo da esteatose e de outras histopatologias (ou hepatopatias).

TABELA 4.7: DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DA GST1 E AS MÉDIAS DE ATIVIDADE DA GST NO GRUPO DOS DOENTES DIVIDIDOS DE ACORDO COM A HISTOPATOLOGIA.

HISTOPATOLOGIA	N	FENÓTIPO GST1				MÉDIA DA ATIVIDADE GST
		0-0	1-1	2-2	2-1	
ESTEATOSE	24	19	02	03	--	0,40U
HEPATOP.ALC.	15	14	01	--	--	0,23U
OUTRAS	40	25	04	08	03	0,36U

5 - DISCUSSÃO

5.1-FREQUENCIAS GENICAS DO SISTEMA GST1.

O polimorfismo do loco GST1 da classe Mu, descrito por BOARD (1981a) foi analisado em várias populações de diferentes grupos raciais (tabela 5.1). Esse loco apresenta os alelos GST1*1, GST1*2 e GST1*0 com frequências polimórficas e que variam tanto nas diferentes populações analisadas como dentro de um mesmo grupo racial. Além desses alelos encontramos um alelo variante, o GST1*3, detectado inicialmente em uma população de japoneses (HARADA e cols., 1987) e posteriormente em outras populações asiáticas (BHATTACHARYYA e cols.,1989).

O aspecto mais interessante desse polimorfismo é a alta frequência do alelo nulo, GST1*0. A distribuição varia um pouco nas diferentes populações, mas é o alelo mais frequente em todas as análises já efetuadas.

No presente trabalho, o loco GST1 foi estudado em uma amostra da população da região de Ribeirão Preto-São Paulo, constituída de 70 indivíduos. Nesta amostra as frequências dos alelos GST1*1, GST1*2 e GST1*0 foram 0,115, 0,10 e 0,72, respectivamente. O alelo GST1*0 é o mais frequente, estando de acordo com os dados da literatura. Entretanto, foi observado que a distribuição fenotípica dessa amostra apresenta um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2= 8,93$), com excesso de heterozigotos GST1 2-1. Este desvio foi verificado somente nesta amostra,

sendo ela a única população mestiça analisada. No entanto, não foram observados efeitos significantes do sexo e do tipo racial nessa distribuição. O número amostral pequeno, erros técnicos e vantagem do heterozigoto podem ser causas da não observância das condições de Hardy-Weinberg, mas a quantidade de informações sobre esse sistema (GST1) ainda é insuficiente para o seu esclarecimento.

TABELA 5.1: Frequências dos alelos do loco GST1 em diferentes populações.

POPULAÇÃO	N	GST1*1	GST1*2	GST1*0	GST1*3	AUTORES#
CHINESES	96	0,171	0,065	0,764	-	1
INDIANOS	43	0,160	0,280	0,560	-	1
CAUCASIANOS	40	0,106	0,078	0,816	-	1
CAUCASIANOS	56	0,074	0,279	0,647	-	2
CAUCASIANOS	49	0,130	0,230	0,640	-	3
JAPONESES	168	0,252	0,057	0,691	0,007	4
CHINESES	305	0,164	0,093	0,730	0,011	5
INDIANOS	185	0,113	0,179	0,702	0,005	5
MALAIOS	147	0,116	0,126	0,754	0,003	5
SINGAPURA	46	0,162	0,149	0,688	-	5
BRASILEIRA	72	0,115	0,100	0,782	-	6

1= BOARD (1981a) 2= LAISNEY e cols.(1984) 3=STRANGE e cols.(1984) 4= HARADA e cols.(1987) 5= BHATTACHARYYA e cols.(1989) 6= este estudo.

5.2-ASSOCIAÇÃO DO SISTEMA GST1 E DOENÇAS

A identificação de marcadores genéticos que predis põe os indivíduos ao câncer induzido por fatores ambientais é um dos mais importantes problemas na avaliação de risco. As diferenças interindividuais das taxas metabólicas refletem um polimorfismo genético, o qual é bem

constatado na observação das diferentes respostas toxicológicas a um dado xenobiótico (NEBERT, 1991 e Idle, 1991). Este argumento está baseado em estudos epidemiológicos, que têm revelado as associações entre alelos específicos de genes do metabolismo e o aumento do risco ao câncer e outras doenças. Fica assim bioquimicamente demonstrada a grande variação individual na capacidade de metabolização de produtos químicos (cf. BELL, 1991).

A variabilidade genética existente na glutathione transferase pode ser um dos fatores na determinação da susceptibilidade individual aos efeitos tóxicos de vários xenobióticos (BOARD, 1981a). A alta atividade das enzimas da classe Mu com metabólitos epóxidos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (que geralmente possuem potencial carcinogênico) pode ser de significado para a sugestão anterior. Diante desses dados e da alta frequência do alelo nulo nesse sistema do metabolismo dos xenobióticos, houve um crescente interesse para os estudos da possível associação da GST Mu com doenças e o risco ao câncer.

