

GLUTATIÓN S-TRANSFERASAS (GST), APLICACIONES BIOMÉDICAS Y VETERINARIAS.

Barros, L.⁽¹⁾ y Braun, J.P.⁽²⁾

RESUMEN

Se presenta una revisión bibliográfica sobre las Glutación S-Transferasas (GST) y sus aplicaciones biomédicas y veterinarias. Se describe la actividad bioquímica y la intervención de estas enzimas en la detoxificación hepática y se analiza su estructura, la nomenclatura y la clasificación. Se señala su metabolismo y sus variaciones fisiológicas. Finalmente se discute sus aplicaciones biomédicas, su importancia en el diagnóstico de la lesión hepática en diferentes especies y su utilización terapéutica.

Palabras Claves: Glutación S-transferasas, enzimas, hígado.

SUMMARY

Applications of the Glutathion S-transferases (GST) in human and veterinary medicine are reviewed. The GST liver detoxication system as well as the structure, nomenclature and classification of the enzymes are described. Metabolism and physiological variations of GST are also studied. Finally, biomedical uses, relevance in the diagnosis of liver damage and therapeutics uses of the GSTs are discussed.

Key Words: Glutathion S-transferases, enzymes, liver.

INTRODUCCION

En los últimos decenios la investigación científica se ha volcado hacia el estudio del medio ambiente y a la incidencia de las actividades humanas sobre la contaminación ambiental. En ese contexto se han realizado avances en el conocimiento de diferentes sistemas de defensa y de detoxicación de los organismos vivientes contra los agentes de contaminación natural o derivados de las actividades de la vida moderna.

A lo largo de la evolución, los organismos aeróbicos han desarrollado sistemas enzimáticos como defensa a los tóxicos -especialmente el oxígeno y sus derivados- y a las moléculas

extrañas al organismo llamadas xenobióticos. Dentro de esos sistemas enzimáticos las *glutación S-transferasas* (GST) (E.C. 2.5.1.18.) son una familia de proteínas multifuncionales que intervienen en la detoxicación celular.

Las GST fueron puestas en evidencia por la primera vez en 1960 por Booth y col. en la fracción soluble del sobrenadante del hígado de rata como una actividad enzimática que catalizaba la conjugación con el glutatión (47). Al mismo tiempo Combes y Stakelum (1961) demostraron que el citosol del hígado de rata catalizaba la reacción del glutatión con la bromosulfaleína (47). Posteriormente, la actividad de las GST fue

puesta en evidencia en plantas y en numerosas especies animales (15) (18) (89). Los órganos de los mamíferos contienen las mayores actividades de estas enzimas, siendo el hígado el órgano preferencial (3) (12) (15) (26) (75).

ACTIVIDAD DE LAS GST

Las glutación S-transferasas intervienen en la detoxicación hepática, los principales mecanismos de detoxicación de sustancias comprenden dos fases denominadas Fase I y Fase II. En la primera fase se realiza la transformación de los xenobióticos a través de una oxidación que los solubiliza. En la segunda fase, esas moléculas solubilizadas se conjugan con otras moléculas hidrofílicas que favorecen su pasaje al torrente sanguíneo y por consiguiente su eliminación renal. El tripéptido

⁽¹⁾ Dr. Vet., MSV, Dr. Univ. Departamento de Patología y Clínica de Rumiantes y Suinos, Facultad de Veterinaria, Av. Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay.
Tel: (598-2) 625647, Fax: (598-2) 680130.

⁽²⁾ Dr. Vet., Dr. Sc, Biochimie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse, Francia, Tel: (33) 61193847, Fax: (33) 61193978..

glutación interviene en esta conjugación y es catalizado por las glutación S-transferasas (20).

El glutación (L-gamma-glutamyl-L-cistein glicina) (GSH) es el tiol (grupo SH) intracelular más abundante (41), su concentración en el hígado es entre 2 y 10 mM/L (en el hombre y en la rata) (65) (79) (82). La síntesis intracelular del glutación necesita glutamato, cisteína, glicina y ATP (26).

