

TRANSPORT HEPÀTIC DEL GLUTATIÓ

JOSÉ C. FERNÁNDEZ-CHECA

Unitat d'Hepatologia, Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. C. Villarroya, 170, 08038 Barcelona. Tel.: 4515272

INTRODUCCIÓ

El glutatió (GSH) va ser descobert el 1888 per De Rey-Pailhade, però la seva funció s'ha començat a conèixer a partir de les tres últimes dècades. El GSH és una molècula amb una gran eficàcia estructural. Es tracta d'un tripèptid constituït pels aminoàcids glutamat, cisteïna i glicina. El glutamat i la glicina tenen un paper fonamental en la determinació del seu destí metabòlic, mentre que la cisteïna és responsable de les seves funcions. La primera etapa en la síntesi del GSH és la unió entre el glutamat i la cisteïna. Aquesta unió es fa a través del grup γ -carboxil del glutamat en comptes del α -carboxil, com passa normalment en la majoria de pèptids, la qual cosa en determina la resistència a la hidròlisi per peptidases; de fet, l'única peptidasa existent capaç d'hidrolitzar el GSH és la γ -glutamyltranspeptidasa (γ -GT), ectoenzim present a la superfície externa de certs tipus de cèl·lules. L'aminoàcid terminal, la glicina, és fonamental en l'especificitat estructural dels enzims dependents del GSH i dona protecció davant la

degradació intracel·lular produïda per la γ -glutamylciclotransferasa.

IMPORTÀNCIA DEL GLUTATIÓ I EL SEU TRANSPORT HEPÀTIC

El GSH existeix en forma reduïda i oxidada (GSSG). La clau de moltes de les funcions que fa el GSH està en el grup tiol de la cisteïna. Entre aquestes funcions cal citar: 1) la desintoxicació d'electròfils inestables després de la seva transformació en tioèters; 2) l'actuació com a principal font cel·lular d'emmagatzemament de cisteïna, que serveix com a vehicle per transportar-la a altres òrgans; 3) el manteniment dels tiols proteics essencials, que prevé l'oxidació de grups -SH o reduint unions disulfur induïdes per estrès oxidatiu; 4) la reducció tant de peròxids d'hidrogen com de peròxids orgànics en una reacció catalitzada per la GSH peroxidasa (GSHPx); atès que tota cèl·lula aeròbica produeix peròxid d'hidrogen d'una manera

fisiològica, el GSH és essencial per a la viabilitat cel·lular; 5) la conjugació amb compostos endògens formant adductes com a intermediaris en el metabolisme de prostaglandines, leucotriens i diverses hormones; 6) la reducció de ribonucleòtids a desoxiribonucleòtids; 7) la modulació de processos relacionats amb els microtúbuls. Aquestes funcions són algunes de les descrites fins avui, i són essencials per a un funcionament normal de la cèl·lula.

Una característica fonamental de la regulació del GSH és el seu metabolisme interorgànic. En aquest sentit, el GSH es considera com un magatzem intracel·lular de cisteïna, un aminoàcid tòxic a causa de la ràpida autooxidació del seu tiol inestable, en contrast amb el seu tiol estable. La cisteïna en forma de GSH és recuperada extracel·lularment, en un procés que s'inicia per la hidròlisi del GSH per la γ -GT, seguit del transport del dipèptid cisteïnilglicina a l'interior cel·lular. Per tant, el destí de la cisteïna està lligat a la presència d'enzims que poden alliberar-la a partir del GSH. El GSH se sintetitza en totes les cèl·lules de mamífers, però els principals òrgans que regulen el GSH i la cisteïna són el fetge, el pulmó i el ronyó. El fetge transporta GSH al plasma i a la bilis, mentre que el ronyó l'allibera als túbuls. Atès que la ruptura de l'enllaç γ -glutamí per la γ -GT és sempre el primer pas en la ruptura del GSH, només cèl·lules amb γ -GT i dipeptidasa a la superfície externa poden iniciar el metabolisme del GSH plasmàtic (Fernández-Checa *et al.*, 1993). El GSH alliberat des de l'hepatòcit pot ser hidrolitzat en els seus aminoàcids constituents i posteriorment reutilitzat pel mateix òrgan (homeòstasi intraorgànica), o pot ser transferit per via del plasma a altres òrgans distals capaços de metabolitzar-lo (homeòstasi interorgànica). Perquè aquest procés tingui una clara significació, cal una força conductora que permeti un transport concentrador

del medi extracel·lular (μ M) a l'interior cel·lular (mM), que venci el gradient electroquímic. Un transport de GSH dependent de sodi ha estat descrit en enteròcits, cèl·lules renals, cèl·lules alveolars tipus II i vesícules de membranes derivades d'aquestes cèl·lules (Lash *et al.*, 1984).

Tenint en compte el paper central del fetge en la regulació interorgànica del GSH, l'alliberament del GSH de l'hepatòcit constitueix un pas fonamental. En els últims anys s'ha acumulat una gran quantitat d'informació sobre la fisiologia cel·lular del transport hepàtic de GSH i s'ha utilitzat una varietat de models experimentals, com ara fetge perfós, suspensió d'hepatòcits, cultius primaris d'hepatòcits, vesícules de membrana enriquida en el pol sinusoïdal i canalicular, i darrerament en estudis d'expressió molecular de cDNA dels transportadors hepàtics de GSH.

El transport de GSH en ambdós pols de l'hepatòcit es va reconèixer fa uns quinze anys (Bartoli *et al.*, 1978; Eberle *et al.*, 1981). Inicialment es va pensar en un procés de difusió. Tanmateix, estudis en vesícules de membrana van mostrar una capacitat saturable (Inoue *et al.*, 1983, 1984). Estudis posteriors en fetge perfós utilitzant diversos tractaments per variar la concentració intracel·lular de GSH van indicar que el transport sinusoïdal de GSH era saturable amb una K_m de 3-7 mK (Ookhtens *et al.*, 1985; Fernández-Checa *et al.*, 1989), sense indicació de saturabilitat en el transport canalicular de GSH fins a nivells de 12 μ mol/g de fetge (Kaplowitz *et al.*, 1983; Ookhtens *et al.*, 1991). Malgrat l'absència de saturabilitat, la secreció biliar és inhibible per certs anions orgànics i induïble per fenobarbital, cosa que suggeria la participació d'una proteïna transportadora. Estudis amb vesícules de membrana han ajudat a elucidar la discrepància que suposa la falta de saturabilitat i han indicat la presència d'un transportador de

molt baixa afinitat amb una K_m de 16 mM (Fernández-Checa *et al.*, 1992).