HARADA e cols., (1987) detectaram uma alta frequência do alelo GST1*0 nos fígados com hepatite crônica e carcinoma, em relação aos fígados normais. SEIDEGARD e cols., (1990) relataram que fumantes com baixa atividade da GST Mu nos seus linfócitos têm um risco aproximadamente duas vezes maior de desenvolver câncer de pulmão. Além disso, os indivíduos com fenótipo homocigoto para o alelo nulo, ou seja, que não apresentam o produto do loco GST1, também têm

um risco três vezes maior para adenocarcinoma de estômago e cólon (STRANGE e cols.,1991). Existe também uma correlação positiva com o fenótipo nulo e o carcinoma de pulmão (ZHONG e cols.,1991).

WIENCKE e colaboradores (1990) demonstraram que esse polimorfismo, além de marcador de suscetibilidade ao câncer, também é marcador da suscetibilidade a danos citogenéticos induzidos. Os indivíduos deficientes para a GST Mu são altamente sensíveis à troca de cromátides irmãs pelo óxido de trans estilbeno e pelos altos níveis séricos de nicotina (POPPEL e cols.,1992). Esse polimorfismo também influencia na formação de aductos de DNA com a aflatoxina B1 "in vitro" (LIU e cols.,1991).

Neste trabalho estudou-se o polimorfismo da GST1 da classe Mu, em indivíduos normais e com doenças hepáticas, através do ensaio de atividade enzimática e da caracterização fenotípica.

As distribuições dos fenótipos nos grupos dos indivíduos normais e dos doentes diferem significativamente. O fenótipo GST1 0 contribui em níveis significantes para essa diferença. Assim, observou-se um aumento significativo na frequência do alelo GST1*0 nos doentes em relação aos normais, demonstrando que os indivíduos homocigotos para esse alelo têm um risco três vezes maior de desenvolver hepatopatas.

Essa distribuição é ao acaso em relação à variável raça nos dois grupos (doentes e normais). Quanto ao sexo, o

grupo dos doentes apresenta um número maior de homens com fenótipo GST1 0. Entretanto, essa distribuição apresenta números pequenos que podem distorcer a análise. A análise de uma amostra maior é necessária para confirmar esse efeito. Já no grupo dos normais a distribuição dos fenótipos é ao acaso em relação ao sexo.

O desvio significativo com excesso de heterozigotos encontrado na amostra da população de Ribeirão Preto, também é detectado nos grupos dos doentes e dos normais. Esse dado merece mais estudos a níveis populacionais de outras amostras brasileiras e de diferentes grupos raciais para o seu esclarecimento.

5.3-DISTRIBUIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

Neste trabalho, os valores dos níveis de atividade enzimática se distribuíram-se normalmente na amostra total (FIGURA 4.1A). Entretanto existe uma diferença significativa entre os níveis de atividade enzimática nos diferentes fenótipos (TABELA 4.5 e FIGURA 4.2). Os indivíduos homozigotos para o alelo GST1*0 apresenta a menor média de atividade, enquanto a maior é encontrada nos indivíduos heterozigotos GST1 2-1. O fato dos fenótipos GST1 1 e GST1 2 apresentarem uma média de atividade menor à da GST1 2-1 pode ser explicada pela presença de heterozigotos com o alelo nulo nos dois primeiros fenótipos.

Deve-se enfatizar também que o número esperado de indivíduos GST1 2-1 é extremamente reduzido (ver TABELA 4.1), o qual pode ser responsável pelo incremento substancial do χ^2 , precisando portanto de estudos com uma amostragem maior que permita elucidar se o desequilíbrio encontrado é consistente.

A média de atividade enzimática dos indivíduos homocigotos para o alelo GST1*0 é a menor. E quando comparada com todos os indivíduos que expressam os alelos GST1*1 ou GST1*2, ou seja, indivíduos que expressam o loco GST1, essa redução está em torno de 30% (FIGURA 4.3). Essa atividade residual nos homocigotos para o alelo nulo, provavelmente é devido à ação dos produtos do loco GST2 e em menor extensão ao loco GST3. Esse dado é semelhante ao de BOARD (1981b), o qual demonstrou que a atividade enzimática da GST é reduzida significativamente (= 35%) nos indivíduos homocigotos para o alelo nulo. E essa redução na atividade da GST tem várias implicações clínicas, entre elas, na hiperbilirrubinemia do recém-nascido e em várias desordens hepáticas.

A análise de variáveis biológicas e ou ambientais é importante quando se tenta esclarecer um padrão de herança para características quantitativas. As variáveis sexo, raça e tempo de óbito não apresentaram nenhum efeito significativo sobre a atividade da GST. Somente a variável GST1 (binarizada) apresenta efeitos significativos, o que confirma os dados anteriormente citados da análise de

variância. Assim, a atividade enzimática total da GST no fígado humano, para o CDNB como substrato, é dependente do fenótipo expressado pelo loco GST1 mas, ele não explica toda a variação encontrada nos níveis de atividade enzimática da GST.

