

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE DE FÍGADO BOVINO¹

Extraction of glutathione s-transferase from bovine liver

Maria Célia Lopes Torres², Nilda de Fátima Ferreira Soares³, José Antônio Marques Pereira³

RESUMO

Considerando a ação detoxificante da enzima Glutathione S-Transferase (GST), importante contra o estresse oxidativo, câncer e outras doenças degenerativas, com este estudo, objetivou-se avaliar a atividade dessa enzima extraída de fígado bovino e avaliar a estabilidade em condições de refrigeração (5 °C). O fígado bovino foi selecionado por ser matéria prima disponível comercialmente e de baixo custo. A extração foi realizada em quatro etapas (homogeneização/centrifugação, passagem em coluna contendo dietilaminoetilcelulose (DEAE-celulose), precipitação com sulfato de amônia e passagem em coluna contendo Carboximetilcelulose (CMC). O extrato obtido apresentou atividade com o 1 cloro 2, 4 dinitrobenzeno, na presença de glutathione reduzida. O extrato final apresentou atividade específica 5 vezes maior que o extrato bruto centrifugado e estabilidade da atividade enzimática foi mantida nas condições de 5°C, durante 70 dias.

Termos para indexação: Glutathione S-Transferase, extração, fígado bovino, atividade enzimática.

ABSTRACT

Considering the detoxication functions of Glutathione S-transferase (GST) enzyme, that is important against oxidative stress, cancer and others degenerative diseases, this study aimed to evaluate the stability and activity of Glutathione S-transferase extracted from bovine liver, which is commercially available at low cost. The extraction was done in four steps (homogenization/centrifugation, passage through column containing diethylaminoethyl-cellulose (DEAE), precipitation with ammonium sulfate and passing through column of carboxy-methyl-cellulose (CMC). The extract thus obtained showed activity with 1 chloro 2, 4 dinitrobenzene, in the presence of reduced glutation. The specific activity of the final extract was 5 times greater than the crude centrifuged extract, and was stable for 70 days when stored at 5 °C.

Index terms: Glutathione S-transferase, extraction, bovine liver, enzyme activity.

(Recebido para publicação em 14 de janeiro de 2004 e aprovado em 22 de março de 2005)

INTRODUÇÃO

A Glutathione S-Transferase (GST) é o principal grupo de proteínas solúveis do fígado, envolvidas na detoxificação celular de compostos eletrofilicos, geradas intracelularmente ou encontradas na forma de xenobióticos. Essas proteínas são encontradas em diferentes formas, chamadas de isoenzimas (HAYES & PULFORD, 1995; WINDERSTEN & MANNERVIK, 1995). Sua ação detoxificante é importante na proteção contra estresse oxidativo, câncer e outras doenças degenerativas, incluindo aquelas associadas com o envelhecimento (BABBITT, 2000).

Os xenobióticos, à semelhança do que acontece com as substâncias endógenas, são conjugados com diversas substâncias. Entre as reações importantes, tem-se a sulfatação, a acetilação, a metilação, além de conjugações com a glutathione (GSH) e com aminoácidos.

A conjugação de agentes tóxicos com o tripeptídeo GSH é catalisada, na sua fase inicial, pela GST que atua na fase II da biotransformação, prevenindo danos à membrana celular e outras macromoléculas (DYBING et al., 2002; MALMEZAT et al., 2000). Hayes et al. (2005) mencionam que as GSTs do citoplasma dos mamíferos são todas diméricas com subunidades de 199-244 aminoácidos. Baseado na semelhança da cadeia de aminoácidos, sete classes de GST citosólicas são reconhecidas e denominadas Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega e Zeta. Habig & Jakoby (1981) purificaram GST de fígado de rato usando coluna carboximetil celulose (CMC) e embora, as quatro enzimas purificadas apresentassem reatividade com os substratos específicos, todas formas ativas, em diferente graus, na conjugação da glutathione com o composto 1 cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB). Chico & Listowsky (2005) citam o fígado de rato como o órgão que encerra maior a

¹Parte da dissertação de doutorado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Viçosa/UFV – Campus Universitário – 36.570-000 – Viçosa, MG.

