

GLUTATIONA E ENZIMAS RELACIONADAS: PAPEL BIOLÓGICO E IMPORTÂNCIA EM PROCESSOS PATOLÓGICOS

Paula C. Huber e Wanda P. Almeida*

Curso de Farmácia e Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas - SP, Brasil

Ângelo de Fátima

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte - MG, Brasil

Recebido em 22/2/07; aceito em 6/9/07; publicado na web em 9/4/08

GLUTATHIONE AND RELATED ENZYMES: BIOLOGICAL ROLES AND IMPORTANCE IN PATHOLOGICAL PROCESSES.

Glutathione (GSH) and related enzymes are pivotal for the normal functioning of several important biological processes. In this review we discuss the biosynthesis and the catalytic cycles of glutathione as well as the major GSH-related enzymes. We also present how glutathione and enzymes are involved in cancer and the chromatographic and non-chromatographic methods used to analyze glutathione and/or its derivatives.

Keywords: glutathione; oxidative stress; cancer.

INTRODUÇÃO

A glutationa (GSH, **1**, Figura 1), possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo.¹ Este tripeptídeo é encontrado intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos. Nota-se a ligação γ -peptídica pouco usual, a presença da porção γ -glutamil e do grupo α -carboxilato livre prevenindo a hidrólise da GSH pelas peptidases celulares que degradam outros peptídeos pequenos. A GSH é o mais abundante tiol celular de baixa massa molecular; a sua concentração é ~ 2 mM e mais de 10 mM em eritrócitos humanos e hepatócitos, respectivamente.¹ Face à potencialidade de inibidores das enzimas relacionadas à GSH como alvo para o desenvolvimento de substâncias candidatas a fármacos, nesta revisão serão apresentados aspectos importantes do papel fisiológico da glutationa (GSH) e sua implicação em patologias. Considerando esta abordagem, ênfase especial será dada às glutationas transferase e redutase. Uma vez que a investigação do envolvimento da GSH em processos fisiopatológicos requer sua detecção e quantificação em diferentes matrizes, também serão abordados os principais métodos de análise deste tripeptídeo e derivados.

Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidrila (SH), altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações

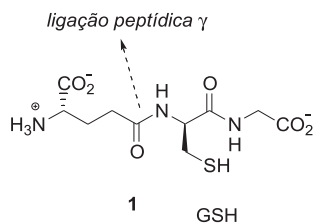


Figura 1. Glutationa (1): γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina

com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da glutationa um bom redutor. A combinação de sua abundância nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo sulfidrila suporta a proposta de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra espécies reativas de oxigênio e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive.

Biossíntese

A biossíntese da GSH ocorre no meio intracelular (exceto em células epiteliais), pela ação consecutiva de duas enzimas. Na primeira reação, é formada uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutâmico (**2**, Figura 2) e cisteína (**3**), catalisada pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase, levando à γ -L-glutamil-L-cisteína (**4**). Este dipeptídeo é então ligado à glicina pela ação da glutationa sintetase. Estas etapas requerem ATP e Mg^{+2} . A γ -glutamilcisteína sintetase sofre regulação pela GSH através de um *feedback* negativo, o que previne a produção excessiva desta ou o acúmulo do intermediário γ -glutamilcisteína. Caso a conversão da γ -glutamilcisteína em GSH seja insuficiente, uma reação alternativa predomina: a conversão à 5-oxoprolina (**5**), catalisada pela γ -glutamilciclotransferase. A produção excessiva de 5-oxoprolina ocorre em casos de deficiência hereditária da glutationa sintetase e é caracterizada por 5-oxoprolinúria, acidose metabólica crônica e distúrbios neurológicos. A biossíntese da GSH pode ser inibida pela butionina sulfoximina (**6**, BSO), um inibidor com estrutura similar a um intermediário ativado na reação catalisada pela γ -glutamilcisteína sintetase. Em sistemas experimentais, na supressão das concentrações intracelulares de GSH pela BSO, observa-se o aumento da sensibilidade das células à radiação ionizante e a certas drogas citostáticas. Essa sensibilização está sendo explorada para uso clínico na terapia contra câncer. A limitação desta técnica é que tanto células normais quanto as tumorais podem ser afetadas e os efeitos tóxicos nos tecidos normais podem ser mais importantes que o fato de tornar as células tumorais mais susceptíveis ao tratamento. Uma forma de controlar

*e-mail: wanda@iqm.unicamp.br

esse problema é fazer uso de irradiação localizada ou aplicação tópica de drogas citostáticas a fim de limitar a toxicidade sobre os tecidos normais.

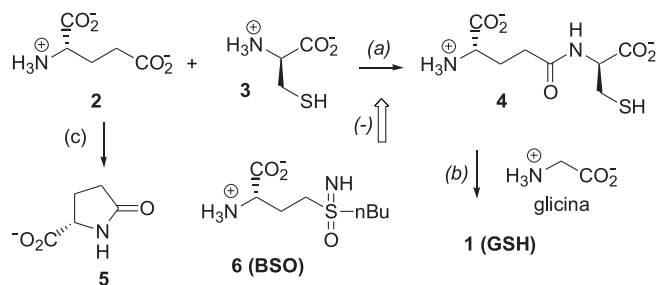


Figura 2. Biossíntese da glutaciona e enzimas envolvidas: (a) γ -glutamilcisteína sintetase e (b) glutaciona sintetase; (c) γ -glutamilciclotransferase, e butionina sulfoximina (BSO), inibidor da biossíntese da glutaciona

Ciclo catalítico da glutaciona

Para que a atividade protetora da glutaciona expressa pela redução de espécies oxidantes, e conseqüente oxidação da GSH à glutaciona dissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através do ciclo catalítico, representado na Figura 3. Nele podemos identificar a atividade de três grupos de enzimas: a glutaciona oxidase (GO), a glutaciona peroxidase (GSH-Px) e a glutaciona redutase (GR). As duas primeiras enzimas, GO e GSH-Px, catalisam a oxidação de GSH à GSSG e a última, GR, é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH.

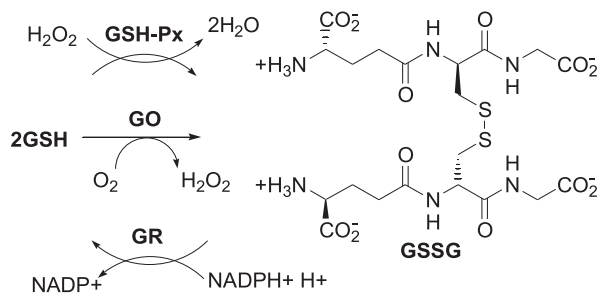


Figura 3. Representação esquemática do ciclo catalítico da glutaciona

Glutaciona oxidase

Dissulfetos são formados a partir de tióis de baixo peso molecular, polipeptídeos e proteínas. A glutaciona é convertida em glutaciona dissulfeto (GSSG) pela catálise da glutaciona oxidase, uma enzima FAD-dependente, que oxida também outros aminotióis, como por exemplo, a L-cisteína. A denominação glutaciona oxidada para GSSG não é específica, pois dissulfetos mistos de glutaciona (GSHR), ácidos sulfínico (GSO_2H) e sulfônico (GSO_3H) e *S*-sulfoglutaciona (GSSO_3H) e a própria glutaciona dissulfeto são formas oxidadas de GSH.

Glutaciona peroxidase

Um importante sistema enzimático de defesa contra radicais livres envolve as glutacionas peroxidases (GSH-Px) encontradas em muitos tecidos de origem animal. Estas enzimas são bastante particulares no que se refere à sua constituição, pois incorporam um resíduo de selenocisteína no seu sítio ativo. Selenocisteína é codificada pelo

códon UGA, que é usualmente um terminador, e é incorporada por um RNA transportador específico.² O envolvimento de algumas GSH-Px no controle dos níveis de hidropéroxidos fosfolipídicos, formados a partir do ataque de espécies radiculares às membranas é bem estudado,³ assim como os parâmetros cinéticos da GSH-Px e o mecanismo catalítico envolvendo glutaciona e peróxido de hidrogênio.⁴

GLUTACIONA REDUTASE

A enzima responsável pela redução da GSSG à GSH é a glutaciona redutase. Os sítios ligantes para GSSG estão situados na interface das duas subunidades que constituem a estrutura quaternária da glutaciona redutase, sendo que cada uma tem um domínio distinto com um sítio ligante para o NADPH. A Figura 4 é uma representação esquemática do ciclo redutivo: o grupo sulfidríla de um dos resíduos de cisteína, presentes no sítio ativo da GR (I) ataca a ligação S-S, liberando uma molécula de GSH e um dissulfeto misto GSSGR (II). Um ataque intramolecular do grupo sulfidríla do segundo resíduo de cisteína sobre II libera a segunda molécula de GSH, formando o dissulfeto cíclico (III). A conversão do dissulfeto cíclico ao GR (II) é realizada à custa da conversão de NADPH para NADP+ e, então, inicia-se o ciclo redutivo mediado pela glutaciona redutase.