Neste trabalho, ao considerar os grupos dos indivíduos normais e dos doentes em relação à atividade enzimática, constatou-se que a média de atividade nos doentes é cerca de 70% da média dos normais (FIGURA 4.1). Essa diferença significativa vem reforçar os dados anteriores de que o alelo GST1*0 está associado à doenças hepáticas e os portadores desse alelo em homozigose apresentam uma redução significativa na atividade enzimática total da GST. Logo, é provável que entre os indivíduos doentes encontre-se maior número de indivíduos com fenótipo GST1 0, o que diminui significativamente a média de atividade. Esse fenômeno é verdadeiro para a amostra deste estudo, ou seja, 73% dos doentes são homozigotos para o alelo nulo enquanto que nos normais a frequência deste fenótipo é de 48%. Esta última frequência é próxima às citadas na literatura que estão em torno de 50% (BOARD, 1981a; WARHOLM e cols., 1981; SEIDEGARD e cols., 1986; HARADA e cols., 1987).

A análise de variância (TABELA 4.6) realizada para verificar as diferenças nas distribuições dos níveis de atividade enzimática da GST, considerando a ausência e a presença do loco GST1 nos grupos dos normais e dos doentes constatou: as distribuições da atividade dos indivíduos que

apresentam o loco GST1 e os que não apresentam no grupo dos normais são diferentes; o mesmo foi detectado no grupo dos doentes; os indivíduos que têm ausência do loco GST1 e são normais, apresentam uma diferença significativa nessa distribuição em comparação com os que têm ausência e são doentes; entre os indivíduos normais e os doentes que expressam o loco GST1 não há diferença estatisticamente significativa na distribuição da atividade (FIGURA 4.4). Resumindo, em ordem crescente da média de atividade enzimática da GST nesses grupos temos: ausência GST1/afetado<ausênciaGST1/normal<presençaGST1/afetado<presençaGST1/normal. Essa diferença entre esses dois últimos grupos não é estatisticamente significativa e, possivelmente pode ser explicada pela associação do alelo GST1*0 com as hepatopatias, ou seja, no grupo dos indivíduos que expressam o loco GST1 e são doentes, espera-se encontrar um número maior de heterozigotos para o alelo nulo do que entre os normais.

5.4-DISTRIBUIÇÃO FENOTÍPICA E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO GRUPO DOS DOENTES.

Diante desses dados apresentados, surge o interesse de saber qual das diferentes hepatopatias, encontradas nesse grupo dos doentes, é influenciada por essa associação.

O grupo dos doentes (n = 79) foi dividido em três subgrupos de acordo com a análise histológica : esteatose, hepatopatia alcoólica e outras hepatopatias. É interessante observar que o fenótipo GST1 0 representa 93% dos indivíduos com hepatopatia alcoólica, 79% dos indivíduos com esteatose e 63% dos indivíduos com outras hepatopatias (TABELA 4.7). As distribuições da atividade enzimática desses grupos não são diferentes estatisticamente. Mas, nota-se que os indivíduos com hepatopatia alcoólica apresentam uma percentagem maior de homocigotos para o alelo nulo e conseqüentemente a menor média de atividade enzimática.

Como a amostra de fígados com hepatopatia alcoólica é pequena (n = 15) não é possível fazer inferências conclusivas. Esses dados merecem maiores estudos, pois BORA e colaboradores (1989) sugeriram que a GST hepática é um importante sistema para a eliminação do etanol. HARADA e colaboradores (1987) detectaram uma maior frequência do fenótipo GST1 0-0 em fígados com hepatite crônica, hepatopatia alcoólica e carcinoma em relação aos fígados normais. HARRISON e colaboradores (1990) não detectaram uma relação estatisticamente significativa entre a severidade do dano alcoólico e a GST Mu. Em 1991, GROPPi e colaboradores também não detectaram diferença entre as frequências da expressão do loco GST1 e da ausência em indivíduos com cirrose alcoólica. Uma vez que os dados da

literatura apresentam resultados discordantes, torna-se necessária a ampliação dos estudos sobre esta enzima.

5.5-ASPECTOS EVOLUTIVOS DA GST.

O polimorfismo do loco 1 da GST do fígado humano apresenta um alelo nulo com frequência alta em todos os grupos raciais analisados e nessa população mestiça. E parece ter se fixado em pequenos grupos de polinésios estudados por BOARD e colaboradores (1990).

A origem desse polimorfismo da GST1 é uma questão intrigante. Diferentes espécies de mamíferos também apresentam as três diferentes classes da GST (MANNERVIK, 1985b) e o macaco rhesus apresenta as GST hepáticas semelhantes as do ser humano (HOSCH & BOYER 1988). Esses autores concluem que as três classes GST divergiram antes da evolução das diferentes espécies de mamíferos, sendo conservadas entre elas. Porém, em nenhuma das espécies analisadas foi detectado variação nas GST Mu.