²Professora da Universidade Federal de Goiás/UFG – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos – Cx. P.131 – 74.001-970 – Goiânia, Goiás – cellialopes@agro.ufg.br

³Professores da Universidade Federal de Viçosa/UFV – Departamento de Tecnologia de Alimentos – 36.570-000 – Viçosa, MG.

concentração desse tipo de enzimas, por ser o local onde grande número de substâncias é metabolizado. Outros órgãos, como intestino, rins, bexiga, cérebro, têm também participação significativa.

Diversas frações das células hepáticas são obtidas quando o fígado é removido e submetido à homogeneização, seguida de centrifugações sucessivas a velocidades crescentes. Três grandes famílias de proteína que são amplamente distribuídas na natureza exibem atividade glutatona transferase. Duas delas, a mitocondrial e as citosólicas, são compostas por enzimas solúveis que apresentam similaridade na estrutura tridimensional. A terceira família denominada GST microsomal é composta por proteínas associadas a membranas e participam do metabolismo dos eicosanoides e da glutatona e não apresenta similaridade estrutural com as duas outras famílias citadas. No entanto, todas as três famílias apresentam ação catalisadora na conjugação do 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (HAYES et al., 2005). As atividades citosólicas são 5 a 40 vezes maiores do que as mitocondriais (OGA, 1996; PETERS & ROELOFS, 1997). As GSTs citosólicas representam a maior família das transferases e têm atividades que são únicas nesse grupo de enzimas. Elas catalisam a reação de tiol do 4-acetato nitrofenol; apresentam atividade de tiol transferase; promovem redução do trinitroglicerina, do ácido dehidroascórbico e do ácido monometilarsonico; e catalisam a isomerização do maleilacetoacetato e Δ^5 -3-cetoesteróide (HAYES et al., 2005).

Para avaliar a atividade da GST em diferentes tecidos, o 1 cloro 2-4 dinitrobenzeno (CDNB) tem sido considerado como o substrato para todas as suas isoenzimas, embora diferenças significativas nas atividades específicas tenham sido mostradas (WARHOLM et al., 1986). Considerando a ação detoxificante da enzima Glutathione S-Transferase (GST), importante contra o estresse oxidativo, câncer e outras doenças degenerativas, este estudo teve como objetivos avaliar a atividade dessa enzima extraída de fígado bovino e avaliar a estabilidade em condições de refrigeração (5°C). O fígado bovino foi selecionado por ser matéria prima disponível comercialmente e de baixo custo.

MATERIAL E MÉTODOS

As peças de fígado bovino resfriado, até comporem o peso de aproximadamente 3 kg, foram obtidas no comércio varejista da cidade de Viçosa, em diferentes locais de venda e levadas ao laboratório de

Bioengenharia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. As peças divididas em três lotes de 1 kg e embaladas em sacos de polietileno foram congeladas à temperatura de -18°C, por 24 horas, antes do processo de extração. As peças, oriundas de estabelecimentos inspecionados, encontravam-se no prazo de garantia de qualidade.

De cada lote foram retiradas 100 g de fígado, previamente triturado, para realização das análises. Os lotes foram considerados como repetição e as análises foram conduzidas em triplicatas.

Extração

A extração da proteína GST foi realizada segundo metodologia descrita por Habig & Jakoby (1981), adaptada para as condições de realização, com as seguintes modificações: a) A quantidade de fígado usado (100 g) foi inferior (500 g); b) a água resfriada para trituração da amostra foi substituída pela solução de tampão fosfato de potássio, pH 6,7, previamente resfriado a 4°C; c) as colunas de DEAE-celulose e CMC de 15x 22 cm e de 5x 40 cm foram substituídas por 5 x 7 cm e 2,5 x 13 cm, respectivamente.

Em cada etapa, o volume do extrato foi medido e foram realizadas as determinações de proteínas e da atividade da GST. A proteína foi determinada pelo método Bradford (1976), usando a albumina de soro bovino como padrão, e a medida da atividade da GST, conforme metodologia descrita por Habig et al. (1974).