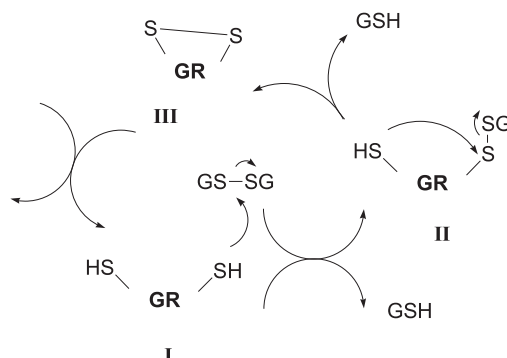


Figura 4. Representação esquemática do ciclo de redução da GSSG pela GR

Com relação à química medicinal, a glutaciona redutase apresenta-se como um alvo para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos. Durante os estágios de vida eritrocitária do *Plasmodium falciparum*, o parasito é exposto ao estresse oxidativo produzido por macrófagos ativados do hospedeiro e também pelo HEME e outros produtos de degradação da hemoglobina. A regulação do estresse oxidativo baseia-se na atividade de sistemas contra espécies oxigenadas reativas, envolvendo GSH e enzimas relacionadas, além do sistema tioredoxina, envolvendo tioredoxina, tioredoxina redutase e peroxidases dependentes da primeira.⁵ Assim, provocar o estresse oxidativo, por interferência nas vias responsáveis pela manutenção dos níveis de GSH, ou tioredoxina se vislumbra como uma estratégia para o desenvolvimento de fármacos. A tioredoxina redutase⁶ e a glutaciona redutase apresentam-se como alvos importantes neste campo de estudo.

Na busca da seletividade, semelhanças e diferenças entre a glutaciona redutase humana (GRh) e do parasito (GRPf) têm que ser consideradas. Embora a seqüência de aminoácidos seja compartilhada pelas duas enzimas em cerca de 40%,⁷ existem diferenças pronunciadas entre a GRh e a GRPf, entre a grande cavidade existente na interface do dímero das duas enzimas. Esta cavidade contém sítios de ligação para diferentes classes de inibidores e é um alvo para o desenvolvimento de fármacos seletivos. Na GRPf, a cavidade é formada por uma seqüência de 21 aminoácidos, enquanto a humana é por 24. As cargas da cavidade também são diferen-

tes: neutra na primeira e negativa na segunda. Analisando a Figura 5, é possível observar as superfícies moleculares das cavidades: à esquerda, GRP_f vista frontal (a) e superior (b); à direita, GR_h, vista frontal (c) e superior (d). O túnel assinalado nesta figura conecta a cavidade aos dois sítios ligantes da GSSG.

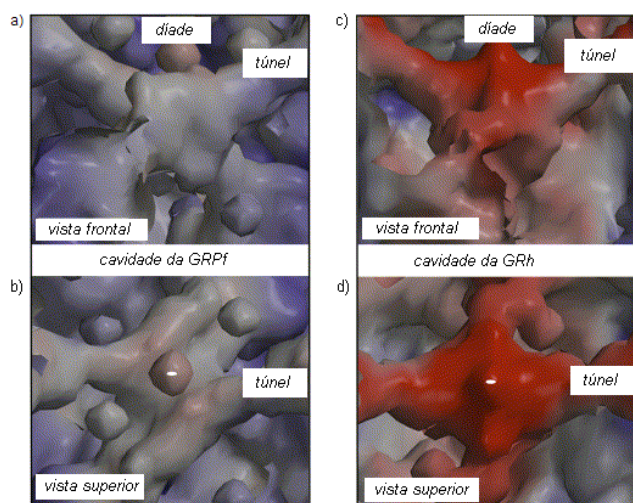
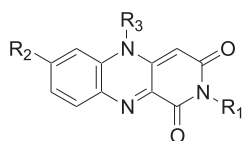


Figura 5. Superfícies moleculares da cavidade das duas enzimas. À esquerda, GRP_f: (a) vista de frente e de cima(b); à direita, GR_h: vista de frente (c) e de cima (d). Reproduzida com adaptações da ref. 7, com permissão de Elsevier Ltda.

Na GR_h, há dois resíduos de fenilalanina (Phe78 e Phe78') que se orientam paralelamente, e são os responsáveis pela estabilização por interações do tipo “ π -stacking”, do complexo formado entre enzima e menadiona, um conhecido ligante desta enzima.⁸ Estes resíduos não estão presentes na cavidade da GRP_f, sugerindo que há modos de ligação diferenciados para potenciais inibidores da GR neste parasito.

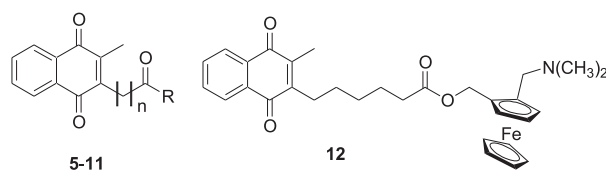
Várias classes de inibidores estão descritas na literatura, baseados na modificação estrutural de protótipos derivados de xantenos,⁹ flavinas,¹⁰ isoaloxazinas,¹¹ azul de metileno,¹² complexos de ferroditiolato,¹³ S-nitroglutamina,¹⁴ benzilaminas,¹⁵ isocianatos,¹⁶ ácidos mercaptúricos,¹⁷ nitrosouréias¹⁸ e naftoquinonas.¹⁹ Dentre estes, os resultados obtidos da inibição de GRP_f por isoaloxazinas (Figura 6) são promissores. Embora a isoaloxazina **7** tenha a maior constante de inibição, a seletividade frente à GR_h, não é elevada ($K_i = 2,5 \mu\text{M}$), ao contrário das isoaloxazinas **8**, **9** e **10**, com constantes de inibição para a GR_h de 0,6; 0,4 e 1,4 μM , respectivamente. Este estudo demonstrou que outras isoaloxazinas, contendo substituintes heteroaromáticos ligados ao nitrogênio 10 (R_3) são menos ativas, com valores de K_i significativamente elevados.²⁰

Tendo como base o esqueleto naftoquinônico, Biot e colabora-

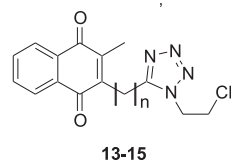


- 7:** $R_1 = R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{pentafluorfenila}$ ($K_i = 1,9 \mu\text{M}$)
8: $R_1 = R_2 = \text{H}$; $R_3 = 4\text{-clorofenila}$ ($K_i = 5,4 \mu\text{M}$)
9: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{F}$; $R_3 = 4\text{-clorofenila}$ ($K_i = 5,9 \mu\text{M}$)
10: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{azido}$; $R_3 = 4\text{-clorofenila}$ ($K_i = 6,2 \mu\text{M}$)

Figura 6. Isoaloxazinas e suas respectivas constantes de afinidade para glutatona redutase de *Plasmodium falciparum*



- 5:** $n = 3$, $R = \text{OH}$ ($\text{IC}_{50} = 2,2 \mu\text{M}$); **8:** $n = 3$, $R = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ($\text{IC}_{50} = 1,8 \mu\text{M}$);
6: $n = 4$, $R = \text{OH}$ ($\text{IC}_{50} = 4,0 \mu\text{M}$); **9:** $n = 4$, $R = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ($\text{IC}_{50} = 1,5 \mu\text{M}$)
7: $n = 5$, $R = \text{OH}$ ($\text{IC}_{50} = 3,5 \mu\text{M}$); **10:** $n = 5$, $R = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ($\text{IC}_{50} = 1,0 \mu\text{M}$)
11: $n = 5$; $R = \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ($\text{IC}_{50} = 12,6 \mu\text{M}$);



- 13:** $n = 3$ ($\text{IC}_{50} = 0,9 \mu\text{M}$); **14:** $n = 4$ ($\text{IC}_{50} = 1,4 \mu\text{M}$); **15:** $n = 5$ ($\text{IC}_{50} = 1,1 \mu\text{M}$)

Figura 7. Derivados naftoquinônicos inibidores da GRP_f avaliados quanto à sua atividade antimalárica

dores²¹ avaliaram os ácidos homólogos **11-13** (Figura 7) quanto à atividade inibitória de uma linhagem de plasmódios expressando o fenótipo de resistência à cloroquina (FcB1R). Embora os valores de IC_{50} tenham sido satisfatórios, o estudo se estendeu às pró-drogas **14-18**. O grupo carboxila, embora essencial para a ligação com a GR, foi “mascarado” como éster ou amida, facilitando a sua passagem pelas membranas biológicas. A menor atividade do aminoéster **17** comparada ao respectivo ácido **10** foi atribuída à diferença de coeficiente de partição, principalmente em eritrócitos infectados. Esta desvantagem foi contornada pela introdução de um grupo metalocênico (**19**), contendo regiões muito lipofílicas. Bioisósteros tetrazólicos **19-21** foram planejados com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade, destacando-se o derivado **19**.

Mais recentemente, um grupo de inibidores derivados do ácido carbamoilpropionico foi investigado, mas apresentaram valores de IC_{50} bem mais elevados que os encontrados para os derivados naftoquinônicos.²²

Independentemente da classe estrutural dos potenciais inibidores de glutatona redutase, uma alta seletividade GRP_f/GR_h é indispensável, o que poderá ser alcançado mediante um estudo adequado das diferenças e similaridades entre as duas enzimas, além de estudos de relação estrutura-atividade quali e quantitativa dos inibidores conhecidos.