Em humanos o fenótipo GST1 0 parece ser originado por uma deleção gênica e possivelmente idêntica em todos os grupos raciais, indicando uma origem ancestral comum (BOARD e cols., 1990). Assim, se existe uma desvantagem seletiva associada a esse alelo nulo, não é provável que esteja relacionada com fatores ambientais ou estilo de vida que tenham influenciado a evolução dos grupos raciais maiores (BOARD e cols., 1990). Entretanto, DE JONG e

colaboradores (1991) sugerem que a deleção gênica pode não ser a melhor explicação para o fenótipo nulo por dois motivos: ele está presente com altas frequências na maioria das populações humanas e o gene da GST1 (cromossomo 13) é membro de uma família gênica dispersa. Esses autores propõem que uma menor proporção da população humana pode ter ganho uma cópia do gene da classe GST Mu, possivelmente por transposição de DNA ou por recombinação durante a evolução. Também sugerem, se o mapeamento de ISLAM e colaboradores (1989) no cromossomo 3 for verdadeiro, a possibilidade dos cromossomos alvo variarem em diferentes partes do mundo.

BOARD e colaboradores (1990) sugerem que a alta frequência do alelo nulo, que está associado à doenças, pode ser devida ao fato de que essas doenças se manifestam em indivíduos de meia idade ou idade avançada, e nesse tempo, a maioria já se reproduziu e transmitiu o gene nulo antes da manifestação da doença.

Uma vez que os estudos sistemáticos sobre o sistema polimórfico GST1 são bastante recentes, parece prematuro fazer inferências conclusivas sobre os mecanismos responsáveis pela manutenção deste polimorfismo.

6 - CONCLUSÕES

Neste trabalho podemos verificar que, na população de Ribeirão Preto (SP), o loco 1 da glutathione transferase é polimórfica apresentando três alelos já descritos na literatura. O alelo nulo, GST1 0, é o mais frequente e a distribuição fenotípica apresenta um excesso de heterozigotos GST1 2-1, o que caracteriza um desequilíbrio nesse sistema. Este dado requer uma análise mais minuciosa sobre amostras maiores e principalmente em diversas populações.

A análise da atividade enzimática da GST constatou que ela é dependente dos fenótipos do loco GST1. Os indivíduos que não expressam esse loco (GST1 0) têm uma redução de 30% na atividade enzimática em comparação com os que expressam a GST1.

O alelo nulo confere uma redução da atividade enzimática da GST do fígado humano, levando os indivíduos que expressam esse alelo em homozigose (ausência da GST1), a ter um risco 3 vezes maior de desenvolver doenças hepáticas. Essa associação foi verificada em algumas doenças hepáticas e pulmonares, porém, existem dados na literatura onde essa associação não é significativa. Esse aspecto, ainda necessita de mais estudos em diferentes populações e com amostras adequadas para várias doenças.

Na literatura sobre esse sistema enzimático constata-se uma variação muito grande na definição e nomenclatura utilizada pelos diversos autores. Como esses

estudos são relativamente novos, essa diversidade torna o assunto bastante complexo e com grande necessidade de ampliação.

Em relação a possíveis associações dessa deficiência com doenças, espera-se ainda muitos dados pois a análise das relações entre os polimorfismos genéticos e as doenças pode fornecer um melhor entendimento das bases genéticas e a manutenção desses polimorfismos dentro e entre as populações humanas.

Além disso, o fato de que o fenótipo do loco GST1 é refletido no perfil isoenzimático da GST dos linfócitos mononucleares oferece perspectivas para uma fenotipagem relativamente fácil dos indivíduos, esse tipo de análise pode ser útil em: a) no esclarecimento das possíveis consequências tóxicas e fisiológicas dos diferentes fenótipos da GST1, b) na explicação das diferenças interindividuais no metabolismo de certos xenobióticos e c) no estabelecimento de regras de segurança relativas no manejo de produtos químicos tóxicos (biomonitoramento).

Assim, a caracterização completa do gene da GST1 e outros da classe Mu são essenciais para o entendimento da expressão e evolução dessa família gênica, de sua farmacogenética e da epidemiologia de doenças que comprometam o funcionamento de órgãos tais como o fígado e os pulmões.

7 - RESUMO

A glutationa transferase foi estudada em uma amostra de fígados de indivíduos da região de Ribeirão Preto (SP). Esse sistema enzimático foi analisado através do fenótipo da GST1 e da atividade enzimática total da GST, utilizando o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno como substrato. Tal análise apresentou 3 resultados principais:

1 - O polimorfismo da GST1, apresentou nesta amostra uma frequência maior do alelo GST1*0 e um excesso de heterozigotos GST1 2-1, o que resulta em um desequilíbrio das frequências fenotípicas para esse sistema.