CARACTERITZACIÓ DEL TRANSPORT SINUSOIDAL I CANALICULAR DE GSH

Les comparacions més directes s'han dut a terme fent servir preparacions de membrana plasmàtica enriquida en el pol sinusoïdal i canalicular de l'hepatòcit. Malgrat que aquest model d'estudi és útil en la comparació de característiques de transport, la seva interpretació està limitada per dos inconvenients principals, com són la possible contaminació d'altres estructures subcel·lulars i l'orientació de les vesícules de membrana (*inside-out* i *right-side out*). Les troballes d'aquests estudis s'han de confirmar en altres models de més integritat funcional i fisiològica. La taula I resumeix les característiques dels dos sistemes de transport. El transport en ambdós dominis de la membrana és més fàcil amb cinètica de saturació i amb característiques de transestimulació. Aquesta característica indica que el transport de GSH és simètric i és capaç d'operar en ambdues direccions depenent del gradi-

ent de GSH a través de la membrana. Tanmateix, atès que la concentració intracel·lular de GSH és superior a la del GSH plasmàtic, en condicions fisiològiques, el transport de GSH opera en el sentit d'alliberament des de l'interior de l'hepatòcit. El potencial elèctric de membrana (despolarització) augmenta el transport de GSH, la qual cosa suggereix que el GSH és transportat amb càrrega negativa (Fernández-Checa *et al.*, 1988; 1992; 1993a; García-Ruiz *et al.*, 1992). Estudis cinètics revelen una diferència molt significativa de K_m de més de dues vegades entre el transport sinusoïdal i canalicular en el rang de concentració fisiològica de GSH.

En condicions normals, el transportador sinusoïdal funciona al màxim de la seva capacitat a causa del fet que la concentració fisiològica de GSH supera la K_m cap al GSH. Per tant, canvis en el transport de GSH i la regulació extrahepàtica de GSH no estan determinats per canvis fisiològics en la concentració de GSH, sinó més aviat per canvis en la força motriu del transportador (potencial elèctric de membrana) o mitjançant fosforilació. En condicions de depleció de GSH hepàtica, el transport sinusoïdal disminueix. En canvi, el transport canalicular

TAULA I. Característiques fisiològiques del transport hepàtic de glutatió reduït.

	Sinusoïdal	Canalicular
Transestimulació	SÍ	SÍ
Dependència d'ATP	NO	NO
Dependència de potencial de membrana	SÍ	SÍ
Cisinhibició per BSP-GSH	SÍ	NO
Cisinhibició per BSP	SÍ	SÍ
Transinhibició per metionina i cistionina	SÍ	NO
Inducció per fenobarbital (V_{max})	NO	SÍ

Els paràmetres d'estudi es van determinar en preparacions de vesícules de membrana enriquida en el pol sinusoïdal i canalicular de l'hepatòcit.

opera molt per sota de la seva K_m . Per tant, hi ha una relació directa entre el GSH hepàtic i el transport biliar, de manera que les fluctuacions en la concentració intracel·lular de GSH incideixen sobre la velocitat de secreció de GSH a la bilis.

En el treball original d'Inoue *et al.* (1983, 1984) es va descriure un component d'alta afinitat tant en vesícules de membrana sinusoidal (junt amb un component de baixa afinitat) com canalicular (amb un únic component d'alta afinitat). En el nostre treball, en ambdós tipus de vesícules de membrana, hem observat un component d'alta afinitat i de baixa afinitat de manera inconsistent. Aquest fet, juntament amb les observacions d'Ishikawa *et al.* (1990), suggereix que el component d'alta afinitat es podria justificar per la unió d'alta afinitat del GSH a les glutatí S-transferases, enzims que estan presents en les preparacions de vesícules de membranes. Per això és virtualment impossible discernir si el component d'alta afinitat és el resultat del transport o la unió a les GST. Per tant, fins i tot si aquest component realment existís, la seva contribució al transport net de GSH seria negligible a causa de la seva extraordinària baixa afinitat, encara que pugui representar una ruta de transport per a altres substàncies.

Estudis de comparació de l'especificitat d'inhibició del transport sinusoidal i canalicular han establert una sensibilitat a certs anions orgànics, com ara l'adducte dinitrofenol-GSH (DNP-GSH) i la bromosulfotaleïna (BSP) lliure (Fernández Checa *et al.*, 1988; 1992; 1993a; García-Ruiz *et al.*, 1992). Tanmateix, la BSP conjugada amb el GSH (BSP-GSH) inhibeix el transport sinusoidal de GSH en fetge perfós, hepatòcits aïllats i vesícules (Oohktens *et al.*, 1988). De manera anàloga, els aminoàcids tioèters, metionina i cistationina, inhibeixen exclusivament el transport sinusoidal de GSH en vesícules de membrana mitjançant un mecanisme *trans*

(Aw *et al.*, 1984; Fernández-Checa *et al.*, 1990, 1995).

SIGNIFICAT DEL TRANSPORT HEPÀTIC DE GSH

La major part del GSH en plasma prové del transport sinusoidal de l'hepatòcit, que allibera GSH al torrent circulatori. El GSH plasmàtic posseeix una vida mitjana molt curta (1 min) i és ràpidament degradat en altres cèl·lules extrahepàtiques alliberant cisteïna, que és posteriorment utilitzada en aquestes cèl·lules de diana mitjançant el seu transport a l'interior cel·lular. Aquesta cisteïna «recuperada» mitjançant la hidròlisi del GSH és utilitzada en la síntesi de GSH. D'altra banda, com s'ha comentat, certs tipus de cèl·lules epitelials posseeixen un sistema de transport de GSH intacte acoblat al moviment de Na^+ . Tanmateix, la contribució neta d'aquest sistema d'utilització del GSH plasmàtic al manteniment de la concentració de GSH intracel·lular és controvertida.

El transport biliar del GSH és quantitativament molt important. Entre les seves funcions s'han de citar: 1) Els subministrament de GSH o els seus aminoàcids constituents a les cèl·lules epitelials del conducte biliar i intestí. 2) Constitueix un determinant del flux biliar independent d'àcids biliars. La concentració biliar de GSH és de l'ordre de mM, de manera que la seva secreció constitueix un component fonamental de la força osmòtica necessària per a la generació del flux biliar. 3) La ruta alternativa de transport d'anions orgànics. Uns altres anions orgànics, a banda del BSP-GSH, cisinhibeixen i trans-estimulen el transport de BSP en vesícules de membrana canalicular (Fernández-Checa *et al.*, 1993a). El transport de BSP en vesícules canaliculares en absència d'ATP augmenta en les circumstàncies següents, quan s'estableix un potencial de membrana

positiu i després del tractament amb fenobarbital; quan s'examina la competició de transport, el GSH cisinhibeix i transestimula el transport de BSP. Per tant, ambdós anions semblen compartir un transportador comú en vesícules de membrana canaliculars.