Para a obtenção do extrato bruto foram pesados 100 g de fígado de cada lote, parcialmente triturados e homogeneizados, em liquidificador convencional, por um minuto, com três volumes (p/v) de tampão fosfato de potássio, pH 6,7, previamente resfriado a 4°C. O homogeneizado foi centrifugado, por 90 minutos, a 10.000 x G, à temperatura de 4°C, e o sobrenadante foi filtrado em funil de vidro com algodão, para remover partículas flutuantes. Após, o sobrenadante foi passado em uma coluna (5 x 7 cm) de dietilaminoetil- celulose (DEAE-celulose)(MERCK), equilibrada com tampão Tris-HCl 30 mM e pH 8,0, e o eluente coletado de 10 em 10 mL em tubos de ensaio. A coluna foi lavada com o tampão Tris-HCl com 1 M de NaCl, até que nenhuma atividade enzimática no eluente fosse detectada. Em cada tubo, foi determinado o teor de proteínas e a atividade da GST. Dos tubos com presença de proteínas e que apresentaram atividade da GST foi feito um "pool" dos extratos, onde foi adicionado 66 g de sulfato de amônia, para cada 100 mL do "pool" (para precipitação

da GST) e submetido à centrifugação a 10.000 x G, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, de cada 100 mL, foi dissolvido em 30 mL de fosfato de potássio 30 mM em pH 6,7. A solução obtida foi dialisada, em sacos de diálise, com porosidade para proteínas até 12 KDa, com duas trocas de 2 litros desse tampão a cada 12 horas.

A solução dialisada foi aplicada numa coluna (2,5x 13 cm), previamente preparada com Carboximetilcelulose (CMC) (SIGMA), equilibrada com a mesma solução-tampão, descrita anteriormente. A coluna foi lavada com dois volumes do tampão e, então, foi eluída com volumes iguais ao volume da coluna, por um gradiente linear de 0 a 200 mM de KCl (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200) em tampão fosfato de potássio 30 mM e pH 6,7. Os eluentes desta coluna foram coletados em volumes de 5 mL, em tubos de ensaio, e foram determinados o teor de proteínas e a atividade da enzima em cada tubo, obtendo-se um "pool" dos extratos daqueles tubos que apresentaram presença de proteínas e atividade da GST.

Atividade da GST

A atividade da enzima GST citosólica foi determinada, de acordo com Habig et al. (1974), usando como substrato 1 cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) (SIGMA), preparado em 80% de etanol. O ensaio foi conduzido em triplicata a 25°C, com tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 6,5, na presença de 1 mM de glutatona reduzida, 1 mM de CDNB e 100 µL do extrato de fígado. Ensaio da mistura, sem adição da fração citosólica, foi usado como controle para verificar a taxa de reações não-enzimáticas. A correção nas medidas de absorbância da reação com o extrato foi realizada pela subtração da absorbância na ausência da enzima (controle). A variação da absorbância, quando o substrato está conjugado com a glutatona, foi monitorada a 340 nm, usando um espectrofotômetro modelo GBC-UV 918.

Em uma cubeta de 3 mL foi adicionada a mistura da reação, composta de 2.600 µL de tampão fosfato potássio 0,1 M, pH 6,5 (quantidade suficiente para completar o volume de 3 mL), 150 µL de GSH (20 mM em água deionizada), 150 µL de CDNB (20 mM em água deionizada) e, por último, 100 µL do extrato de fígado. A taxa da reação foi iniciada pela adição do extrato e monitorada, a intervalos de 10 segundos, por um período de três minutos. Os dados foram representados em gráfico de abs (nm) versus tempo (segundos), e a taxa inicial foi determinada por regressão

linear. Os valores de abs foram previamente subtraídos dos valores para a reação espontânea (sem adição do extrato de fígado).

A unidade da atividade da enzima foi definida como a relação da taxa inicial da reação, com o valor do coeficiente de extinção molar para o CDNB, nas condições do experimento ($De = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), conforme Habig et al. (1974). A atividade específica foi definida como a unidade da atividade da enzima, por mg de proteína.