2 - Uma redução da atividade enzimática total, nos indivíduos que expressam o alelo nulo em homozigose, em aproximadamente 30%.

3 - A associação do alelo nulo com doenças hepáticas, faz com que indivíduos em homozigose para esse alelo possuam menor atividade enzimática, e consequentemente, maior susceptibilidade a lesões hepáticas.

8 - SUMMARY

A sample from individuals of the Ribeirão Preto's (SP state) area was studied for Glutathione Transferase. This enzymatic system was analysed by the phenotype of GST1 and specific enzymatic activity of the enzyme, employing 1-chloro-2,4-dinitrobenzene as substrate. Three major points were evidenced in this analysis:

- 1- a disequilibrium in the allele frequencies in the sample, caused by an excess of the GST1*0 allele and of the heterozygous phenotype GST1 2-1.
- 2- individuals homozygous for the null allele showed a reduced enzymatic activity of about 30%.
- 3- this reduced enzymatic activity due to homozygosity of the null allele was associated to a higher susceptibility to hepatic diseases.

9 - BIBLIOGRAFIA

- ACETO, A.; DI ILIO, C.; ANGELUCCI S.; FELACO, M. & FEDERICI, G. (1989). Glutathione transferase isoenzymes from human testis. *Biochem. Pharmacol.* 38(21):3653-3660.
- BELL, D.A. (1991). Detection of DNA sequence polymorphisms in carcinogen metabolism genes by polymerase chain reaction. *Env. and Mol. Mut.* 18:245-248.
- BHATTACHARYYA, S.P.; SAHA, N. & WEE, K.P. (1989). Glutathione S-transferase (GST) polymorphism among ethnic groups in Singapore with report of additional alleles at loci 1 and 2. *Gene Geogr.* 3:21-26.
- BLACK, S.M. & WOLF, C.R. (1991). The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance. *Pharmac. Ther.* 51:139-154.
- BLADEREN, P.J.V. & OMMEN, B.V. (1991). The inhibition of glutathione transferases: mechanism, toxic consequences and therapeutic benefits. *Pharmac. Ther.* 51:35-46.
- BOARD, P.G. (1980). A method for the localization of glutathione S-transferase isozymes after starch gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 105:147-149.
- BOARD, P.G. (1981a). Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. *Am. J. Hum. Genet.* 33:36-43.
- BOARD, P.G. (1981b). Gene deletion and partial deficiency of the glutathione S-transferase (lingandin) system in man. *Febs. Letters* 135(1):12-14.
- BOARD, P.G.; COGGAN, M.; JOHNSTON, P.; ROSS, V.; SUZUKI, T. & WEBB, G. (1990). Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. *Pharmac. Ther.* 48:357-369.
- BOARD, P.G. & PIERCE, K. (1987). Expression of human glutathione S-transferase 2 in *E. coli*. Immunological comparison with the basic glutathione S-transferase isoenzymes from human liver. *Biochem. J.* 248:937-941.
- BOARD, P.G. & WEBB, G.C. (1987). Isolation of a clone and localization of human glutathione S-transferase 2 genes to chromosome band 6p12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2377-2381.
- BOARD, P.G.; SUZUKI, T. & SHAW, D.C. (1988). Human muscle glutathione S-transferase (GST4) show close

- homology to human liver GST1. *Biochim.Biophys.Acta* 953:214-217.
- BOARD,P.G.; WEBB,G.C. & COGGAN,m.(1989). Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Ann.Hum.Genet.*53:205-213.
- BORA,P.S.; SPILBURG,C.A. & LANGE,L.G. (1989). Metabolism of ethanol and carcinogens by glutathione transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4470-4473.
- CABELLO,P.H. & KRIEGER,H. (1992). GENIOC - Programoteca. Ed. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. (in press).
- CAMPBELL,E.; TAKAHASHI,Y.; ABRAMOVITZ,M.; PERETZ,M. & LISTOWSKY,I.(1990). A distinct human testis and brain Mu-class glutathione S-transferase. Molecular cloning and characterization of a form present even in individuals lacking hepatic type Mu isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 265(16): 9188-9193.
- CHASSEAUD,L.F. (1979). The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Canc. Res.* 29:175-274.
- DEJONG,J.L.; MOHANDAS,T. & TU,C-P.D. (1991). The human H_b (Mu) class glutathione S-transferases are encoded by a dispersed gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180(1):15-22.
- DEJONG,J L ; MORGENSTERN,R.; JORNVALLE,H.; DE PIERR,J.W. & TU,C-P.D. (1988). Gene expression of rat and human microsomal glutathione S-transferases. *J.Biol.Chem.*263(17):8430-8436.
- DEL BOCCIO,G.; DI ILIO,C.; ALIN,P.; JORNVALLE,H. & MANNERVIK.B. (1987). Identification of a novel glutathione transferase in human skin homologous with class Alpha glutathione transferase 2-2 in the rat. *Biochem.J.*244:21-25.
- DI ILIO,C.; ACETO,A.; DEL BOCCIO,G.;CASALONE,E.; PENNELLI,A. & FEDERICI,G. (1988). Purification and characterization of five forms of glutathione transferase from human uterus. *Eur.J.Biochem.*171:491-496.
- DOUGLAS,K.T. (1987). Mechanism of actions of glutathione-dependent enzymes. *Adv.Enz.*59:103-167.