El mecanisme principal de transport d'anions orgànics és a través del sistema d'alta afinitat dependent d'ATP, que transporta anions orgànics de diversitat estructural, incloent-hi conjugats de GSH i GSSG. La concentració dels anions orgànics substrats d'aquest tipus de transportador és molt baixa en hepatòcits a causa de l'acció del seu transport actiu, de manera que la cis-inhibició de la secreció de GSH s'observa només quan aquests anions orgànics s'acumulen a la cèl·lula (quan es produeix una infusió d'anions orgànics o quan es produeix una mutació en el transportador dependent d'ATP). Per tant, dos transportadors operen en paral·lel: el transportador multiespecífic de baixa afinitat, la funció primordial del qual és la de secretar GSH, i el transportador dependent d'ATP que secreta anions orgànics a la bilis. Si la concentració d'anions orgànics a la bilis supera cert nivell, podrien interaccionar amb el transportador de GSH trans-estimulant la secreció de GSH. L'anió orgànic transportat en intercanvi per GSH seria secretat de nou pel transportador dependent d'ATP. Aquest model d'acció permetria explicar la quasi falta de GSH en bilis de rates amb una mutació en el transportador canalicular d'alta afinitat dependent d'ATP (EHBR), com a conseqüència de l'acumulació intracel·lular de substrats que normalment serien secretats per aquesta ruta podrien competir pel GSH en el seu transport biliar. A més, això estableix un transport actiu secundari de GSH, cosa que explicaria el fet que la concentració de GSH a la bilis sigui tan elevada en comparació amb la seva concentració intracel·lular.

CLONATGE DEL TRANSPORTADOR SINUSOÏDAL I CANALICULAR DE GSH

Recentment hem descrit l'expressió funcional del transport bidireccional de GSH en oòcits de *Xenopus laevis* després de la microinjecció de mRNA total de fetge de rata (Fernández-Checa *et al.*, 1993b). Un fraccionament de l'mRNA dóna com a resultat la identificació de dues espècies individuals que expressen activitat de transport de GSH quan s'injecten en oòcits. D'aquestes espècies, una fracció de 2,0-2,5 kb expressa un transport sensible a inhibició per BSP-GSH, metionina i cistationina (Fernández-Checa *et al.*, 1993b; 1995), compatible amb l'expressió del transportador sinusoidal, i una altra, de 3,5-4,0 kb, insensible a inhibició per aquests agents, compatible amb l'expressió del transportador canalicular de GSH.

A partir dels cDNA preparats de les corresponents fraccions de mRNA de fetge de rata descrites anteriorment, es van obtenir dos clons individuals després de múltiples subdivisions de les colònies (Yi *et al.*, 1994; 1995). En cada subdivisió es va preparar i microinjectar cRNA sintetitzat a partir del cDNA de les colònies en els oòcits per examinar el transport de GSH, tant en modalitat d'efluxió de GSH com d'entrada de GSH cap a l'oòcit. Els clons aïllats d'aquesta manera, anomenats RsGshT i RcGshT, retenen les mateixes propietats de sensibilitat i insensibilitat a la inhibició mitjançant BSP-GSH, metionina i cistationina, respectivament. La magnitud de l'expressió depèn de la quantitat de cRNA injectada a l'oòcit per a ambdós clons. Si això s'expressa segons la quantitat de RNA en nanograms, s'obté un enriquiment d'expressió d'ambdós clons respecte a l'mRNA total d'alguns centenars de vegades (Yi *et al.*, 1994; 1995).

La taula II resumeix les característiques dels clons del transportador sinusoidal i

canalicular. No hi ha homologies en les seqüències entre els dos transportadors ni amb cap altre descrit fins avui. Una anàlisi d'hidrofobicitat (Kyte-Doolittle) va revelar la presència d'almenys 10 i 4 dominis de transmembrana per als clons RcGshT i RsGshT, respectivament. Com s'ha dit abans, el tractament amb fenobarbital indueix selectivament la secreció de GSH a la bilis i no al torrent circulatori, fenomen confirmat utilitzant vesícules enriquides en el pol sinusoïdal i canalicular, on el fenobarbital incrementa significativament la $V_{\text{màx}}$ de transport canalicular de GSH (taula I). Per tant, aquesta inducció selectiva per fenobarbital constitueix un altre criteri addicional diferenciador d'ambdós transportadors. L'mRNA de fetge de rata obtingut després d'un tractament *in vivo* amb fenobarbital i hibridat amb els oligonucleòtids d'ambdós transportadors estableix un augment de 3-5 vegades de RcGshT sense cap efecte per a l'RsGshT. Anàlisis de *Northern blot* per a ambdós transportadors revelen una localització desigual en els diversos teixits examinats. Així, mentre que l'mRNA de RsGshT es localitza exclusivament al fetge, tant de rata com en línia cel·lular humana HepG2, el de l'RcGshT es troba en pràcticament tots els teixits examinats fins ara, incloent-hi el de ronyó, el de

cervell, el d'intestí i el de pulmó (Yi *et al.*, 1994; 1995). La hibridació obtinguda amb ambdós oligonucleòtids és de 2,8 i 4,0 kb per a l'RsGshT i l'RcGshT, respectivament.

L'absència d'homologia en la seqüència entre ambdós transportadors descarta la possibilitat que siguin el resultat d'un únic gen sotmès a un procés alternatiu o les conseqüències de modificacions posteriors a la traducció. La seqüència de RsGshT en determinaria l'expressió específica al fetge, la qual cosa seria compatible amb el fet que el fetge sigui el principal subministrador de GSH al torrent circulatori per a la seva disposició metabòlica en altres cèl·lules distals extrahepàtiques. En vista de la importància que aquest transportador (RsGshT) té en la regulació de GSH, l'estudi del seu paper en certes situacions fisiopatològiques seria fonamental veient les múltiples funcions cel·lulars que el GSH exerceix. En situacions d'infecció vírica, tant en hepatopaties per virus C com en la síndrome d'immunodeficiència adquirida, es produeix una depleció del GSH plasmàtic. És d'un gran interès determinar l'expressió d'aquest transportador en aquestes situacions, ja que la seva expressió deficient contribuiria als profunds efectes sistèmics que s'observen en aquestes situacions com una alteració del sistema

TAULA II. Comparació de les característiques del transportador sinusoïdal (RsGshT) i canalicular (RcGshT) de glutatió reduït.

Característiques	Clon	
	RsGshT	RcGshT
Mida (kb)	2,8	4,0
Regió codificadora	1,0	2,5
Massa previsible	39,9	95,8
Aminoàcids	353	835
K_m per a GSH (mM)	2,8	6,6
Inhibició:		
Metionina	+	—
Cistationina	+	—
BSP-GSH	+	—
Inducció per fenobarbital	—	+

immune i del cervell, observats en pacients amb HIV. D'altra banda, una sobreexpressió del transportador sinusoidal seria la responsable del major subministrament de GSH al plasma, com s'ha observat en condicions d'estrès i endotoxèmia i xoc sèptic (Jaeske, 1992), que augmenta l'aportació de defenses antioxidants al plasma i altres cèl·lules extrahepàtiques per compensar l'ambient de prooxidació observat en aquestes situacions.

El transportador canalicular es localitza al ronyó (Yi *et al.*, 1994) i contribueix a la secreció apical del GSH de les cèl·lules epitelials del túbul renal, la qual cosa constitueix un element fonamental del cicle del γ -glutamil en el ronyó. Se sap molt poc sobre el transport apical en l'epiteli intestinal o en el pulmó. Tanmateix, en el cas del pulmó és interessant el fet que la concentració de GSH en el fluid alveolar sigui molt elevada (mM) (Cantin *et al.*, 1987). Així mateix, és d'un gran interès la presència de mRNA de l'RcGshT al cervell, encara que la seva funció és desconeguda. No obstant això, encara que s'ha detectat transport de GSH a través de la barrera encefalopoiètica, s'ha observat que els astròcits transporten GSH (Yudkoff *et al.*, 1991).