Efeito do pH na atividade da enzima

O efeito do pH da solução-tampão usado na CMC, para retenção da enzima, foi testado, colocando-se 2 g de resina e 10 mL de tampão fosfato de potássio com pH variando de 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; e 7,5. Após 24 horas de contato, o sobrenadante foi retirado e a resina testada em presença de 2 mL de extrato, contendo a enzima. Após agitação por 15 minutos e repouso por uma hora na refrigeração, os tubos foram centrifugados a 8.000 x G, por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e teve sua atividade enzimática determinada, conforme descrito anteriormente.

Estabilidade da GST

O "pool", obtido do processo de extração da coluna CMC, foi acondicionado em frasco âmbar e estocado à temperatura de 5 °C. A cada 10 dias foi determinada a atividade (conforme descrito anteriormente) para verificar a estabilidade na estocagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios para a atividade da enzima foram realizados em pH e concentrações de substratos e GSH, conforme as recomendações descritas na literatura para extração e purificação da GST de fígado de ratos. Isso permitiu a comparação dos resultados com os valores encontrados em estudos similares.

Os resultados obtidos no procedimento de extração estão na Tabela 1. No extrato bruto, obtido do processo de homogeneização e centrifugação, o fígado apresentou elevado conteúdo em proteínas em relação às etapas seguintes, com decréscimo, na concentração de proteínas solúveis, de 2450 para 106 mg, na última etapa de extração, alcançando rendimento de 4,33%. Este percentual de rendimento foi inferior ao valor descrito por Habig & Jakoby (1981), para fígado de ratos, considerado a fonte mais fácil para purificação, devido às altas concentrações, em que as transferases representam aproximadamente 10% das proteínas solúveis.

TABELA 1 – Purificação da Glutathione S-Transferase de fígado bovino.

Etapas da purificação	Proteína (mg)	Ativ. Total ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$)	Ativ. Específica ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína)
Extrato bruto centrifugado	2450 \pm 60,8	26,04 \pm 0,76	0,011 \pm 0,002
Extrato da DEAE-celulose	271 \pm 9,03	6,25 \pm 0,36	0,023 \pm 0,002
Extrato após diálise	156 \pm 6,67	3,23 \pm 0,17	0,021 \pm 0,002
Extrato da CM- celulose	106 \pm 4,01	5,73 \pm 0,22	0,054 \pm 0,005

Os dados são as médias de três repetições \pm erro padrão.

A atividade total diminuiu à medida que o processo de purificação foi ocorrendo, enquanto a atividade específica foi elevada em cinco vezes. Esses dados de atividade total e da atividade específica mostram comportamento semelhante aos resultados da literatura. Habig & Jakoby (1981) purificaram a GST de fígado de ratos e encontraram aumento na atividade específica de, aproximadamente, 10, 42, 33 e 22 vezes maior para as principais transferases - AA, A, B e C, respectivamente - após etapas de purificação com a CMC. No extrato bruto de cérebro de bovino, Young & Briedis (1989) encontraram uma atividade específica de 0,06 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, aproximadamente seis vezes maior do que a encontrada neste experimento com o extrato bruto de fígado bovino. Chico & Listowsky (2005) em extração de GST de rato observaram que a distribuição da glutathione s-transferase varia muito entre os órgãos, sendo o fígado o que apresentou maior atividade.

No extrato proveniente da coluna de DEAE-celulose é possível observar (Figura 1) que a concentração de proteína foi crescente a partir do tubo 22, alcançou o máximo de concentração no tubo 39 e ocorreu declínio acentuado de 750 mg de proteína para 150 mg no tubo 40. Em relação à atividade específica (Figura 1) a partir do tubo 20, a atividade foi aumentando gradativamente até o tubo 31 e alcançou o máximo de atividade entre os tubos 32 e 41. Um “pool” dos extratos dos tubos 22 a 42 foi formado e foram determinadas a concentração de proteína e a atividade específica da GST, na presença do substrato CDNB.