- GONZALEZ, F.J. & NEBERT, D.W. (1990). Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant warfare, molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends in Genet.* 6(6):182-186.
- GROPPI, A.; CONTELLE, C.; FLEURY, B.; IRON, A.; BEGUERET, J. & COUZIGOU, P. (1991). Glutathione S-transferase class Mu in French alcoholic cirrhotic patients. *Hum. Genet.* 87:628-630.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J. & JAKOBY, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249(22):7130-7139.
- HARADA, S.; ABEI, M.; TANAKA, N.; AGARWAL, D.P. & GOEDDE, H.W. (1987). Liver glutathione S-transferase polymorphism in Japanese and its pharmacogenetic importance. *Hum. Genet.* 75:322-325.
- HARRISON, D.J.; MAY, L.; HAYES, P.C.; HAQUE, M.M. & HAYES, J.D. (1990). Glutathione S-transferases in alcoholic liver disease. *Gut.* 31:909-912.
- HAYES, J.D.; KERR, L.A. & CPONSHAW, A.D. (1989). Evidence that glutathione S-transferase B1B1 and B2B2 are the products of separate genes and that their expression in human liver is subject to inter-individual variation. *Biochem. J.* 264:437-445.
- HIRRELL, P.A.; HUME, R.; FRYER, A.A.; COLLINS, M.F.; DREW, R.; BRADWELL, A.R. & STRANGE, R.C. (1987). Studies on the developmental expression of glutathione S-transferase isoenzymes in human heart and diaphragm. *Biochim. Biophys. Acta* 915:371-377.
- HOESCH, R.M. & BOYER, T.D. (1988). Purification and characterization of hepatic glutathione S-transferases of rhesus monkeys. *Biochem. J.* 251(1): 81-88.
- HOWIE, A.F.; HAYES, J.D. & BECKETT, G.J. (1988). Purification of acidic glutathione S-transferases from human lung, placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their measurement. *Clin. Chim. Acta* 177:65-76.
- HOWIE, A.F.; HAYES, P.C.; BOUCHIER, I.A.D.; HAYES, J.D. & BECKETT, G.J. (1989). Glutathione S-transferase in human bile. *Clin. Chim. Acta* 184:269-278.
- IDLE, J.R. (1991). Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? *Mut. Res.* 247:259-266.

- ISLAM, M.Q.; PLATZ, A.; SZPIRER, J.; SZPIRER, C.; LEVAN, G. & MANNERVIK, B. (1989). Chromosomal localization of human glutathione transferase genes of classes alpha mu and pi. *Hum. Genet.* 82:338-342.
- ITZHAKI, R.F. & GILL, D.M. (1964). A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.* 9:401-410.
- JAKOBY, W.B. (1985). Glutathione transferases: an overview. *Meth. Enzymol.* 113:495-499.
- JAKOBY, W.B.; KETTERER, B. & MANNERVIK, B. (1984). Glutathione transferases: nomenclature. *Biochem. Pharmacol.* 33:2539-2540.
- KAMISAKA, K.; HABIG, W.H.; KETLEY, J.N.; ARIAS, I.M. & JAKOBY, W.B. (1975). Multiple forms of human glutathione S-transferase and their affinity for bilirubin. *Eur. J. Biochem.* 60:153-161.
- KETTERER, B. (1988). Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mut. Res.* 202:343-361.
- KLAASSEN, C.D. (1986). Distribution, excretion, and absorption of toxicants in toxicology, The basic science of poisons. C.D. KLAASSEN, M.O. AMDEER & J. DULL (Eds) Mc Millan Pub. Co. 33-63.
- LAISNEY, V.; VAN CONG, N.; GROSS, M.S.; FREZAL, J. (1984). Human genes for glutathione S-transferases. *Hum. Genet.* 68:221-227.
- LAISNEY, V.; VAN CONG, N.; GROSS, M.S.; PARISI, I.; FOIBERT, C.; WEIL, D. & FREZAL, J. (1983). Localization du group synténique LDH A-GST3-EST4 sur le chromosome 11 chez l'homme. *Ann. Genet.* 26:69-74.
- LIU, Y.H.; TAYLOR, J.; LINKO, P.; LUCIER, G.W. & THOMPSON, C.L. (1991). Glutathione S-transferase Mu in human lymphocyte and liver: role in modulating formation of carcinogen-derived DNA adducts. *Carcinogenesis* 12:2269-2275.
- MANNERVIK, B. (1985a). The isozymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol.* 57:357-417.
- MANNERVIK, B.; ALIN, P.; GUTHENBERG, C.; JENSSON, H.; TAHIR, M.K.; WARHOLM, M. & JORNVALL, H. (1985b). Identification of three classes of cytosolic GST common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82:7202-7206.