GLUTATIÓ MITOCONDRIAL: IMPORTÀNCIA I TRANSPORT

El GSH intracel·lular existeix compartimentat en el citosol i en un *pool* intraorganel·lar. Edwards i Westerfeld (1952) van mostrar per primera vegada l'existència de més d'un *pool* de GSH al fetge, i basant-se en observacions dels efectes nutricionals sobre el GSH hepàtic, van proposar l'existència d'un *pool* estable i d'un altre de metabolitzable. Vignais i Vignais (1974) i Jocelyn *et al.* (1975) van fer estudis per identificar el *pool* de GSH compartimentat, i van observar que

alguns mitocondris aïllats de fetge de rata contenen una petita fracció de tiol no proteic, constituït fonamentalment per GSH. La idea que el GSH mitocondrial és diferent del citoplasmàtic prové d'estudis sobre el temps de renovació del GSH cel·lular. La capacitat que diferents agents tenen per disminuir o augmentar selectivament els nivells de GSH al mitocondri, en comparació amb el citosol, suggereix que el *pool* de GSH mitocondrial està físicament i metabòlicament separat del citosòlic.

Importància i fisiologia

El *pool* de GSH mitocondrial, que representa d'un 10 a un 15 % del contingut total intracel·lular, es troba en una concentració similar a la del citosol, de 5 a 9 mM. El GSH mitocondrial participa en un cicle REDOX a través de les activitats GSH peroxidasa/reductasa. El GSH mitocondrial podria ser fonamental en la reducció d'hidroperòxids endògens per la GSH peroxidasa. Com a conseqüència del metabolisme aeròbic, que en cèl·lules eucariotes té lloc fonamentalment en el mitocondri, es produeix un estrès oxidatiu endogen. Fins i tot en condicions fisiològiques, la reducció d'oxigen molecular a aigua en la cadena respiratòria és incompleta i dóna lloc a la formació d'espècies tòxiques d'oxigen. Se sap que el mitocondri de fetge de rata perfoés produeix al voltant de 50 nmol de H_2O_2 /min/g, la qual cosa representa un 2-4 % del consum d'oxigen mitocondrial. Si el peròxid d'hidrogen no es redueix a aigua pot donar lloc a la formació del radical hidroxil, espècie molt reactiva, que comportaria la formació de peròxids lipídics que podrien lesionar les membranes mitocondrials i les seves funcions (Figures 1 i 2). Atès que el mitocondri no té catalasa, la desintoxicació d'hidroperòxids, formats tant sota condicions fisiològiques o com a conse-

qüència de reaccions de bioeducció, en què les drogues s'activen a un derivat inestable, depèn exclusivament de la GSH peroxidasa (Figura 2). Aquest enzim utilitza GSH reduït, el qual és convertit en GSSG. El cicle REDOX del GSH fa servir NADPH i el potencial reductor de NADH de la matriu mitocondrial, per proveir GSH reciclat, gràcies a la reducció de GSSG, reacció catalitzada per la GSSG-reductasa. El paper del cicle REDOX de GSH mitocondrial al fetge és el de regular l'oxidació mitocondrial. Se sap que en mitocondris aïllats, diferents oxidants disminueixen la captació d'oxigen molecular i produeixen un temps de renovació

de GSH complet cada deu minuts. El consum continu d'equivalents reductors pel sistema de GSH s'ha d'equilibrar mitjançant la formació contínua de NADPH en el mitocondri. En condicions de màxim estrès oxidatiu el conjunt cel·lular NADPH/NADP⁺ s'activa almenys un cop per minut.

El GSH mitocondrial té també un paper fonamental mantenint la viabilitat cel·lular, mitjançant la regulació de la permeabilitat de la membrana interna, i mantenint els grups sulfhidrils en estat reduït (Fernández-Checa *et al.*, 1993c). Si aquest sistema es compromet, es produiria una alteració de l'homeòstasi del calci cel·lular, un primer

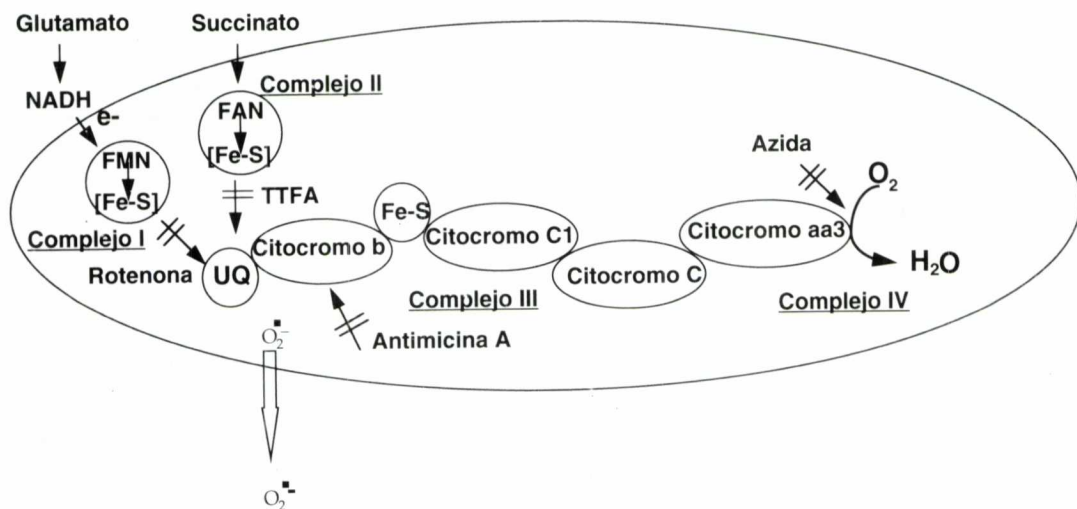


FIGURA 1. Transport electrònic mitocondrial. Una de les principals funcions del mitocondri és la de suplir l'energia cel·lular en forma d'ATP necessària per a multitud de funcions. Per això, l'energia requerida per a la síntesi d'ATP es genera gràcies al transport electrònic, en què l'oxigen molecular és l'últim acceptor dels electrons i es redueix a aigua. La major part de l'oxigen es consumeix en el segment de la citocrom C oxidasa. En aquest procés l'oxigen està unit al grup hemo del citocrom *a3* i els quatre electrons són transferits a l'oxigen sense formació d'espècies intermèdies, i. e., aigua peroxidada o anió superòxid. Altres components de la cadena respiratòria, especialment la ubiquinona del complex III, transfereixen electrons directament a l'oxigen i donen lloc a la formació de l'anió superòxid (per a més detalls, vegeu la figura 3). La rotenona i TTFA inhibeixen el transport d'electrons des del complex I i II respectivament, a la ubiquinona. La transferència de la ubiquinona al citocrom *b-c1* és inhibida per l'antimicina A.