El hígado, el riñón, la mucosa intestinal y los eritrocitos son los tejidos más provistos en glutación, probablemente porque están muy expuestos a los radicales libres (26).

La interacción del glutación con los radicales libres depende de la actividad de enzimas de transferencia: cuatro clases de transferasas citosólicas y una microsomal. Estas glutación S-transferasas catalizan la conjugación del cofactor glutación con moléculas tóxicas lo que resulta en la inactivación y la excreción de numerosas drogas y tóxicos como las aflatoxinas, los alcaloides pirrolizidínicos y los hidrocarburos policíclicos (26) (52). Esa conjugación es una vía muy importante de detoxicación de los xenobióticos (20). Los conjugados son transportados al exterior de la célula por otras enzimas -la gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT) y la dipeptidasa- que catalizan las reacciones de degradación y que forman: 1) conjugados de cisteína y 2) residuos de glutamina y de glicina. El paso metabólico final es la biosíntesis de ácidos mercaptúricos que serán eliminados por vía del riñón en la orina (38) (89).

Las GST intervienen en la detoxicación celular de potenciales agentes alquilantes para catalizar su reacción con el grupo tiol (SH) de la cisteína del glutación y producir conjugados más solubles en el agua y por lo tanto menos tóxicos (13). Son enzimas que catalizan el ataque nucleofílico del átomo de azufre del glutación con los grupos electrofílicos de un segundo compuesto dando como resultado una molécula de glutación S-conjugado más soluble, que será metabolizada en ácido mercaptúrico (2) (22) (34) (38) (54). Las GST poseen

dos sitios activos para ligarse con las moléculas: uno para el glutación llamado sitio G y otro para un segundo sustrato denominado sitio H (45) (53) (68) (77) (82) (87).

Otras funciones de estas enzimas son la unión no enzimática, el transporte o el stockaje de moléculas como la bilirrubina, los colorantes azufrados (e.g. bromosulfonftaleína), el heme u hormonas como T₃ y T₄. Por esta acción han recibido el nombre de «ligandinas» (36) (41) (47) (49) (79).

También tienen un rol de protección contra los lípidos, por una actividad de glutación peroxidasa contra los peróxidos orgánicos (e.g. los acil-hidroperóxidos de los ácidos grasos libres) (Shreve,1979 in Ketterer,1986), pero a diferencia de la glutación peroxidasa (GSH-Px) las GST no reducen el peróxido de hidrógeno (61).

ESTRUCTURA DE LAS GLUTACIÓN S-TRANSFERASAS

Las GST son isoenzimas relativamente pequeñas, tienen un peso molecular comprendido entre 45.000 y 50.000 Da (22) (65) (89). Son una familia de proteínas diméricas que constituyen entre el 3 y el 5% de la proteínas totales del citosol, en la rata y en el hombre (Van Ommen in Ploemen,1994) (41) (87).

Las GST son proteínas que contienen dos subunidades homólogas que pertenecen a la misma clase de GST (*Alfa*, *Mu* o *Pi*), siendo su peso molecular de entre 24.500 y 27.000 Da y formadas por alrededor de 210 a 240 aminoácidos cada una (34) (43) (54) (55) (57) (68).

Existe una gran diversidad de combinaciones, como lo demuestra, por ejemplo, el hígado de la rata donde se encuentran por lo menos 14 dímeros contruidos por 13 subunidades diferentes (43) (50), así como también en el hígado del hombre existen al menos 10 subunidades (68). Existe también una GST de origen microsomal en el hombre que contrariamente a las anteriores es una proteína trimérica con

tres subunidades de 17.000 Da cada una (15).

NOMENCLATURA Y CLASIFICACION

Las GST comprenden una familia supergénica de proteínas diméricas que son clasificadas en los mamíferos de acuerdo a su punto isoelectrico en cuatro clases multigénicas denominadas: *Alfa*, *Mu*, *Pi* y *Theta*. El polimorfismo de las familias y de las clases sugieren que existe un gene ancestral común tanto en el hombre, como en la rata o en el ratón (9) (56) (59) (62) (67).

La nomenclatura de estas enzimas ha sido controvertida por la dificultad de resumir sus funciones, su estructura y la diversidad de formas que presentan las especies animales. Han sido señaladas más de 100 isoenzimas (3) (15).

