

# Glutationo e toxicidade de etanol

Ana Ponces Freire<sup>a</sup>  
Carlos Manuel C. Santos<sup>b</sup>



Ana Maria Jara Ponces  
da Costa Freire

*Nasceu em Lisboa em 1948. Licenciou-se em Química pela FCUL em 1971, com a classificação de 16 valores. Doutorou-se em Bioquímica em 1981, com distinção e louvor. Desempenha desde 1972, funções docentes no Departamento de Química da FCUL. Integra o Centro de Estudos de Bioquímica e Fisiologia Animal (INIC), desenvolvendo projectos na área da Enzimologia. Neste âmbito tem artigos publicados em revistas nacionais e internacionais. É coautora dos livros «Introdução à Bioquímica» ed. Fundação Gulbenkian, 1974; «Bioquímica Humana» ed. Fundação Gulbenkian, 1987; «Control of Metabolic Processes» ed. Plenum Press, N.Y., 1990.*

## Glutationo – Aspectos gerais do seu metabolismo e função

O glutationo (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cisteinil-glicina) é o maior tiol não proteico encontrado em células animais. A molécula é usualmente representada por GSH enquanto o persulfureto resultante da oxidação do grupo tiol é designado por GSSG. Os principais processos em que o glutationo está envolvido nos organismos vivos envolvem reacções de oxidação-redução, podendo estas ser de substituição, de adição e enzimáticas.

Do ponto de vista químico, os tióis são ainda muito reactivos face a radicais livres, cedendo átomos de hidrogénio aos radicais centrados em átomos de carbono, dióxigénio e azoto [1,2].

As diversas funções do glutationo parecem ser relevantes em muitos campos como a enzimologia, farmacologia, bioquímica das radiações, «terapia» do cancro, toxicologia, endocrinologia, microbiologia. Tem sido sugerido o seu papel como fonte de aminoácidos de grupos sulfidrilo, nomeadamente de cisteína, para os tecidos extra-hepáticos, durante longos períodos de privação deste aminoácido [3]; na redução de ligações persulfureto das proteínas e outras moléculas, na síntese de precursores de desoxirribonucleótidos do DNA, na protecção das células contra o efeito de radicais livres e de outros intermediários reactivos do dióxigénio que são formados no metabolismo [4]. Admite-se ainda que pode actuar em processos de desintoxicação celular na inactivação de algumas drogas e no processo metabólico de certos compostos endógenos, tais como estrogéneos e prostaglandinas [5]. Alguns autores sugerem ainda a sua participação na regulação de certos processos metabólicos [6]. É também cofactor de muitas enzimas, principalmente do glutationo peroxidase e do glutationo redutase [7].

O glutationo peroxidase catalisa a oxidação da molécula de GSH por acção de hidroperóxidos [7]. Dois tipos de actividade do glutationo peroxidase foram observados no fígado de rato: uma envolvendo selénio e outra não envolvendo selénio. A primeira catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos e de hidroperóxido de hidrogénio enquanto a forma não dependente do selénio catalisa apenas a reacção que envolve hidroperóxidos orgânicos [8].

O glutationo redutase parece ser um dos enzimas que mantém o glutationo na sua forma reduzida (GSH), possível-

<sup>a</sup> Departamento de Química, FCUL. Centro de Estudos de Bioquímica e Fisiologia Animal, Instituto Rocha Cabral, Calçada Bento Rocha Cabral, 14, 1200 Lisboa.

<sup>b</sup> Bolseiro do INIC.

mente pelo controlo da razão  $[NADP^+]/[NADPH]$  nos tecidos [7].

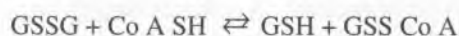
Assim, o glutatióno peroxidase e glutatióno redutase serão dois enzimas importantes na determinação do estado redox do glutatióno [7].

O conhecimento do metabolismo do glutatióno tem surgido de estudos de (a) reacções do ciclo  $\gamma$ -glutamilo, o qual inclui a síntese e degradação do glutatióno e envolve o transporte de glutatióno para o exterior das células e de aminoácidos  $\gamma$ -glutamilo para o interior; (b) reacções de conversão reversível de GSH em GSSG; (c) transformações metabólicas de conjugados de GSH S-substituídos [5].

No interior da célula o glutatióno reage com uma variedade de compostos com carácter electrófilo num processo catalisado pelo glutatióno S-transferase, formando-se «GSH S-conjugados».