pas en la lesió cel·lular, ja que el mitocondri pot segrestar grans quantitats de calci (Bellomo *et al.*, 1985; DiMonte *et al.* 1984; Moore *et al.*, 1985). L'oxidació de GSH i de nucleòtids de piridina en mitocondris precedeix un increment en la permeabilitat de calci en la membrana interna. Això suggereix que l'estrès oxidatiu o la depleció aguda de GSH afecten l'estat REDOX en el mitocondri. La inactivació de proteïnes a causa de l'oxidació del grup tiol de la cisteïna és un fenomen general que té lloc en un ampli nombre d'enzims. Es pensa que l'homeòstasi del calci i del tiol està interrelacionada, o bé directament, o bé a través de nucleòtids

de piridina. Malgrat que la regulació mitocondrial de calci citosòlic no es produeix fisiològicament, en condicions patològiques el mitocondri es converteix en un potent regulador de les concentracions de calci citosòlic. Diversos grups han mostrat una correlació entre la disminució de GSH mitocondrial i la incapacitat del mitocondri de segrestar calci (Beatrice *et al.*, 1984; Massini *et al.*, 1986). Així mateix, s'ha descrit que el paracetamol disminueix els nivells de GSH mitocondrial més específicament que el seu regioisòmer, 3'-hidroxiacetanilida, cosa que es relaciona amb la formació d'adductes proteics en el mitocondri i amb l'alteració de

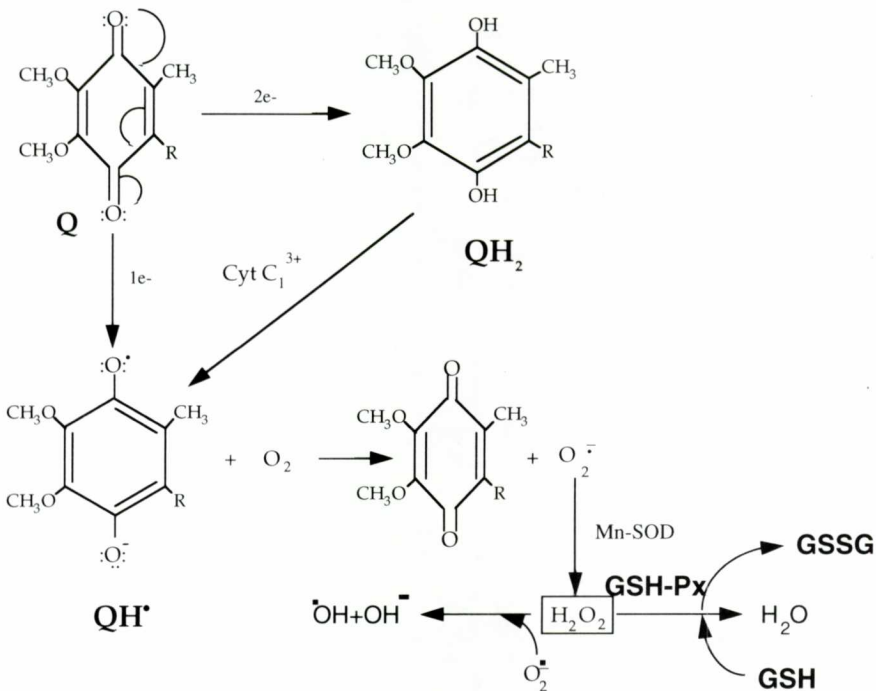


FIGURA 2. Producció de superòxid per la ubiquinona. La ubiquinona (Q) és un dels components del complex III. La major part de la Q experimenta una reducció a ubiquinol (QH₂) mitjançant la transferència de dos electrons. Malgrat això, l'autooxidació de la semiquinona (QH) està acompanyada d'una producció d'anió superòxid, deguda a la transferència d'un electró de QH a l'oxigen molecular. L'anió superòxid espontàniament o mitjançant l'acció de la Mn-SOD es converteix en peròxid d'hidrogen. Aquest, si no es redueix a aigua, es convertiria en el potent radical hidroxil, en una reacció de Haber-Weiss-Fenton catalitzada per metalls de transició. Aquest radical hidroxil podria comprometre l'estructura i la funció de proteïnes, carbohidrats i DNA mitocondrial. Afortunadament, el mitocondri elimina l'aigua peroxidada gràcies a la participació de la GSH peroxidasa i la GSA. De fet, aquesta és l'única via de defensa del mitocondri contra l'aigua peroxidada i altres peròxids orgànics, ja que el mitocondri no té catalasa i la GSH peroxidasa presenta una baixa K_m per a l'aigua peroxidada.

l'homeòstasi del calci cel·lular i repercuteix en la inhibició de la bomba de calci de la membrana plasmàtica. Les alteracions del cicle del calci en la membrana interna del mitocondri poden ser un factor molt crític en la regulació de la concentració de calci citosòlic, i per consegüent en la inducció de la lesió cel·lular. Així, el roig de ruteni—inhibidor del sistema uniport del calci mitocondrial— prevé en determinades condicions l'estrès oxidatiu i la lesió cel·lular que hi va associada.

Un dels papers protectors del GSH mitocondrial pel que fa a de la citotoxicitat s'ha posat de manifest en estudis sobre hepatòcits aïllats, on la lesió desencadenada per àcid etacrínic es relaciona amb una disminució dels nivells de GSH mitocondrial, mentre que la disminució del nivell de GSH citosòlic no afecta la viabilitat cel·lular. D'altra banda, l'estrès oxidatiu induït per hidroperòxid-*tert*-butil produeix una acumulació en el

mitocondri de GSSG, a causa de la seva incapacitat per transportar-lo, cosa que provoca una disminució del control respiratori. La deficiència en el transport de GSSG indica que el mitocondri podria ser més susceptible a l'oxidació de tiols proteics que la resta de la cèl·lula.

Transport mitocondrial de GSH

Com s'ha dit anteriorment, el GSH mitocondrial té un paper fonamental en la regulació d'importantes funcions que garanteixen el funcionament de la fosforilació oxidativa necessària per a la síntesi d'ATP utilitzat en múltiples funcions cel·lulars. Diversos estudis han mostrat en alguns tipus de cèl·lules i òrgans que la depleció del GSH mitocondrial acaba en disfunció i mort cel·lular, que es prevé fent servir derivats del GSH més permeables (Martensson *et al.*, 1989a, b;

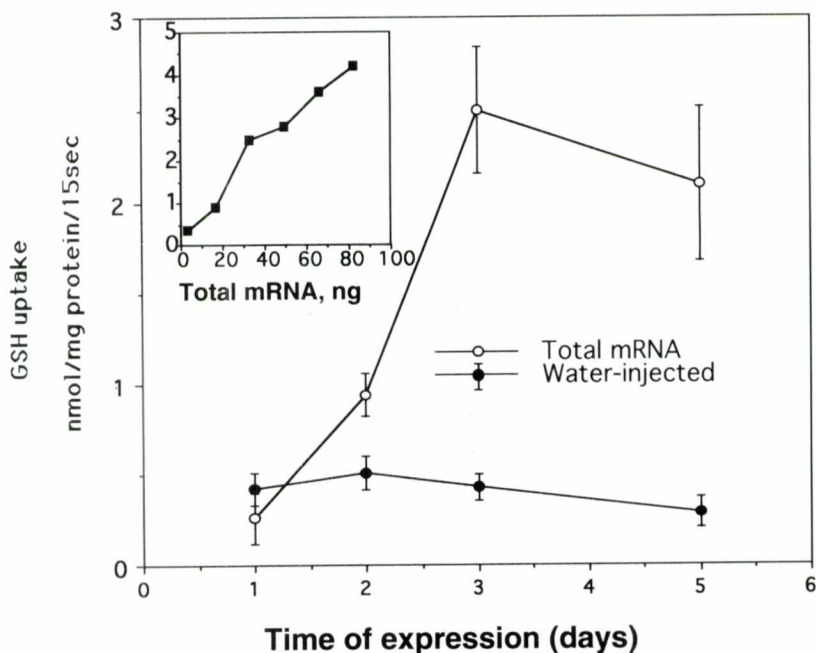


FIGURA 3. Dependència de l'expressió del transport mitocondrial de GSH amb el temps de cultiu d'òcits i la quantitat de mRNA de fetge microinjectat en òcits.