GLUTATIONA TRANSFERASES (GSTS)

As glutatona transferases (GSTs), também conhecidas historicamente como glutatona S-transferases, compreendem uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutatona (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico.²³ As GSTs geralmente se encontram no meio biológico como homo ou heterodímeros (outros complexos também podem existir), apresentando dois sítios ativos por dímero cujas atividades são independentes uma da outra.²⁴ Cada sítio ativo consiste no mínimo de duas regiões de ligação, um para a glutatona (GSH) que é muito específico para este tripeptídeo, e outro sítio de ligação com menor especificidade para os eletrófilos (Fig 1S e 2S; material suplementar).²⁴ Os substratos (eletrófilos) mais comuns das glutatona transferases incluem: haletos de alquila, epóxidos, compostos α,β -insaturados (como quinonas, iminoquinonas, aldeídos, cetonas, lactonas e ésteres), haletos de arila e nitro aromáticos.²⁵⁻²⁷

As famílias de glutaciona transferases (GSTs)

As GSTs de mamíferos podem ser divididas em três grandes famílias: GST citossólica, GST mitocondrial e GST microsossomal. As duas primeiras compreendem enzimas solúveis, enquanto que as do tipo microsossomal se encontram associadas à membrana. As GSTs microsossoma geralmente estão envolvidas no metabolismo de eicosanóides e glutaciona (GSH) e por esta razão são designadas pela sigla MAPEG (*membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*). Outras famílias de glutaciona transferases (GSTs), ausentes em mamíferos, são descritas na literatura.^{27,28}

O sistema de nomenclatura para as GSTs citossólicas e mitocondriais é bem estabelecido^{23,29} e prevê que: as glutaciona transferases são divididas de acordo com a seqüência de aminoácidos e/ou nucleotídeos, propriedades imunológicas, parâmetros de cinética enzimática e/ou estrutura terciária e quaternária; as sub-unidades devem ser agrupadas segundo a seqüência de seus genes e designadas por algarismos hindu-árabicos numa ordem crescente, em função da data de sua identificação; as sub-unidades codificadas pelo mesmo *locus* de um gene devem ser designadas pelo mesmo algarismo, sendo as variações alélicas, se observadas, indicadas por letras minúsculas do alfabeto romano em subscrito.²⁹ Para distinguir enzimas de diferentes espécies, deve-se utilizar a inicial do nome do organismo (termo em inglês) em letra minúscula e em *itálico*. Por exemplo, glutaciona transferases (GSTs) da classe Pi de humanos e ratos, devem ser indicadas como *hGSTP* e *rGSTP*, respectivamente. As enzimas da família das GST microsossomais não apresentam regras claras para sua nomenclatura.²⁹ Já as GSTs citossólicas de mamíferos são todas diméricas, contendo de 199 a 244 resíduos de aminoácidos em suas estruturas primárias. Baseada na similaridade da seqüência de aminoácidos, sete classes (designadas pelas letras do alfabeto grego) de glutaciona transferases (GSTs) citossólicas de mamíferos são descritas: Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega e Zeta.^{23,30} As GST-mitocondriais (classe das Kappa) também são proteínas diméricas e suas sub-unidades apresentam, em geral, 226 resíduos de aminoácidos.²³ A expressão de enzimas desta família em humanos parece que é uniforme e independente do tipo celular. Embora estas transferases tenham sido originalmente isoladas de mitocôndrias,³¹ recentes estudos demonstraram a presença de GST mitocondrial em peroxissomos.³² A presença de membros desta família de enzimas na mitocôndria e nos peroxissomos sugere que elas estariam envolvidas em processos de detoxificação dos subprodutos da β -oxidação de ácidos graxos.²³ No que se refere às MAPEGs, quatro são as classes (I-IV) identificadas na natureza.³³

Metabolismo de compostos endógenos

Glutaciona transferases participam das etapas do catabolismo de aminoácidos, como fenilalanina e tirosina.³⁴ Estudos *in vitro* também mostraram que glutaciona transferases (GSTs) são responsáveis pela isomerização do ácido 13-*cis*-retinóico ao ácido 13-*trans*-retinóico.³⁵

Em animais, através de várias etapas, entre elas, reações de oxidação e isomerização, o colesterol (**22**) é convertido em hormônios esteroidais, como testosterona e progesterona³⁶ (Figura 8). A biossíntese destes hormônios envolve a formação de um intermediário-chave comum, o 3- β -hidróxi-5-pregnen-20-ona (**23**). A clivagem da cadeia lateral de **23**, seguida da oxidação da hidroxila 3 β , fornece a Δ^5 -androsteno-3,17-diona (**24**), que, sob a ação da glutaciona transferase citossólica A3-3 (GST A3-3), é convertida ao seu regioisômero Δ^4 -androsteno-3,17-diona (**25**). A testosterona (**26**) é então obtida a partir de **25**, após redução seletiva da carbonila cetônica presente no anel D. Alternativamente, o intermediário **23** é oxidado à Δ^5 -pregnen-3,20-diona (**27**), e a isomerização da ligação dupla pela ação da GST A3-3, resultando na produção de progesterona (**28**).³⁶

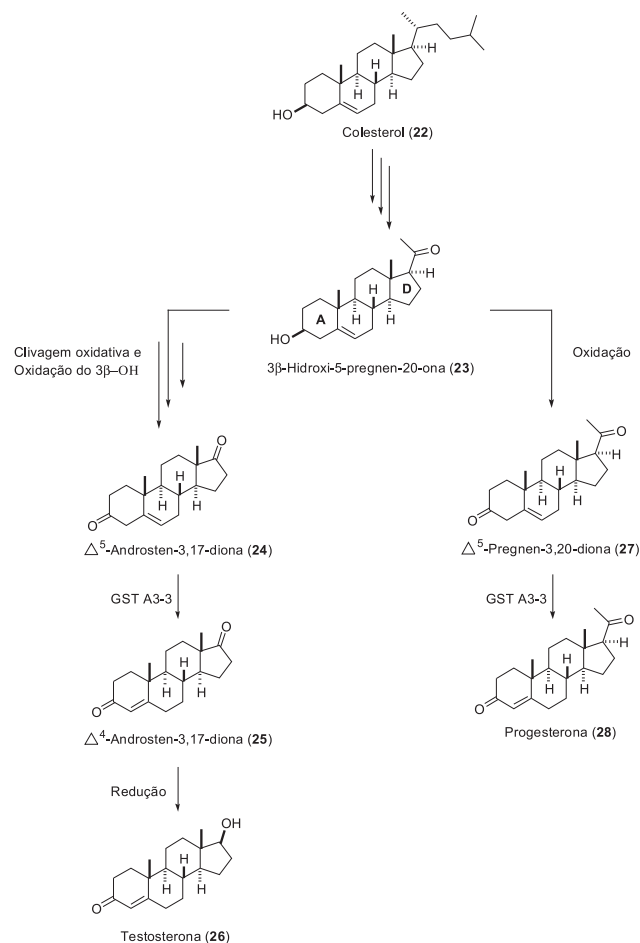


Figura 8. Algumas etapas da biossíntese da testosterona (**26**) e da progesterona (**28**)

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HO^\cdot), é consequência natural da respiração aeróbica. Estas espécies podem causar danos estruturais a muitas biomoléculas, como lipídeos de membrana, DNA, proteínas, carboidratos etc. Felizmente, a célula possui um sistema antioxidante que compreende as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutaciona peroxidase, além de agentes oxidantes como α -tocoferol, ácido ascórbico, bilirrubina etc.²³ A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares resulta na formação de eletrófilos, como aldeídos e, hidroxialdeídos-, cetoaldeídos- α,β -insaturados e/ou seus respectivos epóxidos. Alguns destes são altamente genotóxicos,³⁷ e sua formação excessiva pode ser controlada pela ação de GSTs.^{38,39} De fato, foi demonstrado que GSTs promovem a adição conjugada da glutaciona (GSH) à acroleína, crotonaldeído e à outros aldeídos α,β -insaturados que possuem de 6 a 15 átomos de carbono.³⁰ Outros exemplos da atuação de glutaciona transferases na detoxificação de compostos endógenos incluem a ação de tais enzimas sobre epóxidos derivados do colesterol, do ácido eicosatrienóico e do ácido esteárico,³⁰ de aldeídos α,β -insaturados derivados de nucleotídeos e quinonas derivadas da dopamina etc.²³

Metabolismo de xenobióticos: detoxificação ou bioativação?

Os seres vivos estão continuamente expostos a compostos químicos naturais e/ou não-naturais a eles estranhos. Estes compostos são denominados xenobióticos e podem interagir de maneira dele-

téria ao organismo. A detoxificação enzimática de xenobióticos pode ser classificada em três fases distintas, porém estritamente relacionadas: fase I, II e III. Nas fases I e II, geralmente se observa a transformação do xenobiótico em uma espécie que apresenta maior solubilidade em água, além de uma menor toxicidade. Na fase III, estes metabólitos são transportados para o exterior da célula e então excretados. De fato, a fase II do metabolismo de xenobióticos compreende um importante passo para a eliminação destas espécies do meio celular, podendo em alguns casos envolver a participação de transportadores. É o caso, por exemplo, dos transportadores dos conjugados de glutatona/xenobióticos,²⁷ que incluem o transportador de ânions orgânicos multiespecíficos (MOAT),⁴⁰ e o transportador de adutos glutatona-dinitrofenóis (Dnp-SG ATPase)^{41,42} dentre outros. A maioria dos processos da fase I é mediada pelas enzimas citocromo P450 que são responsáveis, principalmente por reações de oxidação dos xenobióticos.⁴³ As enzimas da fase II catalisam a conjugação dos xenobióticos (ou de seus metabólitos oriundos da fase I) com substratos endógenos (geralmente glutatona, ácido glucurônico e glicina) tornando-os mais solúveis em água. Quantitativamente a formação de conjugados com a glutatona é a principal reação observada para muitos xenobióticos durante a fase II.²⁷ De fato, os níveis celulares (em condições normais) de glutatona reduzida (GSH) são altamente elevados (~10 mM), indicando que o mecanismo de detoxificação *via* glutatona pode representar uma adaptação biológica fundamental para a sobrevivência e garantia da perpetuação de muitas espécies.⁴⁴⁻⁴⁶ Além deste mecanismo, a existência de um sistema de co-transporte [GSH + xenobiótico] sem o envolvimento do conjugado com a glutatona foi proposta. Porém, até o presente momento não há evidências experimentais inequívocas que validem este modelo.⁴⁷ Alguns exemplos da atuação de GSTs em reações de conjugação são apresentados na Figura 9. O antineoplásico bulsufan (**29**) é um agente alquilante empregado no tratamento de quadros crônicos de leucemia.^{48,49} Estudos sobre a metabolização do bulsufan (**29**) demonstraram que sua conjugação com a glutatona (GSH) passa pelo intermediário **30**, levando à formação do cátion sulfônio (**31**), e é o principal mecanismo de detoxificação celular (Figura 9A). Compostos aromáticos derivados do naftaleno **32** (Figura 9B) são altamente tóxicos e carcinogênicos, que podem ser encontrados no ambiente como produtos da combustão da gasolina. Durante as etapas de metabolização destes compostos, ocorre a formação de óxidos de arenos (**33** e **34**, Figura 9B) que são interceptados pelas GSTs, formando os álcoois isoméricos **35-38**. Neste processo, três dos quatro possíveis isômeros dos conjugados de glutatona/naftaleno foram identificados.⁵⁰ A morfina (**39**) é um alcalóide utilizado como anestésico e analgésico. A sua metabolização envolve, a princípio, dois possíveis caminhos de oxidação, ambos levando à formação de espécies (aceptores de Michael) altamente susceptíveis à adição conjugada da glutatona (GSH) (Figura 9C). Um dos caminhos envolve a participação da morfina 6-desidrogenase (M6D) na etapa de oxidação, levando à formação da morfina 6-oxo **40**.⁵¹ A adição conjugada da glutatona à morfina **40** fornece o conjugado **41** que é então excretado do meio celular (Figura 9C).⁵² O outro caminho envolve as enzimas citocromo P450: a atuação destas enzimas sobre a morfina **39** produz a quinona **42**, que após adição da glutatona (GSH) fornece o conjugado **43**, que é então excretado.⁵³