Inicialmente fue propuesta una clasificación a partir de los sustratos que eran atacados por estas enzimas, ya que éstas poseen una gran especificidad de acción (Grover et Sims,1964 in Ketterer 1986) (Boylard et Chesseau,1969 in Manner-vick,1988). Ese sistema no era muy preciso y hubo luego un avance importante en el desarrollo de la investigación científica con el descubrimiento de que el CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) se comportaba como un sustrato común a todas las clases de GST (Clark *et al.* en 1973 in Ketterer,1986). A partir de ese momento por medio de diferentes técnicas fueron identificadas subunidades variadas, discriminadas por la especificidad de los sustratos y de las sustancias inhibitoras, así como por las propiedades inmunológicas y por sus secuencias en aminoácidos (54) (72). La aplicación de técnicas de biología molecular ha permitido determinar las diferentes secuencias en aminoácidos en la estructura de las isoenzimas y de esta manera comprender mejor las relaciones entre las clases de GST (15).

En la discusión de la nomenclatura

han sido adoptados los criterios siguientes: el nombre de la enzima debe especificar la especie biológica pero no el nombre del órgano de origen; serán nombradas sólo las enzimas que hayan sido caracterizadas por su actividad enzimática así como también por otras propiedades funcionales; las subunidades deben numerarse en orden secuencial a su descubrimiento y a su caracterización (55).

METABOLISMO Y VARIACIONES FISIOLÓGICAS

La regulación de la expresión de las GST depende de factores hormonales y del medio ambiente (Mannervik, 1985). Las clases de GST se distribuyen en los tejidos del organismo con localización diferencial (88), por ejemplo la clase *Alfa* se encuentra en los hepatocitos pero no en los eritrocitos y la localización inversa sucede con la clase *Pi* (15).

La mayoría de los tejidos del organismo contienen actividad de las GST, que varía entre las especies animales. Las actividades varían mucho entre los diferentes rumiantes, los ovinos poseen una actividad GST hepática mayor que los bovinos pero un 50% inferior a la de la rata, usando un sustrato de CDNB (74) (89) (94). Un estudio sobre la repartición de las GST entre los lóbulos hepáticos en los bovinos, en los ovinos y en las cabras no demostró ninguna diferencia intraespecie significativa (94).

En los ovinos se ha constatado un efecto de la *edad* sobre las GST, puesto que Kawalek *et al.*, (1990) encontraron actividades más bajas en los corderos de menos de tres meses, en relación a otros corderos de más de 4 meses o a los adultos. Otros autores también han encontrado una menor actividad en los ovinos jóvenes (27) (44) (52), como también lo ha sido señalado en otras especies animales (11) (19) (21) (24) (28) (30) (85).

También en los ovinos, el *destete* y la *gestación* hacen aumentar la actividad de las GST hepáticas (33) (44), se ha señalado también diferen-

cias entre dos *razas* noruegas: mayor actividad en la Pelt que en la Spael que ha sido vinculado con una sensibilidad diferente de protección contra la fotosensibilización provocada por la intoxicación con el *Nartheicum ossifragum* (27).

El *sexo* ha sido señalado como fuente de variación, puesto que frente a las hembras de rata y ratón, los machos presentan una actividad mayor de las GST hepáticas (19) (30) (88).

En la oveja se ha observado una variación *circadiana* de las GST, con un máximo de actividad en el plasma entre las horas 05.00 y 17.00 (6); también en la rata se ha observado ese ritmo pero no en los mismos horarios (81), provocado probablemente por los hábitos de vida diurno y nocturno de cada especie, respectivamente.

La *nutrición* y el ayuno pueden influenciar la actividad de las GST y pueden provocar una disminución en el potencial de detoxicación de los xenobióticos (8) (21) (82) (83). Una alimentación desequilibrada en proteínas y en aminoácidos azufrados, así como también en ciertos oligoelementos pueden disminuir la concentración de glutatión y la actividad de las GST en el hombre y en la rata (8) (10) (29). Por otra parte la obesidad también hace disminuir la actividad hepática de las GST en el ratón (95).