- MANNERVIK, B. & DANIELSON, H. (1988). Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23:283-337.
- MARCUS, C.J.; HABIG, W.H. & JAKOBY, W.B. (1978). Glutathione transferase from human erythrocytes. Non identity with the enzymes from liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 188:287-293.
- MEYER, D.J.; COLES, B.; PEMBLE, S.E.; GILMORE, K.S.; FRASER, G.M. & KETTERER, B. (1991). Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem. J.* 274:409-414.
- MONGENSTERN, R.; GUTHENBERG, C. & DE PIERRE, J.W. (1982). Microsomal glutathione S-transferase. Purification, initial characterization and demonstration that it is not identical to the cytosolic glutathione S-transferases A, B and C. *Eur. J. Biochem.* 128:243-248.
- NEBERT, D.W. (1991). Role of genetic and drug metabolism in human cancer risk. *Mut. Res.* 247:267-281.
- NORUSIS, M.A. (1986). SPSS/PC+. Ed. SPSS Inc. Chicago, Michigan.
- PABST, M.J.; HABIG, W.H. & JAKOBY, W.B. (1973). Mercapturic acid formation: the several glutathione transferases on rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52:1123-1128.
- POPPEL, G.V.; VOGEL, N.; BALDEREN, P.J. & KOK, F.J. (1992). Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme Mu. *Carcinogenesis* 13:303-305.
- RHOADS, D.M.; ZARLIERGO, R.P. & TU, C-P. (1987). The basic glutathione S-transferase from human livers are products of separate genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145:474-481.
- SCOTT, E.M. & WRIGHT, R.C. (1980). Variability of glutathione S-transferase of human erythrocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 32:115-117.
- SEIDEGARD, J.; DE PIERRE, J.W.; BIRBERG, W.; PLOTTI, A. & PERO, R.W. (1984). Characterization of soluble glutathione transferase activity in resting mononuclear leukocytes from human blood. *Biochem. Pharmac.* 19:3053-3058.
- SEIDEGARD, J.; GUTHENBERG, C.; PERO, R.W. & MANNERVIK, B. (1987). The trans-stilbene oxide-active glutathione

transferase in human mononuclear leucocyte is identical with the hepatic glutathione transferase Mu. *Biochem.J.* 246:783-785.

- SEIDEGARD, J. & PERO, R.W. (1985). The hereditary transmission of high glutathione transferase activity towards trans-stilbene oxide in human mononuclear leukocytes. *Hum. Genet.* 69:66-68.
- SEIDEGARD, J.; PERO, R.W.; MARKOWITZ, M.M.; ROUSH, F.; MILLER, D.G.; BEATTIE, E.J. (1990). Isozymes of glutathione transferases (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer. A follow-up study. *Carcinogenesis* 11:33-36.
- SEIDEGARD, J.; PERO, R.W.; MILLER, D.G. & BEATTIE, E.J. (1986). A glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* 7:751-753.
- SEIDEGARD, J.; VORACHEK, W.R.; PERO, R.W. & PEARSON, W.R. (1988). Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7293-7297.
- SINGH, S.V.; KUROSKY, A. & AWASTHI, Y.C. (1987). Human liver GST Psi chemical characterization and secondary-structure comparison with other mammalian GST. *Biochem. J.* 243:61-67.
- SIPES, I.G. & GANDOLFI, A.J. (1986). Biotransformation of toxicants, in *Toxicology, The basic science of poisons*, C.D. KLASSEN, M.O. AMDEER & J. DULL (Eds) Mc Millan Pub. Co. 64-98.
- SHEA, T.C.; KELLEY, S.L. & HENNER, W.D. (1988). Identification of an anionic form of glutathione transferase present in many human tumors and human tumor cell lines. *Cancer Res.* 48:527-533.
- SHIVENDRA, V.S.; AHMAD, H.; KUROSKY, A. & AWASTHI, Y.C. (1988). Purification and characterization of unique glutathione S-transferases from human muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 264(1):13-22.
- SMITH, G.J.; OHL, V.S. & LITWACK, G. (1977). Ligandin, the glutathione S-transferases, and chemically induced hepatocarcinogenesis: a review. *Canc. Res.* 37:8-14.
- SOMA, Y.; SATOH, K. & SATO, K. (1986). Purification and subunit-structural and immunological characterization of five glutathione transferases in human liver, and