Acetaminofenol (**49**, Tylenol®) é um analgésico popular e “seguro” se usado em dosagem apropriada. Porém, o uso de altas doses pode causar danos renais.^{54,55} O acetaminofenol (**49**) é metabolizado à iminoquinona (**50**) através do mecanismo apresentado na Figura 10. Altas concentrações da enzima prostaglandina H sintase (PGH sintase) são encontradas nos rins e estudos de-

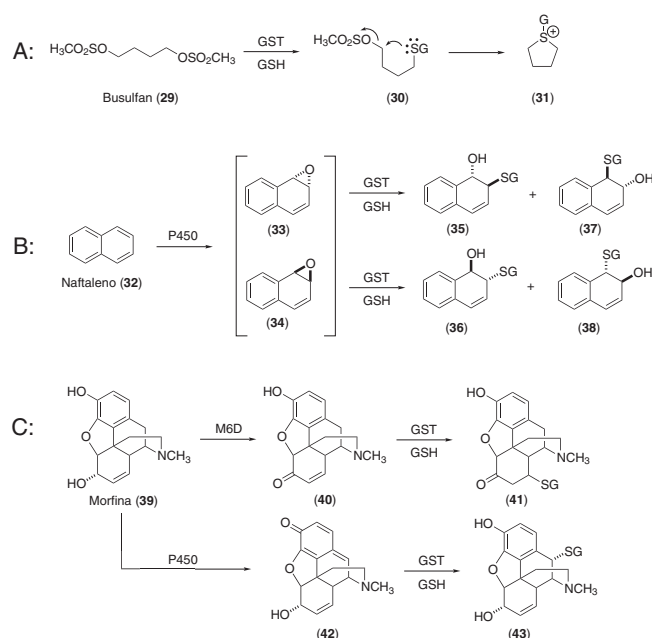


Figura 9. Exemplos da atuação de glutatona transferases (GST) na detoxificação celular de xenobióticos

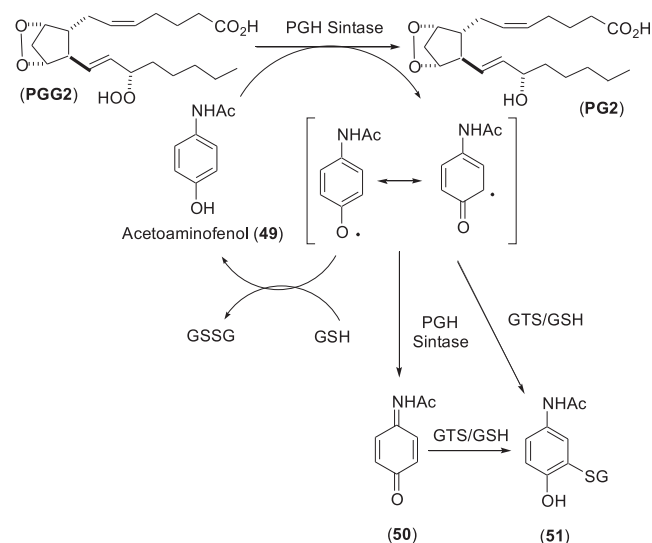


Figura 10. Via de ativação/desativação metabólica do acetaminofenol **49**

monstram que a atuação desta enzima sobre o acetaminofenol (**49**) é a principal fonte da toxicidade observada neste órgão. Durante a redução da prostaglandina PGG₂ a PG₂, através da ação da PGH sintase, pode ocorrer a oxidação do acetaminofenol (**49**), levando à formação da iminoquinona (**50**).⁵⁶ A adição conjugada da glutatona (GSH) a **50** leva à desativação desta espécie, formando o aduto **51**. Outros exemplos da atuação de glutatona transferases em processos de detoxificação/ativação celular de xenobióticos estão devidamente discutidos na literatura.⁵⁷⁻⁶⁵

Como mencionado anteriormente, a atuação das GSTs é uma importante estratégia de defesa da célula contra xenobióticos. Mas, quais são os mecanismos de eliminação dos conjugados de glutatona para fora da célula? Uma vez formados, os conjugados da glutatona/xenobióticos são reconhecidos por transportadores específicos e conduzidos para o meio intercelular (Figura 11).^{27,40,41} No meio intercelular, os conjugados da glutatona/xenobióticos são clivados pela ação das enzimas γ -glutamyl transpeptidase (γ GT) e dipeptidases

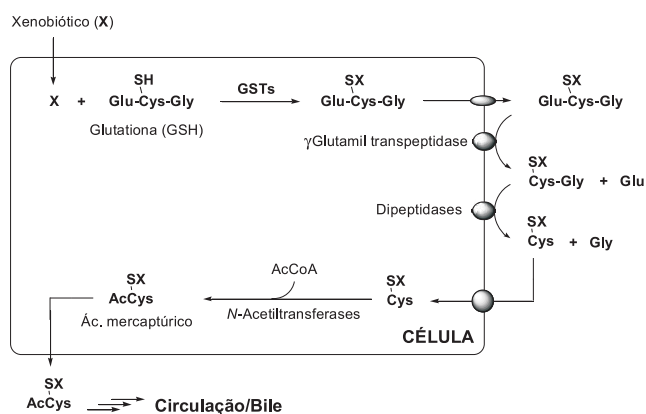


Figura 11. Detoxificação de xenobióticos via ácidos mercaptúricos

presentes na porção externa da membrana celular.⁶⁶ Alguns autores referem-se a estas etapas como a fase III do metabolismo de xenobióticos. A primeira etapa de eliminação dos conjugados da glutatona envolve a remoção de um resíduo de ácido glutâmico pela γ -glutamil transpeptidase (γ GT). Numa etapa posterior ocorre a clivagem de um resíduo de glicina por dipeptidases, restando apenas o resíduo da cisteína ligada ao xenobiótico. O glutamato e a glicina livres podem ser reabsorvidos pela célula e utilizados na síntese de glutatona (GSH). O grupo amino do resíduo de cisteína presente no conjugado cisteína/xenobiótico é acetilado pela ação de *N*-acetiltransferases intracelulares para formar o correspondente ácido mercaptúrico, que é conduzido à circulação ou à bile.⁶⁷ Dependendo das características da porção derivada do xenobiótico (X), o correspondente ácido mercaptúrico poderá ser diretamente excretado na urina, ou passar por metabolização para ser eliminado.⁶⁸ É importante observar que as enzimas GSTs fazem parte de um sistema de defesa integrado, e que a eficiência deste sistema depende da ação combinada de outras enzimas, como a γ -glutamilcisteína sintase (γ GluCysS) e a glutatona sintase, no sentido de fornecer glutatona, bem como de transportadores que facilitem a eliminação dos conjugados de GSH.

Em alguns casos, os conjugados de glutatona/xenobióticos são mais tóxicos que o próprio xenobiótico. Exemplos deste fenômeno incluem conjugados de haloalcanos e alil, benzil e feniletilisocianatos etc.⁶⁹⁻⁷³ Haloalcanos, como o diclorometano (CH_2Cl_2), são altamente genotóxicos, mostrando serem capazes de induzir câncer de pulmão e de fígado em ratos.^{74,75} A atividade genotóxica do diclorometano está relacionada à bioativação deste por glutatona transferases citossólicas *h*GSTT1-1 e *r*GSTT5-5 (Figura 12).^{70,72,76} A conjugação do diclorometano (CH_2Cl_2) ou de outros dialoalcanos se dá, inicialmente, pela substituição nucleofílica de um dos átomos de cloro por glutatona (GSH), fornecendo o aduto *S*-clorometilglutaciona (**52**).⁷⁷ O aduto *S*-clorometilglutaciona **52** é instável e reativo,^{78,79} sendo que evidências diretas de sua formação

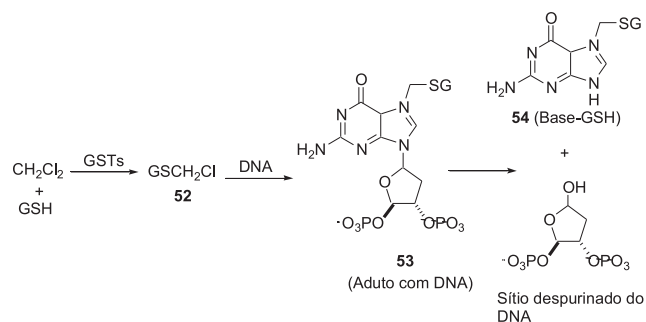


Figura 12. Mecanismo de bioativação de diclorometano por (GSTs)

só foram possíveis utilizando-se ressonância magnética nuclear de ^{19}F e clorofluorometano (CH_2ClF) como substrato para as glutatona transferases (GSTs).⁸⁰ A interceptação do aduto **52** por nucleófilos biológicos, como as bases nitrogenadas do DNA, gera inicialmente o aduto **53**, seguida da despurinação do DNA com formação de **54**, podendo levar à morte da célula.

ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE GLUTATIONA E SUA CORRELAÇÃO COM O CÂNCER

As glutatona transferases evolutivamente representam um mecanismo de defesa da célula, porém também podem ser utilizadas pela célula na inativação de fármacos, como mencionado anteriormente.⁸¹

A resistência celular a múltiplos fármacos (sigla em inglês MDR) é um processo cujos mecanismos são de mais alta complexidade e importância.^{62,82,83} No caso de células tumorais, o termo resistência a múltiplos fármacos (MDR) é usado para descrever um fenômeno caracterizado pela capacidade destas células apresentarem uma resistência simultânea a diferentes agentes quimioterápicos estruturalmente e funcionalmente não-relacionados. De maneira geral, a MDR pode ser classificada em duas categorias: resistência intrínseca - manifestada no primeiro ciclo de tratamento e vinculada ao processo original de transformação maligna da célula e, resistência adquirida - encontrada após exposição a agentes citotóxicos, possivelmente como um resultado da seleção de populações celulares tolerantes.⁸² Entre os vários mecanismos relacionados à resistência celular a múltiplos fármacos, o sistema enzimático glutatona/glutaciona transferases (GSH/GSTs) é apontado como um dos mais importantes para este fenômeno. Os mecanismos de resistência *via* sistema enzimático glutatona/glutaciona transferases (GSH/GSTs) envolvem principalmente: alterações nos níveis de glutatona (GSH) e/ou na expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese de glutatona (GSH); alterações do transporte dos conjugados de glutatona (aumento da eficiência do transporte dos conjugados como consequência do aumento de glutatona e/ou do aumento da expressão dos genes que codificam os transportadores destes conjugado) e/ou, alterações na expressão dos genes que codificam as glutatona transferases.⁸³⁻⁸⁹ De fato, a expressão dos genes que codificam as glutatona transferases é usualmente maior em células tumorais que em não-tumorais.⁸⁹ Além disso, foi demonstrado que a depleção de glutatona (GSH) pode aumentar a sensibilidade celular a agentes alquilantes utilizados como quimioterápicos. Estes resultados ressaltam a importância do sistema enzimático glutatona/glutaciona transferases (GSH/GSTs) no mecanismo celular de resistência.^{90,91} Além dos níveis de glutatona (GSH), em muitos tipos de tumor humano foi observado que a quantidade e o tipo GST são diferentes e dependem do tipo de tecido.⁹²⁻⁹⁴ Uma exceção refere-se à classe Pi de glutatona transferases (GST P1-1) que parece ser uma "constante" em células tumorais (côlon, pulmão, ovário, mama, estômago, bexiga, rim, testículo) apresentando-se em altas concentrações (2-4 vezes maior) quando comparadas àquelas encontradas em células saudáveis de mesma origem.^{17,95} A classe Alpha de glutatona transferases (GSTA) também foi encontrada em altos níveis de expressão gênica em alguns tipos de tumores, enquanto que a classe Mu (GSTM) ocasionalmente se faz presente nos tipos de tumores nos quais as classes Pi (GSTP) e Alpha (GSTA) estão ausentes ou com baixa expressão gênica.⁹³ GSTP1-1 parece estar diretamente relacionada ao desenvolvimento de resistência a fármacos, representando uma barreira para o tratamento adequado de vários tipos de câncer.⁹⁶⁻¹⁰¹

Apesar de não se conhecer totalmente o papel do sistema enzimático glutatona/glutaciona transferases (GSH/GSTs) nos variados mecanismos associados à resistência celular a múltiplos fármacos, as informações existentes estão permitindo o desenvolvimento de no-

vas estratégias que contornem esta resistência e/ou utilizem destes mecanismos para o desenho de fármacos mais eficientes.⁸²

A observação de que os níveis da glutatona transferases GSTP1-1 em células de câncer são maiores que aqueles observados em células não-tumorais de mesma origem foi utilizada para o desenvolvimento de quimioterápicos.^{73,94,102} Por exemplo, o TLK286 (Figura 13), um análogo da glutatona, é um pró-fármaco que é preferencialmente ativado pela GSTP1-1. O TLK286 teve seu desenho baseado nos estudos cristalográficos das glutatona transferases GSTM1a-1¹⁰³ e GSTP1-1.¹⁰⁴ Nestes estudos foi verificado que estas enzimas abstraem o hidrogênio do grupo sulfidrílico da glutatona (GSH), seu substrato natural, gerando um ânion sulfeto que é mais nucleofílico que a própria GSH e, portanto, mais reativo com eletrófilos. Além disso, estes estudos revelaram que a abstração do hidrogênio sulfidril é feita pelo grupo hidroxila de um resíduo de tirosina presente no sítio de ligação da glutatona (GSH) nestas enzimas. Porém, no caso do TLK286, que não apresenta hidrogênio sulfidrílico, a atuação da GSTP1-1 leva à abstração do hidrogênio do carbono α à sulfona (Figura 13). A abstração deste, seguida de β -eliminação, fornece a fosforamida (**60**) e a vinilssulfona (**61**) no meio intracelular.^{73,94,102} A fosforamida **60** é um agente alquilante de DNA, responsável pelos efeitos antiproliferativos observados para o TLK286. O TLK286 mostrou ser clinicamente ativo durante a fase II (atualmente os estudos clínicos do TLK286 se encontram na fase III) contra células de câncer de mama, cólon, e pulmão.¹⁰⁵ TLK286 também se mostrou efetivo nos estudos com pacientes que apresentam câncer de ovário resistentes à cisplatina e ao taxol.¹⁰⁵

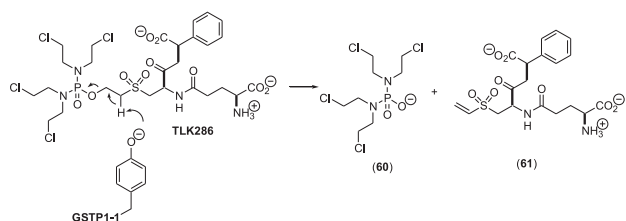


Figura 13. Mecanismo de bioativação do TLK286 pela glutatona transferase GSTP1-1

ANÁLISE DE GLUTATONA E DERIVADOS

Métodos analíticos para quantificar GSH, ou seus precursores e metabólitos, em várias matrizes biológicas são de extrema importância e a literatura apresenta uma vasta coletânea destes métodos, que vêm sendo revistos.¹⁰⁶ Ao selecionarmos um método analítico com este propósito, ele deve ser específico para diferenciar a GSH de outros tióis presentes nas células e em produtos de biotransformação, além de separar GSH e GSSG de moléculas interferentes, presentes em matrizes complexas, como por exemplo, sangue total e homogenato de fígado. Os métodos de análise dividem-se em cromatográficos e não cromatográficos, mas qualquer que seja ele, o pré-tratamento da amostra é fundamental, incluindo coleta e preparação da amostra, remoção de proteínas e a derivatização, dependendo da técnica selecionada. Em relação à preparação da amostra, o ponto mais crítico da análise da GSH é a sua auto-oxidação em pH ~ 7 ,¹⁰⁷ sendo recomendada a manipulação abaixo deste valor.¹⁰⁸ Este procedimento também é importante para dificultar a proteólise em matrizes biológicas, catalisada pela γ -glutamiltanspeptidase. Assim, as recomendações gerais são a manutenção do pH abaixo de 7, refrigeração e, quando a matriz é o plasma, a precipitação de proteínas por ácidos é também indicada. O uso de ultrassom não é recomendado, porque provoca hemólise, uma das principais causas de erro, geralmente na fase de coleta da amostra,¹⁰⁹ uma vez que a concentração de GSH nas hemácias é muito alta; já a armazenagem à

temperatura ambiente, favorece reações de auto-oxidação e proteólise, consumindo o substrato GSH e acarretando valores baixos de concentração. O uso de catéter para coleta do sangue e o recolhimento em tubos heparinizados contornam estes problemas.¹¹⁰ Inibidores da γ -glutamiltansferase e agentes quelantes como a 1,10-fenantrolina para capturar o íon ferroso, prevenindo reações de oxidação da GSH, também são utilizados.¹¹¹ As proteínas presentes em amostras biológicas devem ser removidas antes da análise, através da precipitação com ácidos (5-sulfossilicídico, trifluoroacético, tricloroacético, perclórico, metafosfórico),¹¹² ou por solventes orgânicos, dos quais os mais usados são acetona, acetonitrila e metanol.¹¹³ Este último procedimento é o preferido quando a detecção é por espectrometria de massas. Uma outra técnica importante é a ultracentrifugação, que exclui macromoléculas com base nas dimensões dos poros dos filtros.

A ausência de cromóforos fortes e fluoróforos na estrutura da glutatona torna necessária a derivatização, para aumentar o limite de detecção. O reagente selecionado para a derivatização deve ser inerte na matriz, além de proporcionar alta sensibilidade, especificidade, e dispensar extração com solvente para remover excesso. Embora a GSH tenha três sítios susceptíveis à derivatização, apenas os grupos amino e sulfidril têm sido utilizados como alvos para estas reações, destacando-se este último.