Na Figura 2 está representado o perfil da concentração de proteína eluída da coluna da CMC. Habig & Jakoby (1981) relataram que na coluna de CMC é possível separar a maioria das transferases e que, inicialmente, as transferases ficam retidas na coluna e

as outras proteínas são eluídas. Com a passagem do gradiente linear de KCl na coluna, as transferases são então eluídas. No entanto, observa-se na Figura 2 concentração muito alta de proteínas sendo eluída da coluna no início do processo, antes de iniciar a passagem do gradiente de KCl. Acompanhando também o mesmo comportamento, essas proteínas apresentaram atividade específica elevada, em relação ao substrato CDNB, entre os tubos 8 e 16. Dois picos menores de atividade enzimática podem ser observados próximos aos tubos 5 e 18.

O efeito do pH da resina, na retenção da atividade enzimática, não foi observado nos diferentes pHs a que se submeteu o extrato da GST, conforme observado na Figura 3.

Em estudos realizados com fígado de ratos, Habig et al. (1974) identificaram quatro diferentes picos de saída de proteínas, de acordo com a especificidade pelo substrato, e as GSTs foram chamadas de A, B, C, D e E, na ordem inversa de sua eluição, ou seja, a espécie eluída de mais alta troca iônica, correspondendo ao último pico de saída, foi nomeada de GST-A. A presença de íons na solução da enzima, proporcionou maior efeito tamponante e estabilidade, provavelmente, pode ter sido a condição que interferiu na adsorção da enzima, na coluna de CMC. Apesar das proteínas não terem ficado retidas na coluna de CMC, elas apresentaram atividade com o CDNB, nas condições estabelecidas para as transferases extraídas de fígado de ratos. Foi possível obter um “pool” dos extratos, referentes aos tubos de número 5 ao 17, com atividade específica cinco vezes maior do que a atividade no extrato bruto de fígado.

Na avaliação da estabilidade da atividade da enzima no “pool” obtido da CMC nas condições de refrigeração (5°C), observa-se na Figura 4 que a enzima manteve a atividade específica estável durante 70 dias.

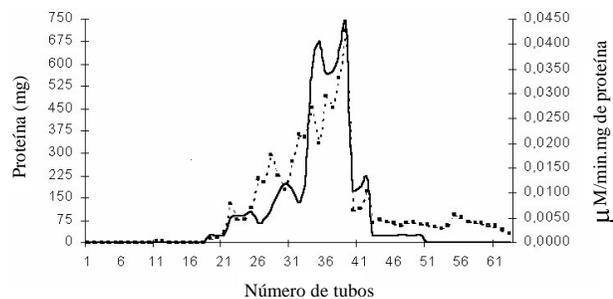


FIGURA 1 – Perfil da concentração de proteína (—) e atividade específica (---) do extrato de fígado bovino eluído da coluna de DEAE-celulose.

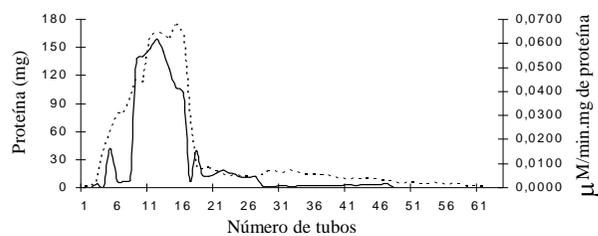


FIGURA 2 – Perfil da concentração de proteínas (—) e atividade específica (---) do extrato de fígado bovino eluído da coluna de Carboximetilcelulose (CMC)

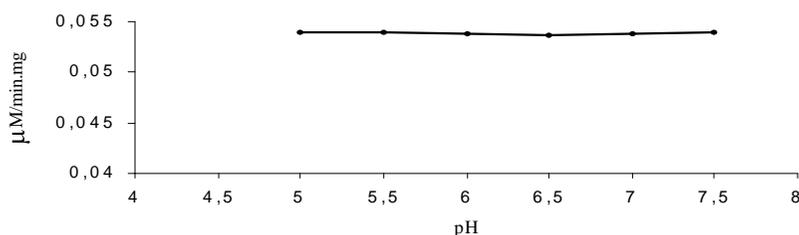


FIGURA 3 – Atividade específica do extrato na resina CMC com diferentes pHs.