Fernández-Checa *et al.*, 1991; Meredith *et al.*, 1988; García-Ruiz *et al.*, 1994, 1995). Malgrat l'alta concentració de GSH en la matriu mitocondrial, el mitocondri no sintetitza GSH de nou, per la qual cosa el GSH mitocondrial procedeix de l'operació d'un sistema de transport (RmGshT), que transporta GSH del citosol a la matriu (Griffith *et al.*, 1985; Martensson *et al.*, 1990; Kurosawa *et al.*, 1991; Fernández-Checa *et al.*, 1991). Tanmateix, malgrat la important funció que té aquest transportador, se sap molt poca cosa sobre les seves propietats. Recentment hem expressat el transportador mitocondrial de GSH de fetge de rata en mitocondris d'òcits *Xenopus laevis*, en una estratègia similar a la utilitzada en l'expressió dels transportadors plasmàtics de GSH (RsGshT i RcGshT) (García-Ruiz *et al.*, 1995).

Els òcits de *Xenopus* contenen una densitat de mitocondris molt elevada. No obstant això, l'aïllament de la fracció mitocon-

drial requereix l'ús de gradient continu de sacarosa per a l'eliminació de la clara i de la proteïna pigmentària de l'hemisferi animal. El nivell de GSH mitocondrial en òcits controls és de l'ordre de 6-8 menor que el trobat en mitocondris d'hepatòcits de rata, amb un nivell de GSH citosòlic d'11-13 nmol/8 òcits (Fernández-Checa *et al.*, 1993b; García-Ruiz *et al.*, 1995). Aquests valors de GSH en ambdós compartiments subcel·lulars són molt similars entre òcits microinjectats amb aigua o mRNA de fetge. Per això és necessària la microinjecció d'òcits amb GSH per proveir substrat necessari per expressar l'activitat del transportador mitocondrial. Per tant, el mitocondri d'òcits injectats amb GSH dues hores abans del seu aïllament després de tres dies de la microinjecció de mRNA de fetge de rata posseeix uns nivells de GSH de 3-4 vegades més que el mitocondri d'òcits injectats amb mRNA, però no amb GSH. El transport mitocondrial de GSH

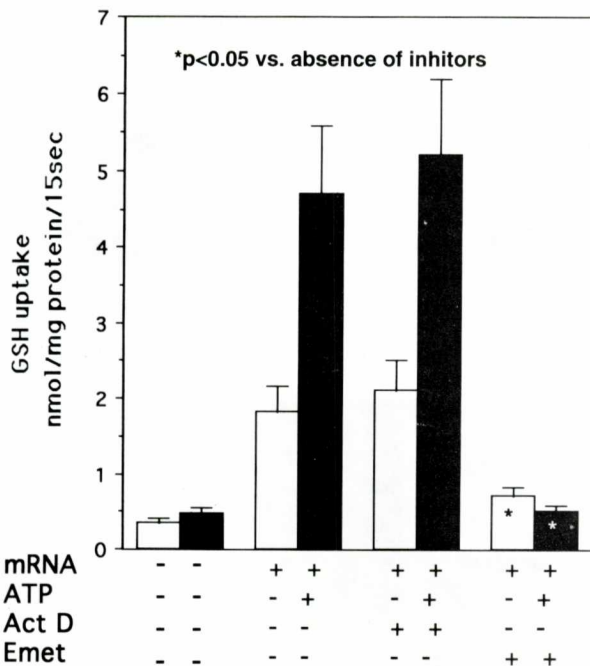


FIGURA 4. Efecte d'emetina i actinomicina D sobre el transport mitocondrial de GSH expressat en òcits de *Xenopus laevis*.

reté unes característiques similars a les observades en mitocondris de fetge de rata, com l'estimulació per la hidròlisi d'ATP. Aquesta característica de transport és única per a aquest sistema de transport, atès que els altres transportadors, RsGshT i RcGshT, són insensibles a la hidròlisi d'ATP.

L'increment de la quantitat de mRNA de fetge injectat en oòcits contribueix a l'expressió proporcional de la capacitat de transport de GSH als mitocondris (Figura 3). L'expressió requereix d'un període de 3-5 dies d'incubació d'oòcits microinjectats amb mRNA per a la manifestació de l'expressió. Aquesta expressió del GSH mitocondrial en oòcits de *Xenopus* després de la microinjecció de mRNA de fetge és el resultat del processament i la traducció de l'mRNA de fetge injectat en comptes de la conseqüència de l'activació d'un gen endogen de l'oòcit activat després de la seva manipulació genètica,

atès que aquesta activitat és inhibida pel pretractament d'oòcits amb emetina (inhibidor selectiu del procés de traducció citoplàsmica) i insensible al tractament amb actinomicina D (Figura 4). Estudis de la caracterització funcional del transport expressat en oòcits en relació amb les característiques conegudes dels altres transportadors de membrana de GSH van revelar una insensibilitat a competició *cis* per inhibidors de RsGshT i RcGshT, mentre que compostos que no afecten aquests transportadors inhibeixen el transport de GSH mitocondrial en oòcits (Figura 5). El transport endogen de GSH en mitocondris d'oòcits injectats amb aigua (controls) és insensible a la presència d'ATP i a la inhibició per glutamat, cosa que indicaria que aquesta contribució al transport mitocondrial de GSH expressat en els oòcits no és deguda a l'expressió del transportador de GSH mitocondrial de fetge sinó