A oxidação do glutatióno que é sintetizado na sua forma reduzida poderá estar relacionada com a concentração de hidroperóxidos, persulfuretos, radicais livres e/ou com a actividade do glutatióno peroxidase.

Em resumo, a razão GSH/GSSG poderá ser relacionada com as actividades de determinados enzimas, com a concentração de tióis e de um modo geral com o estado redox dos tecidos. Outros factores poderão ainda ser referidos. Assim, a razão GSH/GSSG parece ser importante no controlo da concentração de coenzima A livre nos tecidos já que este pode reagir com a forma oxidada de glutatióno de acordo com o esquema:



Esta reacção apresenta uma constante de equilíbrio aparente próxima da unidade, o que significa que qualquer aumento de concentração de coenzima A livre poderá ser relacionada com a razão GSH/GSSG implicando um aumento do metabolismo dos ácidos gordos [7].

É no tecido hepático que se têm encontrado os valores de concentração mais elevados de glutatióno. O seu transporte entre tecidos é feito pelo plasma onde a razão GSH/GSSG é significativamente inferior. No rim ocorre cerca de 50 a 70% do «turnover», devido à alta actividade de  $\gamma$ -glutamyltranspeptidases [6]. As células do fígado, com baixa actividade nestes enzimas, transportam glutatióno para o plasma onde os níveis de GSH permanecem baixos visto que este é utilizado tanto em reacções catalisadas por transpeptidases celulares, principalmente do rim, como em processos de desintoxicação celular [9].

Se por um lado estas considerações pretendem demonstrar a importância do conhecimento dos níveis e do estado de oxidação-redução do glutatióno no plasma, é por outro lado igualmente importante esse estudo no fígado já que é neste órgão que efeitos tóxicos como p.e. do etanol incidem fundamentalmente.

### Glutatióno e metabolismo do etanol

Os efeitos da ingestão de alcoóis (em particular, do etanol) sobre o metabolismo do glutatióno podem ajudar na elucidação do(s) mecanismo(s) pelos quais esses compostos ou os seus produtos de degradação actuam na célula hepática [10]. Segundo Videla *et al* [11], a ingestão aguda de etanol poderá induzir depleção de GSH hepático, dependendo esse efeito

do estado nutricional e sendo reversível com o tempo. Nesta situação, qualquer composto com grupos tiol p.e. metionina e cisteína (ambas envolvidas na síntese de GSH) poderão ter efeito protector em relação à sua depleção [12].

Observa-se ainda que a administração de etanol em dose aguda leva a decréscimo dos níveis de GSH hepático [13-17]. Esta redução tem vindo a ser explicada por dois mecanismos possíveis: (a) a ligação de acetaldeído, produzido no metabolismo do etanol, a grupos tiol, em particular a GSH e cisteína (precursor do GSH) formando-se um derivado do ácido 2-metil-tiazolidina-4-carboxílico (2-MCTA); (b) a oxidação de GSH por lipoperóxidos produzidos devido à degradação do etanol.

### Formação de aductos com acetaldeído

Tem sido detectada a formação de aductos, *in vitro*, entre GSH e acetaldeído [18] e GSH e formaldeído [19].

Experiências com hepatócitos incubados em presença de etanol e pirazolo, este último, inibidor do alcool desidrogenase (enzima que catalisa a oxidação de etanol a acetaldeído) sugerem que não será o etanol o responsável directo pela diminuição observada *in vivo* nos níveis de GSH. Estes resultados são aliás confirmados por experiências em que se substitui o etanol por acetaldeído, em concentrações variáveis havendo neste caso redução até cerca de 43% nos níveis de GSH [18].

Quando GSH e acetaldeído são adicionados ao meio de incubação, em concentrações equimolares observa-se ainda uma redução dos níveis de GSH em relação aos controlos. No entanto, a adição de hidrazina aos sistema anula esse efeito. Estes dados levam a admitir que a ligação de GSH a acetaldeído terá carácter reversível [18].

Os resultados anteriores indicam que o responsável pelo abaixamento de GSH, *in vivo* poderá ser o acetaldeído. Se doses agudas de etanol são correlacionáveis com redução hepática dos níveis de GSH, este decréscimo poderá ser consequência de depleção de aductos GSH-acetaldeído e/ou decréscimo de síntese de GSH. Isto poderá explicar, pelo menos em parte, a hepatotoxicidade induzida pelo etanol.