- the acidic form as a hepatic tumour marker. *Biochim. Biophys. Acta* 869:247-258.
- STOCKMAN, P.K.; MC LELLAN, L.I. & HAYES, J.D. (1987). Characterization of the basic glutathione S-transferase B1 and B2 subunits from human liver. *Biochem. J.* 244:55-61.
- STRANGE, R.C.; DAVIS, B.A.; FAULDER, C.G.; COTTON, W.; BAIN, A.D.; HOPKINSON, D.A. & HUME, R. (1985). The human glutathione S-transferases: developmental aspects of the GST1, GST2 and GST3 loci. *Biochem. Genet.* 23:1011-1028.
- STRANGE, R.C.; FAULDER, C.G.; DAVIS, B.A.; HUME, R.; BROWN, J.A.H.; COTTON, W. & HOPKINSON, D.A. (1984). The human glutathione S-transferases: studies on the tissue distribution and genetic variation of the GST1, GST2 and GST3 isozymes. *Ann. Hum. Genet.* 48:11-20.
- STRANGE, R.C.; JOHNSON, P.H.; LAWTON, A.; MOULT, J.A.; TECTOR, M.J.; TYMINSK, R.J. & COTTON, W. (1982). Studies on the variability of glutathione S-transferase from human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta* 120:251-260.
- STRANGE, R.C.; MATHAROO, B.; FAULDER, G.C. (1991). The human glutathione S-transferases: A case-control study of the incidence of the GST1 0 phenotype in patients with adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 12:25-28.
- SUZUKI, T.; COGGAN, M.; SHAW, D.C. & BOARD, P.G. (1987). Electrophoretic and immunological analysis of human glutathione S-transferase isoenzymes. *Ann. Hum. Genet.* 51:95-106.
- SUZUKI, T.; SHAW, D.C. & BOARD, P.G. (1991). Purification and characterization of acidic glutathione S-transferase 6 from human brain. *Biochem. J.* 274:405-408.
- TAN, K.H.; MEYER, D.J.; GILLES, N. & KETTERER, B. (1988). Detoxification of DNA hydroperoxide by glutathione transferases and the purification and characterization of glutathione transferases of the rat liver nucleus. *Biochem. J.* 254:841-845.
- TEW, K.D.; CLAPPER, M.L.; GREENBERG, R.E.; WEESE, J.L.; HOFFMAN, S.J. AND SMITH, T.M. (1987). Glutathione S-transferases in human prostate. *Biochem. Biophys. Acta* 926:8-15.
- TSUCHIDA, S.; MAKI, T. & SATO, K. (1990). Purification and characterization of glutathione transferases with an activity toward nitroglycerin from human aorta and

- heart. Multiplicity of human class Mu forms. *J. Biol. Chem.* 265(13):7150-7157.
- TSUCHIDA,S.; SEKINE,Y.; SHINEHA,R.; NISHIHIRA,T. & SATO,K. (1989). Elevation of the placental GST form (GST Pi) in tumor tissue and the levels in sera os patients with cancer. *Cancer Res.*49:5225-5229.
- TU,C-P,D. & QUIAN,B. (1986). Human liver glutathione S-transferases: complete primary structures of an Ha subunit cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141:229-237.
- VESSEL,E.S. (1991). Genetic and environmental factors causing variation in drug response. *Mut.Res.*247:241-257.
- VORACHEK,W.R.; PEARSON,W.R. & RULE,G.S. (1991). Cloning, expression, and characterization of a class-Mu glutathione transferase from human muscle, the product of the GST4 locus. *Proc.Natl.Acad.Sci.*88:4443-4447.
- VOS,R.M.E. & BLADEREN,V.P.J. (1990). Glutathione S-transferase in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interactions*, 75:241-265.
- WARHOLM,M.; GUTHENBERG,C. & MANNERVIK,B. (1983). Molecular and catalytic properties of glutathione transferase Mu from human liver: an enzyme efficiently conjugating epoxides. *Biochemistry* 22:3610-3617.
- WARHOLM,M.; GUTHENBERG,C.; MANNERVIK,B. & BAHR,C.V. (1981). Purification of a new GST (transferase Mu) from human liver having high activity with benzo(alfa)pyrene-4,5-oxide. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*98:512-519.
- WAXMAN,D.J. (1990). Glutathione S-transferase: Role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy- A review. *Cancer Res.*50:6449-6454.
- WIENCKE,J.K.; KELSEY,K.T.; LAMELA,R.A. & TOSCANO,W.A. (1990). Human glutathione S-transferase deficiency as a marker of susceptibility to epoxide-induced cytogenetic damage. *Canc. Res.* 50:1585-1590.
- ZHONG,S.; HOWIE,A.F.; KETTERER,B.; TAYLOR,J.; HAYES,J.D.; BECKETT,G.J.; WATHEN,C.G.; WOLF,C.R. & SPURR,N.K. (1991). Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to asses association with lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 12:1533-1537.