Introdução de um cromóforo

N-etilmaleimida (NEM) e análogos, e o ácido monoiodoacético são frequentemente empregados com reagentes em reações de derivatização, fornecendo os tioéteres **62** e **63**, respectivamente (Figura 14). A eficácia do ácido monoiodoacético na proteção da GSH contra auto-oxidação, foi demonstrada em experimentos com homogenato de fígado de rato.¹¹⁴ O ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), ou simplesmente, DTNB, ou reagente de Ellmann **64**,¹¹⁵ é bastante utilizado nas determinações de GSH. O grupo sulfidril da glutatona quebra a ligação dissulfeto do DTNB, gerando o aduto GSTN e liberando o ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico **65**, que é detectado em 412 nm.

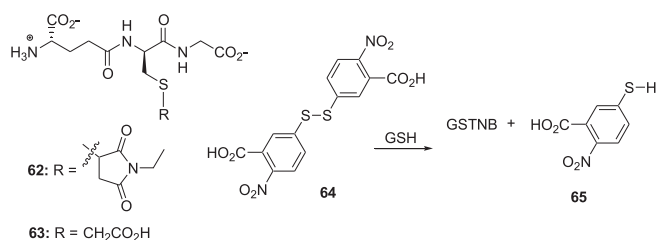


Figura 14. Derivados da GSH com NEM (**62**), ácido monoiodoacético (**63**), e reação da glutatona com o DTNB (**64**)

Introdução de um fluoróforo

Para detecção de fluorescência, ou mesmo para aumentar o limite de detecção UV-Vis, *orto*-ftalaldeído (**66**, Figura 15) e monobromobimano **67** podem ser empregados. O primeiro é o mais usado, formando adutos fluorescentes de GSH e outros aminotióis. A adição de um co-reagente, fonte de nitrogênio nucleofílico, leva à formação de isoindol fluorescente.¹¹⁶ O monobromobimano é um reagente específico para o grupo sulfidril, não sendo útil para a detecção de GSSG. A emissão de fluorescência dos adutos formados é relativamente alta, sendo detectados mesmo em concentrações muito baixas.¹¹⁷

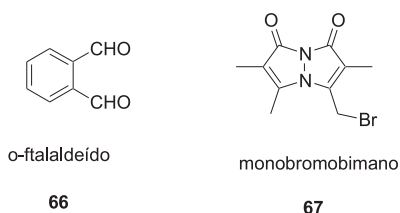


Figura 15. Reagentes utilizados na derivatização da GSH para detecção por fluorimetria

Métodos não-cromatográficos

Dentre estes podemos citar a espectrofotometria, espectrofluorimetria e amperometria, que permitem a análise de GSH e derivados. O fundamento do ensaio espectrofotométrico clássico para determinação da concentração de glutaciona está baseado na reação cinética de oxidação da GSH a GSSG, promovida pelo DTNB. Para a determinação da GSSG, é necessário o bloqueio prévio da GSH, empregando NEM ou vinilpiridina. Este método pode ser utilizado em várias matrizes biológicas.¹¹⁸ Já o ensaio fluorimétrico é desenvolvido após a derivatização do grupo sulfidril da GSH com o marcador de fluorescência 5-maleimidil-2-(*m*-metilfenil)-benzoxazola (MMBP). Este método apresenta seletividade significativa para a GSH em detrimento de tióis menores, como a cisteína, e foi utilizado na determinação de GSH em sangue total humano, homogenatos de fígado de porco e coração, dispensando um pré-tratamento para eliminação de interferentes.¹¹⁹ Os métodos eletroquímicos têm importantes aplicações na análise de amostras, incluindo-se fluidos biológicos, baseados em diferentes eletrodos. A literatura apresenta uma discussão substanciada deste método aplicado à glutaciona.^{120,121}

Métodos cromatográficos

Cromatografia em camada fina (CCF)

É possível detectar o derivado fluorescente formado entre GSH e (5-pentafluorbenzoilamina)-fluoresceína. O aduto formado pode ser separado do excesso do reagente por CCF, e quantificado por fluorimetria. O método é bastante seletivo e foi utilizado para detecção de GSH em extrato de células endoteliais de artéria pulmonar.¹²²

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

É o método mais utilizado, explorando os vários sistemas de detecção. A fase estacionária geralmente empregada é a ODS (octadecilsilicagel). Em muitos casos, a cromatografia é em fase reversa, uma vez que a derivatização com agentes marcadores gera adutos hidrofóbicos. A acidificação da mistura eluente (metanol-H₂O, CH₃CN-H₂O, DMF, tampão fosfato pH 3,0, HCO₂H-H₂O e suas combinações em diferentes proporções) é muitas vezes requerida para minimizar a oxidação da função tiol.¹²³

Em relação aos métodos de detecção, a baixa sensibilidade e especificidade do UV-Vis levaram à sua substituição por outros métodos. A detecção fluorimétrica é bastante empregada para matrizes biológicas, que requerem alta sensibilidade. Um outro método, rápido, sensível e que não requer derivatização é a detecção eletroquímica, usando geralmente eletrodo de Au-Hg.¹²⁴ O uso de dois eletrodos de grafite em série permitiu a detecção tanto de GSH (1º eletrodo), quanto de GSSG (2º eletrodo), em um potencial positivo.¹²⁵

CLAE em fase reversa e espectrometria de massas por eletrospray (EM-ESI) tem se mostrado uma interface bastante importante para detecção de GSH e GSSG, considerando a sua sensibilidade e especificidade. O eluente ácido leva à associação destes peptídeos com o próton, formando íons pseudomoleculares carre-

gados positivamente de massas 308,1 e 613,3 para GSH e GSSG, respectivamente.

Cromatografia em fase gasosa (CG)

Não é muito utilizada devido à polaridade e alto ponto de ebulição dos compostos. Assim, para análise por CG, a derivatização é necessária, empregando-se geralmente anidrido trifluoroacético¹²⁶ ou cloroformiato de etila,¹²⁷ gerando os correspondentes tioésteres.

Eletroforese capilar (EC)

A separação eletroforética é realizada aplicando-se um campo elétrico relativamente alto à amostra introduzida em um capilar contendo um eletrólito apropriado (*background electrolyte*), permitindo separações eficientes em pouco tempo. Deve-se ter cuidado com o pré-tratamento de amostras biológicas, pois as proteínas são facilmente adsorvidas na parede capilar, afetando o tempo de migração dos compostos analisados e a resolução. Dentre as principais características deste método destacam-se o baixo custo, a possibilidade de se usar solvente polar orgânico ou aquoso, utilizando volume muito pequeno (nL de amostra e μ L de tampão). Na análise de GSH e seus análogos por EC, em matrizes complexas, a seletividade na separação pode ser alcançada empregando-se zona livre ou cromatografia eletrocinética micelar, embora a primeira seja a mais utilizada. Concentrações elevadas de tampão-borato ou fosfato são requeridas para aumentar a resolução.¹²⁸ Quanto à detecção, esta pode ser por fotometria, fluorimetria, eletroquímica ou por espectrometria de massas.

Paralelamente ao desenvolvimento das tecnologias analíticas, as determinações de GSH tornam-se mais refinadas, cobrindo praticamente todas as combinações entre equipamentos analíticos e sistemas de detecção existentes no mercado, podendo determinar a glutaciona e congêneres em várias matrizes biológicas complexas. Diferentes métodos de CLAE e EC apresentam elevadas sensibilidade e reprodutibilidade, constituindo-se nos principais métodos para investigar variações mínimas no sistema redox envolvendo GSH. Erros podem resultar das diversas fases dos procedimentos analíticos, assim como coleta da amostra, processamento e armazenagem devidos principalmente à auto-oxidação e proteólise da GSH. Assim, apesar da grande disponibilidade de métodos e técnicas para as determinações é necessário padronizar os procedimentos na coleta e pré-tratamento das amostras, para que a formação de artefatos seja minimizada e os resultados de diferentes análises sejam comparáveis.

PERSPECTIVAS

O conhecimento já estabelecido para o envolvimento da glutaciona (GSH) e suas enzimas nos diversos processos biológicos a ela relacionada claramente demonstram que a história da GSH ainda não está a ponto de finalizar. O avanço das técnicas de análise da GSH associadas a proteínas, como é o caso da espectrometria de massas, e/ou localização da GSH, em suas formas livres ou associadas, em órgãos, tecidos e estruturas subcelulares por técnicas modernas de imagem revelarão muitas oportunidades para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas para tratamento da malária, câncer e muitas outras doenças que afligem a humanidade.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Informações adicionais sobre GO, GPx, GR e GSTs e composição do sítio ativo das duas últimas, estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, em forma de arquivo PDF e com acesso gratuito.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Auxílio à Pesquisa de Doutores Recém-Contratados da UFMG pelo apoio financeiro. Os autores agradecem à Elsevier Ltda. and Dr. A. P. Karplus (University of Washington).