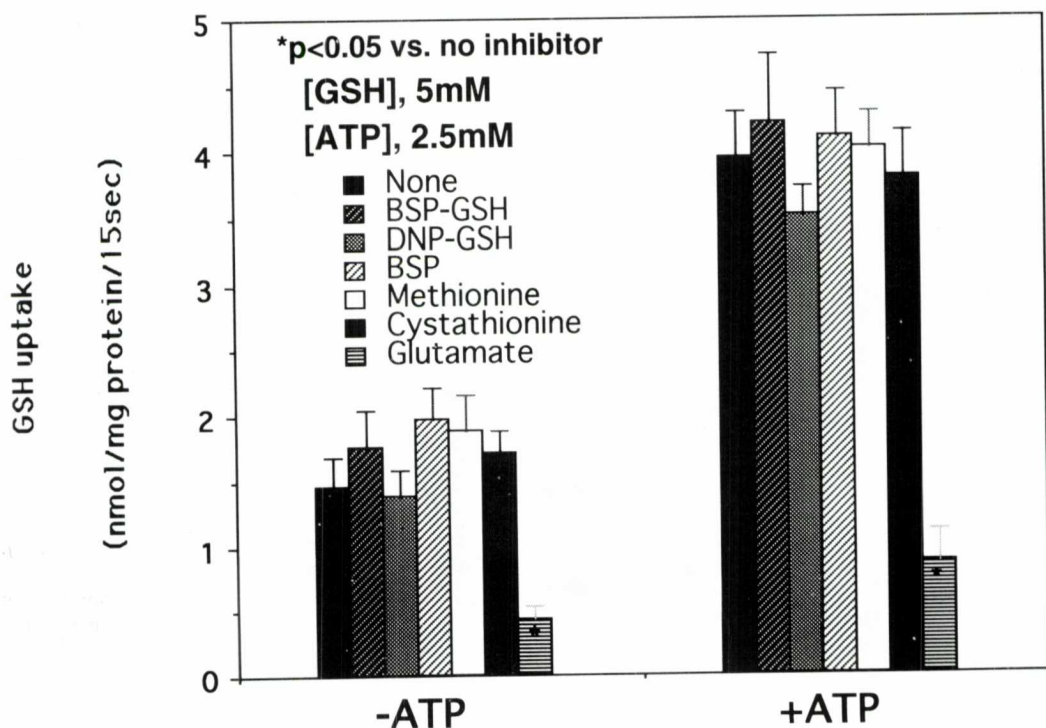


FIGURA 5. Característiques de l'expressió del transport de GSH en mitocondris d'oòcits microinjectats amb mRNA de fetge.

a una ruta alternativa de transport diferent, o la conseqüència d'un fenomen d'unió inespecífica de GSH a la membrana mitocondrial, ja que aquest transport endogen és similar a 37 i 4 °C.

L'mRNA total del fetge va ser fraccionat després de centrifugar-lo en gradient de sacarosa. D'aquestes espècies de mida diferent, només una va expressar activitat de transport de GSH en mitocondris d'òcits. Aquesta fracció de 3,0-3,5 kb conserva unes característiques de transport similars a les observades en mitocondris d'òcits injectats amb mRNA total de fetge: estimulació per ATP, inhibició per glutamat i insensibilitat a inhibidors com ara DNP-GSH, BSP-GSH, BSP, GSSG, metionina i cistationina. Considerant la diferència en la quantitat de mRNA injectat en òcits (33 ng de mRNA total enfront de 3-5 ng de la fracció de mida 3,0-3,5 kb), s'observa un increment d'activitat de 2-3 vegades en la capacitat de transport de GSH mitocondrial en òcits injectats amb la fracció de mRNA, que correspon a un enriquiment respecte a la quantitat de mRNA injectat de 20-30 vegades. Finalment, òcits injectats amb la fracció de mRNA que expressa transport mitocondrial no es tradueix en expressió de transport de GSH en òcits intactes, ni mitocondris d'òcits microinjectats amb RsGshT o RcGshT mostren capacitat de transport de GSH, la qual cosa suggereix que el transportador mitocondrial de GSH en fetge és un gen diferent als altres dos transportadors de membrana. Aquests estudis constitueixen el fonament per al clonatge d'aquest transportador mitocondrial de GSH, essencial per a la regulació de múltiples funcions mitocondrials i cel·lulars.

BIBLIOGRAFIA

- AW, T. Y.; M. OOKHTENS; N. KAPLOWITZ (1984). «Inhibition of GSH efflux from isolated hepatocytes by methionine». *J. Biol. Chem.*, núm. 259, pàg. 9355-9358.
- BARTOLI, G. M.; H. SIES (1978). «Reduced and oxidized efflux from rat liver». *FEBS lett.*, núm. 86, pàg. 89-91.
- BEATRICE, M. C.; D. L. STIERS; B. R. PFEIFFER (1984). «The role of glutathione in the retention of Ca²⁺ by liver mitochondria». *J. Biol. Chem.*, núm. 259, pàg. 1279-1287.
- BELLOMO, G.; S. ORRENIUS (1985). «Altered thiol and calcium homeostasis oxidative hepatocellular injury». *Hepatology*, núm. 5, pàg. 876-882.
- CANTIN, A. M.; S. L. NORTH; R. HUBBARD; R. G. CRYSTAL (1987). «Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione». *J. Appl. Physiol.*, núm. 63, pàg. 152-157.
- DI MONTE, D.; G. BELLOMO; H. THOR; P. NICOTERA; S. ORRENIUS (1984). «Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein-thiol oxidation and alterations in intracellular Ca²⁺ homeostasis». *Arch. Biochem. Biophys.*, núm. 235, pàg. 343-350.
- EBERLE, D.; R. CLARKE; N. KAPLOWITZ (1981). «Rapid oxidation in vitro of glutathione in bile». *J. Biol. Chem.*, núm. 256, pàg. 2115-2117.
- EDWARDS, S.; W. W. WESTERFELD (1952). «Blood and liver glutathione during protein deprivation». *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, núm. 79, pàg. 57-59.
- FERNÁNDEZ-CHECA J. C.; C. GARCÍA-RUIZ; A. COLELL; J. R. YI; N. KAPLOWITZ (1995). «Effects of methionine and cystathionine on the sinusoidal and canalicular transport of reduced GSH». *J. Biol. Chem.* [En premsa]
- FERNÁNDEZ-CHECA J. C.; C. GARCÍA-RUIZ; M. OOKHTENS; N. KAPLOWITZ (1991). *J. Clin. Invest.*, núm. 87, pàg. 397-405.
- FERNÁNDEZ-CHECA J. C.; T. HIRANO; H. TSUKAMOTO; N. KAPLOWITZ (1993c). «Mitochondrial GSH depletion in alcoholic liver disease». *Alcohol*, núm. 10, pàg. 469-475.
- FERNÁNDEZ-CHECA J. C.; M. OOKHTENS; N. KAPLOWITZ (1989). «Effect of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione: relationship of cytosolic GSH to efflux and mitochondrial sequestration». *J. Clin. Invest.*, núm. 83, pàg. 1247-1252.
- (1990). «Effect of GSH synthesis on the inhibition of GSH efflux by methionine: studies in isolated hepatocytes and perfused rat liver». *Am. J. Physiol.*, núm. 258, pàg. G967-G973.
- (1993a). «Selective induction by phenobarbital of the electrogenic transport of GSH and organic