No entanto, a importância das experiências sobre depleção hepática do glutatióno que têm vindo a ser feitas, parece-nos controversa. Assim, por exemplo, em contradição aparente com o que se acabou de referir, Speisky *et al* [13-14] observaram que a velocidade de condensação não enzimática entre GSH e acetaldeído é apenas cerca de 6% da velocidade de desaparecimento de GSH hepático, após administração aguda de etanol. Os mesmos autores [16] observaram ainda que a administração aguda de etanol a micromamíferos previamente tratado com carbamida de cálcio ou disulfiram (inibidores do aldeído desidrogenase), induzirá um aumento de cerca de 10% nos níveis de acetaldeído no sangue, não se observando qualquer efeito na concentração de GSH hepático. Resultados idênticos são obtidos utilizando 4-metilpirazolo (inibidor do álcool desidrogenase) o que leva a pôr como hipótese que a depleção hepática de glutatióno possa ser independente do metabolismo do etanol.

### Redução de lipoperóxidos pelo glutatióno

A peroxidação lipídica tem sido apresentada como outro possível mecanismo para a lesão do fígado induzido pelo etanol. No entanto, o aumento da formação de lipoperóxidos

após a administração aguda de etanol é mais um assunto de controvérsia. Enquanto alguns investigadores não observam qualquer variação nos níveis de lipoperoxidação [14], outros pelo contrário associam a redução dos níveis de GSH hepático com o aumento dos níveis de lipoperoxidação, em condições de depleção de GSH [11]. Estas observações poderiam ser explicadas por uma redução acentuada nos níveis de GSH retirar à célula capacidade de defesa contra a lipoperoxidação.

Speisky *et al* [15] observaram que a administração aguda de etanol, (5 g etanol/kg peso) 6 horas antes do sacrifício dos animais, apesar de resultar num decréscimo dos níveis de GSH em cerca de 35%, não altera os níveis de lipoperoxidação, medidos pelo método dos dienos conjugados; a administração de um composto tóxico como o dietilmaleato (0,9 ml/kg) 90 min. antes do sacrifício dos animais provoca uma redução em cerca de 85% nos níveis de GSH hepático, sem se observar qualquer alteração nos níveis de lipoperoxidação.

Por outro lado, Muller e Sies [20] observaram aumento de formação de etano e n-pentano, (indicadores mais sensíveis da peroxidação lipídica) em fígado de rato após adição aguda de etanol. Este efeito não foi observado quando inibidores do álcool desidrogenase estavam presentes (4-metil e 4-propilpirazolo). A produção daqueles hidrocarbonetos foi igualmente observada após adição ao meio de acetaldeído, o mesmo não acontecendo com a adição de acetato. Estas observações parecem apontar o acetaldeído como o principal responsável da peroxidação lipídica durante o metabolismo agudo do etanol.

#### Glutationo em humanos

Alguns resultados da literatura indicam que o glutatióno plasmático em humanos com cirrose hepática é menor do que em doentes sem doença hepática [21-22].

Em relação ao glutatióno no fígado também este estará reduzido nos doentes com cirrose [22]. No entanto, os níveis de cisteína plasmática não são estatisticamente diferentes nas populações estudadas [22].

Observa-se ainda que a actividade do  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, enzima responsável pela degradação do GSH apresenta frequentemente valores elevados nos doentes com cirrose [22].

Em resumo, os baixos valores de glutatióno plasmático e hepático em doentes com doença hepática alcoólica, mesmo em situação de bom estado nutricional, sugerem um decréscimo de fluxo de GSH hepático, que permanece sem explicação.

#### Perspectivas

O conceito de que substâncias quimicamente inertes possam ser metabolizadas transformando-se em espécies reactivas responsáveis por alterações fisiológicas, não é novo. Este mecanismo tem vindo a ser utilizado para explicar a hepatotoxicidade de numerosos solventes e drogas. Recentemente esta hipótese é sugerida no estudo da doença hepática alcoólica. Assim, no hepatócito, a oxidação etanol leva à formação de baixas (mas estequiométricas) quantidade de acetaldeído. Este é maioritariamente oxidado a acetato, podendo no entanto numa pequena fracção ligar-se a macro-

moléculas na célula hepática p.e. glutatióno, provocando lesões irreversíveis. Para que esta hipótese seja confirmada é necessário um conhecimento mais preciso dos aductos de acetaldeído, em particular a sua estrutura e localização subcelular e uma correlação rigorosa entre a sua formação e a alteração de funções do glutatióno.