REFERÊNCIAS

- Joseph, P. D.; Mannervik, B.; Ortiz de Montellano, P.; *Molecular Toxicology*, 1st ed., Oxford University Press: New York, 1997, p.152-186.
- Chambres, I.; Harrison, P. R.; *Trends Biochem Sci.* **1987**, *12*, 255; Hatfield, D.; Diamond, A.; *Trends Genet.*, **1993**, *9*, 69.
- Cohen, G.; Hochstein, P.; *Biochemistry* **1963**, *2*, 1420.
- Carsol, M. A.; Pouliquen, I.; Lesgards, G.; Marchi, G.; Puigserver, A.; Santimoni, M.; *Eur. J. Biochem.* **1997**, *247*, 248; Lehmann, C.; Wollenberger, U.; Brigelius-Flohé, R.; Scheller, F. W.; *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *455*, 259.
- Kanzok, S. M.; Schirmer, R. H.; Turbachova, I.; Iozef, R.; Becker, K.; *J. Mol. Biol.* **2000**, *275*, 40180; Rahlfs, S.; Schirmer, R. H.; Becker, K.; *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1024; Rahlfs, S.; Schirmer, R. H.; Becker, K.; Nickel, C.; *Biol. Chem.* **2003**, *348*, 551.
- Andricopulo, A. D.; Akoachere, M. B.; Krogh, R.; Nickel, C.; McLeish, M. J.; Kenyon, G. L.; Arscott, L. D.; Williams Jr., C. H.; Davioud-Charvet, E.; Becker, K.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2283.
- Sarma, G. N.; Savvides, S. N.; Becker, K.; Schirmer, R. H.; Schirmer, R. H.; Karplus, P. A.; *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 893.
- Karplus, P. A.; Pai, E. F.; Schulz, G. E.; *Eur. J. Biochem.* **1989**, *178*, 693.
- Savvides, S. N.; Karplus, P. A.; *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8101.
- Becker, K.; Christopherson, R. I.; Cowden, W. B.; Hunt, N. H.; Schirmer, R. H.; *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 59.
- Schonleben-Janans, A.; Kirsch, P.; Mittl, P. R.; Schirmer, R. H.; Krauth-Siegel, R. L.; *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1549.
- Farber, P. M.; Arscott, L. D.; Williams, C. H.; Jr, Becker, K.; Schirmer, R. H.; *FEBS Lett.* **1998**, *422*, 311.
- Boese, M.; Keese, M. A.; Becker, K.; Busse, R.; Mulsch, A.; *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 21767.
- Becker, K.; Gui, M.; Schirmer, R. H.; *Eur. J. Biochem.* **1995**, *234*, 472.
- Fitzgerald, G. B.; Bauman, C.; Hussoin, M. S.; Vick, M. M.; *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *41*, 185.
- Jochheim, C. M.; Baillie, T. A.; *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 1197; Kassahum, K.; Jochheim, C. M.; Baillie, T. A. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 587.
- Guan, X.; Hoffman, B. N.; McFarland, D.C.; Gilkerson, K.K.; Dwivedi, C.; Erickson, A. K.; Bebenese, S.; Pellegrini, J.; *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 331.
- Karplus, P. A.; Krauth-Siegel, R. L.; Schirmer, R. H.; Schulz, G. E.; *Eur. J. Biochem.* **1998**, *171*, 193.
- Biot, C.; Delarue, S. H.; Davioud-Charvet, E.; Schwobel, B.; Boehme, C. S. C.; Mussigbordt, A.; Maes, L.; Sergheraert, C.; Grellier, P.; Schirmer, R. H.; Becker, K.; *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4266.
- Halliwell, B.; *New Physiol.* **1974**, *73*, 1075 e referências citadas.
- Biot, C.; Bauer, H.; Schirmer, R. H.; Davioud-Charvet, E.; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5972.
- Seefeldt, T.; Dwivedi, C.; Peitz, G.; Herman, J.; Carlson, L.; Zhang, Z.; Guan, X.; *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5224.
- Hayes, J. D.; Flanagan, J. U.; Jowsey, I. R.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 51.
- Danielson, U. H.; Mannervik, B.; *Biochem. J.* **1985**, *231*, 263.
- Keen, J. H.; Jakoby, W. B.; *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 5654.
- Armstrong, R. N.; *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 2.
- Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V. W.; Dowd, C. A.; *Biochem. J.* **2001**, *360*, 1.
- Armstrong, R. N.; *Biochemistry* **2000**, *39*, 13625.
- Mannervik, B.; Awasthi, Y. C.; Board, P. G.; Hayes, J. D.; Di Ilio, C.; Listowsky, I.; Morgenstern, R.; Muramatsu, M.; Pearson, W. R.; Pickett, C. B.; Sato, K.; Widersten, M.; Wolf, C. R.; *Biochem. J.* **1992**, *282*, 305.
- Hayes, J. D.; Pulford, D. J.; *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *30*, 445.
- Dulhunty, A.; Gage, P.; Curtis, S.; Chelvanayagam, G.; Board, P.; *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3319.
- Morel, F.; Rauch, C.; Petit, E.; Piton, A.; Theret, N.; Coles, B.; Guillouzo, A.; *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16246.
- Jakobsson, P.-J.; Morgenstern, R.; Mancini, J. A.; Ford-Hutchinson, A.; Persson, B.; *Protein Sci.* **1999**, *8*, 689.
- Knox, W. E.; Edwards, S. W.; *J. Biol. Chem.* **1955**, *216*, 489.
- Chen, H.; Juchau, M. R.; *Biochem. J.* **1998**, *336*, 223.
- Johansson, A.-S.; Mannervik, B.; *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 33061.
- Marnett, L. J.; Riggins, J. N.; West, J. D.; *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 583.
- Hurst, R.; Bao, Y.; Jemth, P.; Mannervik, B.; Williamson, G.; *Biochem. J.* **1998**, *332*, 97.
- Prabhu, K. S.; Reddy, P. V.; Jones, E. C.; Liken, A. D.; Reddy, C. C.; *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *424*, 72.
- Heijn, M.; Oude Efferink, R. P. J.; Jansen, P. M. L.; *Am. J. Physiol.* **1992**, *262*, C104.
- Saxena, M.; Singhal, S. S.; Awasthi, S.; Singh, S. V.; Labelle, E. F.; Zimniak, P.; Awasthi, Y. C.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *298*, 231.
- Kavallaris, M.; *Anticancer Drug* **1997**, *8*, 17 e referências citadas.
- Guengerich, F. P.; *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1990**, *25*, 97.
- van Bladeren, P. J.; *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *129*, 61.
- Dringen, R.; *Progr. Neurobiol.* **2000**, *129*, 649.
- Landi, S.; *Mutat. Res.* **2000**, *463*, 247.
- Borst, P.; Zelcer, N.; van de Wetering, K.; Poolman, B.; *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1085.
- Marchand, D. H.; Rimmel, R. P.; Abdel-Monem, M. M.; *Drug Metab. Dispos.* **1988**, *16*, 85.
- Ritter, C. A.; Sperker, B.; Grube, M.; Dressel, D.; Kunert-Keil, C.; Kroemer, H. K.; *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *137*, 1100.
- Buckpitt, A. R.; Castagnoli, N. Jr.; Nelson, S. D.; Jones, A. D.; Bahnsen, L. S.; *Drug Metab. Dispos.* **1987**, *15*, 491.
- Todaka, T.; Ishida, T.; Kita, H.; Narimatsu, S.; Yamano, S.; *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1275.
- Ishida, T.; Kumagai, Y.; Ikeda, Y.; Ito, K.; Yano, M.; Toki, S.; Mihashi, K.; Fujioka, T.; Iwase, Y.; Hachiyama, S.; *Drug Metab. Dispos.* **1989**, *17*, 77.
- Correia, M. A.; Krowech, G.; Caldera-Munoz, P.; Yee, S. L.; Straub, K.; Castagnoli, N. Jr.; *Chem. Biol. Interact.* **1984**, *51*, 13.
- Mitchell, J. R.; Jollow, D. J.; Potter, W. Z.; Gillette, J. R.; Brodie, B. B.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1973**, *187*, 211.
- Potter, W. Z.; Davis, D. C.; Mitchell, J. R.; Jollow, D. J.; Gillette, J. R.; Brodie, B. B.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1973**, *187*, 203.
- Potter, D. W.; Hinson, J. A.; *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 974.
- Hamilton, D. S.; Zhang, X.; Ding, Z.; Hubatsch, I.; Mannervik, B.; Houk, K. N.; Ganem, B.; Creighton, D. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15049.
- Lien, S.; Larsson, A. -K.; Mannervik, B.; *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 191.
- Abel, E. L.; Bammler, T. K.; Eaton, D. L.; *Toxicol. Sci.* **2004**, *79*, 224.
- Abel, E. L.; Opp, S. M.; Verlinde, C. L. M. J.; Bammler, T. K.; Eaton, D. L.; *Toxicol. Sci.* **2004**, *80*, 230.
- Kelly, V. P.; Ellis, E. M.; Manson, M. M.; Chanas, S. A.; Moffat, G. J.; McLeod, R.; Judah, D. J.; Neal, G. E.; Hayes, J. D.; *Cancer Res.* **2000**, *60*, 957.
- Sundberg, K.; Widersten, M.; Seidel, A.; Mannervik, B.; Jernström, B.; *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 1221.
- Hu, X.; Pal, A.; Krzeminski, J.; Amin, S.; Awasthi, Y. C.; Zimniak, P.; Singh, S.; *Carcinogenesis* **1998**, *19*, 1685.
- Dreij, K.; Sundberg, K.; Johansson, A. -S.; Nordling, E.; Seidel, A.; Persson, B.; Mannervik, B.; Jernström, B.; *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 825.
- Coles, B.; Nowell, S. A.; MacLeod, S. L.; Sweeney, C.; Lang, N. P.; Kadlubar, F. F.; *Mutat. Res.* **2001**, *482*, 3.
- Suzuki, T.; Nishio, K.; Tanabe, S.; *Curr. Drug Metab.* **2001**, *2*, 367.
- Hinchman, C. A.; Matsumoto, H.; Simmons, T. W.; Ballatori, N.; *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 22179.
- Boylard, E.; Chasseaud, L. F.; *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1969**, *32*, 173.
- Xu, K.; Thormalley, P. J.; *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 165.
- Thier, R.; Taylor, J. B.; Pemble, S. E.; Humphreys, W. G.; Persmark, M.; Ketterer, B.; Guengerich, F. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 8576.
- Wheeler, J. B.; Stourman, N. V.; Thier, R.; Dommermuth, A.; Vuilleumier, S.; Rose, J. A.; Armstrong, R. N.; Guengerich, F. P.; *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1118.
- Guengerich, F. P.; McCormick, W. A.; Wheeler, J. B.; *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1493.
- Lytte, M. H.; Satyam, A.; Hocker, M. D.; Bauer, K. E.; Caldwell, C. G.; Hui, H. C.; Morgan, A. S.; Mergia, A.; Kauvar, L. M.; *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1501.
- Burek, J. D.; Nitschke, K. D.; Bell, T. J.; Wackerle, D. L.; Childs, R. C.; Beyer, J. E.; Dittender, D. A.; Rampy, L. W.; McKenna, M. J.; *Fundam. Appl. Toxicol.* **1984**, *4*, 30.
- Nitschke, K. D.; Burek, J. D.; Bell, T. J.; Kociba, R. J.; Rampy, L. W.; McKenna, M. J.; *Fundam. Appl. Toxicol.* **1988**, *11*, 48.
- Mainwaring, G. W.; Nash, J.; Davidson, M.; Green, T.; *Biochem. J.* **1996**, *314*, 445.
- Sherratt, P. J.; Pulford, D. J.; Harrison, D. J.; Green, T.; Hayes, J. D.; *Biochem. J.* **1997**, *326*, 837.
- Böhme, V. H.; Fischer, H.; Frank, R.; *Ann. Chem.* **1949**, *563*, 54.