- anions in rat liver canalicular membrane vesicles». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 10836-10841.
- FERNÁNDEZ-CHECA J. C.; C. REN; T. Y. AW; M. OOKHTENS; N. KAPLOWITZ (1988) «Effect of membrane potential and cellular ATP on GSH efflux from isolated rat hepatocytes». *Am. J. Physiol.*, núm. 256, pàg. G403-G408.
- FERNÁNDEZ-CHECA, J. C.; H. TAKIKAWA; M. OOKHTENS; H. OHRIE; N. KAPLOWITZ (1992). «Canalicular transport of GSH in normal and mutant EHBR rats». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 1667-1673.
- FERNÁNDEZ-CHECA, J. C.; J. R. YI; C. GARCIA-RUIZ; Z. KNEZIC; S. TAHARA; N. KAPLOWITZ (1993b). «Expression of rat liver GSH transport in *Xenopus Laevis* oocytes». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 2324-2328.
- GARCÍA-RUIZ, C.; J. C. FERNÁNDEZ-CHECA; N. KAPLOWITZ (1992). «Bidirectional mechanism of plasma membrane transport of reduced GSH in hepatocytes and membrane vesicles». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 22256-22264.
- GARCÍA-RUIZ, C.; A. MORALES; A. BALLESTA; J. RODES; N. KAPLOWITZ; J. C. FERNÁNDEZ-CHECA (1994). *J. Clin. Invest.*, núm. 94, pàg. 193-201.
- GARCÍA-RUIZ, C.; A. MORALES; A. COLELL; A. BALLESTA; J. RODES; N. KAPLOWITZ; J. C. FERNÁNDEZ-CHECA (1995). *Hepatology*, núm. 21, pàg. 207-214.
- GARCÍA-RUIZ, C.; A. MORALES; A. COLELL; J. RODES; J.-R. YI; N. KAPLOWITZ; J. C. FERNÁNDEZ-CHECA (1995). «Evidence that the rat hepatic mitochondrial carrier is distinct from the sinusoidal and canalicular transporters for reduced glutathione: expression studies in *Xenopus Laevis* oocytes». *J. Biol. Chem.* [En premsa]
- GRIFFITH, O. W.; A. MEISTER (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 82, pàg. 4668-4672.
- INOUE, M.; R. KINNE; T. TRAN; I. M. ARIAS (1983). «Glutathione transport across hepatocyte plasma membranes: analyses during isolated rat liver-canalicular membrane vesicles». *Eur. J. Biochem.*, núm. 134, pàg. 4671-471.
- INOUE, M.; R. KINNE; T. TRAN; I. M. ARIAS (1984). «Glutathione transport across hepatocyte plasma membranes: analyses during isolated rat liver-sinusoidal membrane vesicles». *Eur. J. Biochem.*, núm. 138, pàg. 491-495.
- ISHIKAWA, T.; M. MULLER; C. KLUNEMANN; T. SCHAUB; D. KEPPLER (1990). «ATP-dependent active transport of cysteinyl leukotrienes across liver canalicular membrane». *J. Biol. Chem.*, núm. 265, pàg. 19279-19286.
- JAESKE, H. (1992). «Enhanced sinusoidal GSH efflux during endotoxin-induced oxidant stress in vivo». *Am. J. Physiol.*, núm. 263, pàg. G60-G68.
- JOCELYN, P. C. (1975). «Some properties of mitochondrial glutathione». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 369, pàg. 427-436.
- KAPLOWITZ, N.; D. EBERLE; J. PETRINI; J. TOULOUKIAN; J. KUHLENKAMP (1983). «Factors influencing the efflux of GSH into bile in the rat». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, núm. 224, pàg. 141-147.
- KUROSAWA, K.; N. HAYASHI; N. SATO; T. KAMADA; N. TAGAWA (1991). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 167, pàg. 367-372.
- LASH, L. H.; D. P. JONES (1984). «Renal glutathione transport: characterization of the sodium-dependent system on the basal lateral membrane». *J. Biol. Chem.*, núm. 259, pàg. 14508-14514.
- MARTENSSON, J.; A. MEISTER (1989a). «Mitochondrial damage in muscle occurs after marked depletion of GSH and is prevented by giving GSH-ester». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 86, pàg. 471-475.
- MARTENSSON, J.; A. JAIN; W. FRAYER; A. MEISTER (1989b). «Glutathione metabolism in the lung: inhibition of its synthesis lead to lamellar body and mitochondrial defects». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 86, pàg. 5296-5300.
- MARTENSSON, J.; C. K. LAI; A. MEISTER (1990). «High affinity transport of GSH is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 87, pàg. 7185-7189.
- MASINI, A.; B. BOTTI; D. CECCARELLI; U. MUSCATELLO; V. VANNINI (1986). «Induction of calcium efflux from isolated rat-liver mitochondria by 1,2-dibromoethane». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 852, pàg. 19-24.
- MEREDITH, M.; D. J. REED (1988). «Depletion in vitro of mitochondrial GSH in rat hepatocytes and enhancement of lipid peroxidation by adriamycin and BCNU». *Biochem. Pharmacol.*, núm. 32, pàg. 1383-1388.
- MOORE, M.; H. THOR; G. MOORE; S. NELSON; P. MOLDEUS; S. ÖRRENIUS (1985). «The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinoneimine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca²⁺». *J. Biol. Chem.*, núm. 260, pàg. 13035-13040.
- OOKHTENS, M.; D. CORVASCE; K. HOBODY; T. Y. AW; N. KAPLOWITZ (1985). «Sinusoidal efflux of glutathione in the perfused rat liver». *J. Clin. Invest.*, núm. 75, pàg. 258-265.
- OOKHTENS, M.; I. LYON; J. C. FERNÁNDEZ-CHECA; N. KAPLOWITZ (1988). «Inhibition of GSH efflux in the perfused rat liver and isolated hepatocytes by organic anions and bilirubin: kinetics, sidedness and molecular forms». *J. Clin. Invest.*, núm. 82, pàg. 608-616.
- OOKHTENS, M.; T. M. MADDATU (1991). «Mechanism of change in hepatic sinusoidal and biliary glutathione efflux with age». *Am. J. Physiol.*, núm. 261, pàg. G648-G656.

- REED, D. J. (1978). «Regulation of reductive processes by glutathione». *Biochem. Pharmacol.*, núm. 35, pàg. 7-13.
- SIES, H.; K. M. MOSS (1978). «A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver». *Eur. J. Biochem.*, núm. 84, pàg. 377-382.
- VIGNAIS, P. M.; P. V. VIGNAIS (1974). «Fuscin, an inhibitor of mitochondrial SH-dependent transport-linked functions». *Biochem. Biophys. Acta*, núm. 325, pàg. 357-374.
- YI J-R.; S. LU; J. C. FERNÁNDEZ-CHECA; N. KAPLOWITZ (1994). «Expression cloning of a rat hepatic reduced glutathione transporter with canalicular characteristics». *J. Clin. Invest.*, núm. 93, pàg. 1841-1845.
- (1995). «Expression cloning of the cDNA for a polypeptide associated with rat hepatic sinusoidal reduced glutathione transport: characteristics and comparison with the canalicular transporter». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 92, pàg. 1495-1499.
- YUDKOFF, M. D.; D. PLEASURE; L. GREGAR; Z-P. LIN; I. NISSIM; J. STERN; I. NISSIM (1991). «Glutathione turnover in cultured astrocytes». *J. Neurochem.*, núm. 55, pàg. 137-145.