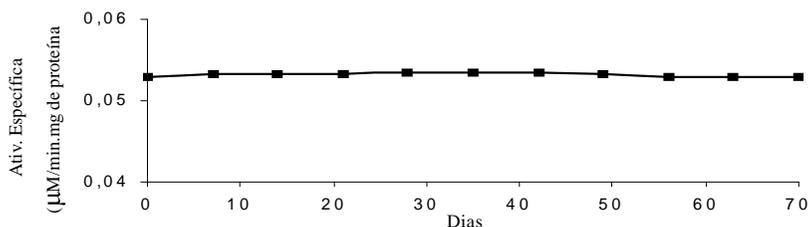


FIGURA 4 – Estabilidade do “pool” do extrato obtido da coluna de CMC, à temperatura de 5°C.

Peters & Roelofs (1997) estudaram a estabilidade da GST de fígado de humanos em três temperaturas de estocagem, durante 24 meses nas temperaturas de -20, -80 e -196°C não encontraram diferença significativa em relação à sua atividade.

CONCLUSÃO

A enzima Glutathione S- Transferase (GST), presente no extrato de fígado de bovino, apresentou atividade com o 1 cloro 2, 4 dinitrobenzeno (CDNB) em presença de glutathione (GSH). Após a extração e

purificação em coluna de dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose) e Carboximetilcelulose (CMC) a atividade específica da enzima aumentou cinco vezes. A atividade enzimática no extrato obtido manteve-se estável por 70 dias estocado à temperatura de 5°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABBITT, P. C. Reengineering the glutathione S-transferase scaffold: a rational design strategy pays off. **Proceeding National Academy Sciences**, Washington, v. 97, n. 19, p. 10293-10300, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHICO, D. E.; LISTOWSKY, I. Diverse expression profiles of glutathione S-transferase subunits in mammalian urinary bladders. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.l.], v. 45, n. 1, p. 56-64, 2005.
- DYBING, E.; DOE, J.; GROTEN, J.; KLEINER, J.; O'BRIEN, J.; RENWICK, A. G.; SCHLATTER, J.; STEINBERG, P.; TRITSCHER, A.; WLAKER, R.; YOUNES, M. Hazard characterization of chemicals in food and diet. **Food Chemical and Toxicology**, London, v. 40, n. 1-2, p. 237-282, 2002.
- HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferase (rat and human). **Methods in Enzymology**, [S.l.], v. 77, n. 27, p. 218-239, 1981.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.
- HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [S.l.], v. 45, p. 51-88, 2005.
- HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Review Biochemistry Molecular Biology**, [S.l.], v. 30, p. 445-600, 1995.
- MALMEZAT, D.; BREUILLE, P.; CAPITAN, P.; MIRANDA, P.; OBLED, C. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, p. 1239-1246, 2000.
- OGA, S. Toxicinética. In: _____. **Fundamentos da toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 9-27.
- PETERS, W. H.; ROELOFS, H. M. Effect of long time storage on cytosolic glutathione S-transferase. **Biochemistry Molecular International**, [S.l.], v. 41, n. 5, p. 913-917, 1997. Abstract.
- WARHOLM, M. et al. Purification and characterization of three distinct Glutathione Transferases from mouse liver. **Biochemistry**, [S.l.], v. 25, p. 4119-4125, 1986.
- WIDERSTEN, M.; MANNERVIK, B. Glutathione transferase with novel active sites isolated by phase display from a library of random mutants. **Journal Molecular Biological**, [S.l.], v. 250, p. 115-122, 1995.
- YOUNG, P. R.; BRIEDIS, A. V. Purification and kinetic mechanism of the major glutathione S-transferase from bovine brain. **Biochemistry Journal**, [S.l.], v. 257, p. 541-548, 1989.