79. Stourman, N. V.; Rose, J. A.; Vuilleumier, S.; Armstrong, R. N.; *Biochemistry* **2003**, *42*, 11048.
80. Blocki, F. A.; Logan, M. S. P.; Baoli, C.; Wackett, L. P.; *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8826.
81. Tew, K. D.; *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2005**, *14*, 1047.
82. Liscovitch, M.; Lavie, Y.; *Drugs* **2002**, *5*, 4.
83. Deeley, R. G.; Cole, S. P. C.; *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1103.
84. Tew, K. D.; Bomber, A. M.; Hoffman, S. J.; *Cancer Res.* **1988**, *48*, 3622.
85. Smith, M. T.; Evans, C. G.; Doane-Setzer, P.; Castro, V. M.; Tahir, M. K.; Mannervik, B.; *Cancer Res.* **1989**, *49*, 2621.
86. Clapper, M. L.; Hoffman, S. J.; Tew, K. D.; *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1096*, 209.
87. Hansson, J.; Berhane, K.; Castro, V. M.; Jungnelius, U.; Mannervik, B.; Ringborg, U.; *Cancer Res.* **1991**, *51*, 194.
88. Meister, A.; *J. Biol. Chem.* **1988**, *269*, 1705.
89. Kikuchi, Y.; Hirata, J.; Yamamoto, K.; Ishii, K.; Kita, T.; Kudoh, K.; Tode, T.; Nagata, I.; Taniguchi, K.; Kuwano, M. *Jpn. J. Cancer Res.* **1997**, *88*, 213.
90. Nakagawa, K.; Yokota, J.; Wada, M.; Sasaki, Y.; Fujiwara, Y.; Sakai, M.; Muramatsu, M.; Terasaki, T.; Tsunokawa, M.; Terada, T.; Saijo, N.; *Jpn. J. Cancer Res.* **1988**, *79*, 301.
91. Kurokawa, H.; Nishio, K.; Ishida, T.; Arioka, H.; Fukuoka, K.; Nomoto, T.; Fukumoto, H.; Yokote, H.; Saijo, N.; *Jpn. J. Cancer Res.* **1997**, *88*, 108.
92. Howie, A.; Forrester, L.; Glancy, M.; Schlager, J.; Powis, G.; Beckett, G.; Hayes, J.; Wolf, C.; *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 451.
93. Campbell, J. A.; Corrigan, A. V.; Guy, A.; Kirsch, R. E.; *Cancer* **1991**, *67*, 1608.
94. Rosen, L. S.; Laxa, B.; Boulos, L.; Wiggins, L.; Keck, J. G.; Jameson, A. J.; Parra, R.; Patel, K.; Brown, G. L.; *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 3689.
95. Shea, T. C.; Kelley, S. L.; Henner, W. D.; *Cancer Res.* **1988**, *48*, 527.
96. Schisselbauer, J. C.; Silber, R.; Papadopoulos, E.; Abrams, K.; LaCreta, F. P.; Tew, K. D.; *Cancer Res.* **1990**, *50*, 3562.
97. Waxman, D. J.; *Cancer Res.* **1990**, *50*, 6449.
98. Cowan, K. H.; Batist, G.; Tulpule, A.; Sinha, B. K.; Myers, C. E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 9328.
99. Robson, C. N.; Lewis, A. D.; Wolf, C. R.; Hayes, J. D.; Hall, A.; Proctor, S. J.; Harris, A. L.; Hickson, I. D.; *Cancer Res.* **1987**, *47*, 6022.
100. McGrown, A.; Fox, B.; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1986**, *17*, 223.
101. Teicher, B. A.; Holden, S. A.; Kelley, M. J.; Shea, T. C.; Cucchi, C. A.; Rosowsky, A.; Henner, W.D.; Frei, E.; *Cancer Res.* **1987**, *47*, 388.
102. Rosen, L. S.; Brown, J.; Laxa, B.; Boulos, L.; Reiswig, L.; Henner, W. D.; Lum, R. T.; Schow, S. R.; Maack, C. A.; Keck, J. G.; Mascavage, J. C.; Dombroski, J. A.; Gomez, R. F.; Brown, G. L.; *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 1628.
103. Ji, X.; Zhang, P.; Armstrong, R.; Gilliland, G.; *Biochemistry* **1992**, *31*, 10169.
104. Reinemer, P.; Dirr, H.; Ladenstein, R.; Huber, R.; Lo Bello, M.; Federici, G.; Parker, M.; *J. Mol. Biol.* **1992**, *227*, 214.
105. Kavanagh, J. J.; Gershenson, D. M.; Choi, H.; Lewis, L.; Patel, K.; Brown, G. L.; Garcia, A.; Spriggs, D. R.; *Int. J. Gynecol. Cancer* **2005**, *15*, 593.
106. Camera, E.; Picardo, M.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *781*, 181.
107. Luo, J.-L.; Hammarqvist, I. A.; Cotgreave, C.; Lind, K.; Andersson, J.; Wernerman, J.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1995**, *670*, 29; Anderson, D. J.; Guo, B.; Xu, Y.; Ng, L. M.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 165R.
108. Lenton, K. J.; Theriault, J. R.; Wagner, J. R.; *Anal. Biochem.* **1999**, *274*, 125.
109. Senft, A. P.; Dalton, T. P.; Shertzer, H. G.; *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 80.
110. Jones, D. P.; Carlson, J. L.; Samiec, P. S.; Sternberg, P. J.; Mody, V. C. J.; Red, R. L.; Brown, L. A. S.; *Clin. Chim. Acta* **1998**, *275*, 175.
111. Yoshida, T.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1996**, *678*, 157.
112. Ivanov, A. R.; Nazimov, I. V.; Baratova, L.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *870*, 433; Melnik, S.; Pogribny, N.; Hine, R. J.; James, S. J.; *J. Nutr. Biochem.* **1999**, *10*, 490; Muscari, C.; Pappagallo, M.; Ferrari, D.; Giordano, E.; Capanni, C.; Calderera, C. M.; Guarnieri, J. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1998**, *707*, 301; Davey, M. W.; Bauw, G.; Van Montagu, M.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1997**, *697*, 269.
113. Caussé, E.; Issac, C.; Malatray, P.; Bayle, C.; Valdiguié, P.; Salvayre, R.; Couderc, F.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *895*, 173; Camera, E.; Rinaldi, M.; Briganti, S.; Picardo, M.; Fanali, S.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2001**, *757*, 69; Loughlin, A. F.; Skiles, G. L.; Alberts, D. W.; Schaefer, W. H.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *26*, 131.
114. Santori, G.; Domenicotti, G.; Bellocchio, A.; Pronzato, M. A.; Marinari, U. M.; Cottalasso, D.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1997**, *695*, 427.
115. Smith, I.K.; Vierheller, T.L.; Thorne, C.A.; *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 408.
116. Molnar-Perl, I. *J. Chromatogr., A* **2001**, *913*, 283; Yan, C. C.; Huxtable, R. *J. J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1995**, *672*, 217.
117. Lada, M. W.; Kennedy, R. T.; *J. Neurosci. Methods* **1997**, *72*, 153.
118. Vina, J.; Sastre, M.; Asensi, L.; Packer, L.; *Methods Enzymol.* **1995**, *251*, 237.
119. Liang, S.-C.; Wang, H.; Zhang, Z.-M.; Zhang, X.; Zhang, H.-S. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *451*, 211.
120. Nascimento, V. B.; Angnes, L.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 614.
121. Junior, L. R.; Höeher, N. F.; Vellasco, A. P.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 112.
122. Arttmangkul, S.; Bhalgat, M. K.; Haugland, R. P.; Diwu, Z.; Liu, J.; Kalubert, D. H. *Anal. Biochem.* **1999**, *269*, 410.
123. Manna, L.; Valvo, L.; Betto, P.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *846*, 59.
124. Rose, R. C.; Bode, A. M.; *Biochem. J.* **1995**, *306*, 101.
125. Lakritz, J.; Plopper, C. G.; Buckpitt, A. R.; *Anal. Biochem.* **1997**, *247*, 63.
126. Lyons, J.; Rauh-Pfeiffer, A.; Yu, Y. M.; Lu, X.-M.; Zurakowski, D.; Tompkins, R. G.; Ajami, A. M.; Young, V. R.; Castillo, L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 5071.
127. Capitan, P.; Malmezat, T.; Breuillé, D.; Obled, C. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1999**, *732*, 127.
128. Lehmann, R.; Voelter, w.; Liebich, H. M.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1997**, *687*, 3.