#### Referências

- [1] Anderson, M.E., Meister, A., (1980). Dynamic State of glutathione in blood plasma, *J. Biol. Chem.*, 255, 9530-9533.
- [2] Kosower, E.M., (1976). Chemical properties of glutathione. In «Glutathione: metabolism and function», I. Marias e W.B. Jacoby, Eds., pag. 1-15, Raven Press, N.Y.
- [3] Callans, J.D., Wacker, L.S., Mitchell, M.C. (1987). Effects of ethanol feeding and withdrawal on plasma glutathione elimination in the Rat. *Hepatology*, 7(3), 496-501.
- [4] Anderson, M.E. (1986). Tissue Glutathione. In «CRC Handbook of methods for oxygen radical research», R.A. Greenwald ed., 317-323, CRC Press, Boca Raton.
- [5] Meister, A., (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220, 472-477.
- [6] Lash, L.H., Jones, D.P., (1985). Distribution of oxidized and reduced forms of glutathione and cysteine in rat plasma. *Arch. Biochem. Biophys.*, 240(2), 583-592.
- [7] 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, 109-115.
- [8] Burk, F.F., Nishiki, K., Lawrence, R.A., Chance, B., (1978) Peroxide removal by selenium-dependent and selenium independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free perfused rat liver. *The Biol. Chem.*, 253, 43-46.
- [9] Griffith, O.W., (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-Vinylpyridine. *Anal. Biochem.*, 106, 207-212.
- [10] Palma, P.N., Neves, L.M., Ponces Freire, A., (1990). Toxicidade do etanol - Papel do acetaldeído como mediador nos efeitos biológicos. *Bol. Soc. Port. Quím.*, 40, 29-31.
- [11] Videla, L.A., Fernandez, V., Ugarte, G., Valenzuela, A., (1980). Effect of acute ethanol intoxication on the content of reduced glutathione of the liver in relation to its lipoperoxidative capacity in the rat. *FEBS Letters*, 111(1), 6-10.
- [12] MacDonald, C.M., Dow, J., Moore, M.R., (1977). A possible protective role for sulphhydryl compounds in acute alcoholic liver injury. *Biochem. Pharmacol.*, 26, 1529-1531.
- [13] Speisky, H., MacDonald, G., Giles, G., Orrego, H., Israel, Y., (1985). Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration (Turnover Studies) *Biochem. J.*, 225, 565-572.
- [14] Speisky, H., Bunout, D., Orrego, H., Giles, H.G., Gunasekara, A., Israel, Y., (1985). Lack of changes in diene conjugate levels following ethanol induce glutathione depletion or hepatic necrosis. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharm.* 48(1), 77-90.
- [15] Paredes, S.R., Kozicla, P.A., Fukuda, H., Rossetti, M.V., Battle, A.M., (1987). S. Adenosyl-L-methionine: Its effects on aminolevulinic dehydratase and glutathione in acute ethanol intoxication. *Alcohol*, 4, 81-85.
- [16] Speisky, H., Kera, Y., Penttilä, K.E., Israel, Y., Lindros, K.O., (1988). Depletion of hepatic glutathione by ethanol occurs independently of ethanol metabolism. *Alcoholism: Clin. & Experim. Res.*, 12, 224-228.
- [17] Strubelt, O., Younes, M., Pentz, R. (1987). Enhancement by glutathione depletion of ethanol-induced acute hepatotoxicity in vitro and in vivo. *Toxicology*, 45, 213-223.
- [18] Vina, J., Estrela, J.M., Guerri, C., Romero, F.J., (1980). Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. *Biochem. J.*, 188, 549-552.
- [19] Naylor, S., Mason, R.P., Sanders, J.K.M., Williams, D.H., Moneti, G. (1988). Formaldehyde adducts of glutathione. *Biochem. J.*, 249, 573-579.
- [20] Muller, A. e Sies, H., (1982). Role of alcohol dehydrogenase activity and of acetaldehyde in ethanol-induced ethane and pentane production by isolated perfused rat liver. *Biochem. J.*, 206, 153-156.
- [21] Burgunder, J.M., Lauterburg, B.H., (1986). Decreased production of glutathione (GSH) in alcoholic cirrhosis, *J. Hepatol., Suppl.* 1(3), GS-II 5.
- [22] Lauterburg, B.H. Velez, M.E., (1988). Glutathione deficiency in alcoholics: risk factor for paracetamol hepatotoxicity, *Gut*, 29, 1153-1157.