Los pollos carenciados en selenio y vitamina E tienen una actividad oxidativa de las GST aumentada, posiblemente para contrarrestar el efecto de la disminución de las glutatión peroxidasas (GSH-Px) provocada por esa dieta deficiente (48). En cerdos la deficiencia en vitamina C por más de 21 días provoca una disminución de las GST (10). Por otra parte la adición de alfa-tocoferol en el cultivo celular de hepatocitos de rata aumenta la actividad de las GST (64).

Finalmente el *estrés* es también un factor importante de variación y particularmente en relación con el sistema oxidativo (23).

APLICACIONES BIOMÉDICAS

Los xenobióticos, comprendidas las drogas anticancerosas, pueden influenciar la transcripción de los genes de las GST y permitir su expresión bajo la forma de funciones específicas, como ser las respuestas antioxidantes (79) (90). En ese sentido la investigación científica se ha centrado en el estudio de la expresión de las GST como *marcadores tumorales* por la relación de su expresión con las transformaciones de las células tumorales y en particular hacia la resistencia de esas células a las drogas anticancerosas (15). El incremento de la GST-*Pi* ha sido observado en varios cánceres o en estados precancerosos tanto en el hombre como en otras especies (3) (69) (70) (73) (79) (92) (93) (96) (97).

Existen múltiples índices que sugieren que el glutatión y las glutatión S-transferasas intervienen en la *resistencia adquirida* de las células por una exposición prolongada a las drogas (63), ya que en varias oportunidades se ha asociado con el incremento de la concentración de las GST y en particular de la GST-*Pi* (43). La actividad de las GST-*Pi* reduce la eficacia clínica de drogas anticancerosas variadas y su estudio constituye una fuente importante de investigación científica (15) (51) (70) (73) (79) (91). Las GST pueden intervenir también en la instalación de la resistencia de los microorganismos a las drogas antiprotozoarias (22).

UTILIDAD EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

La diferencia entre lesión y disfunción hepática es importante en el momento de establecer el compromiso del sistema hepatobiliar en el proceso de una enfermedad. Los análisis de laboratorio de uso corriente no dan siempre una buena información sobre el estado de una lesión hepática o sobre el grado de disfuncionamiento del hígado (25).

La búsqueda de indicadores específicos de lesión hepática, véase de citólisis, se orienta corrientemente

hacia la determinación de la actividad de marcadores plasmáticos desde el momento en que son volcados en la circulación sanguínea, provenientes de una solución de continuidad de la membrana citoplasmática. De esta manera, son utilizadas ampliamente en bioquímica clínica: la aspartato aminotransferasa (ASAT) (antiguamente conocida como TGO), la glutamato deshidrogenasa (GLD), la lactato deshidrogenasa (LDH), la alanino-amino-transferasa (ALAT) (antiguamente la TGP), entre otras enzimas (1) (4) (5) (14) (16) (25) (35) (58) (66).

Estos marcadores tienen un origen diferente entre las estructuras celulares: citosólico: la LDH, mitocondrial: la GLD, o mixto (mitocondrial y citosólico): la ASAT, siendo de éstos la GLD el más específico del tejido hepático (16).

Las propiedades de las glutatión S-transferasas pueden ofrecer ciertas ventajas técnicas sobre la determinación de la actividad de las aminotransferasas (ASAT, ALAT) en el momento de determinar la presencia de una lesión hepática. Las GST son enzimas de talla pequeña, se presentan en una fuerte concentración en el citosol del hepatocito y son descargadas en grandes cantidades en la circulación sanguínea como consecuencia de una lesión hepática (7). Su vida media plasmática es relativamente corta (<90 minutos) y su detección es más precoz que la ASAT (vida media: 17 horas) y la ALAT (vida media: 47 horas) (7) (40). Las GST pueden ser utilizadas también en rutinas hospitalarias por métodos automatizados (6) (13) (42) (86).

La vida media más corta de las GST, dan a este marcador la posibilidad de identificar las fases iniciales y finales de un proceso patológico, como en el caso de intoxicaciones con una droga que no siempre es detectable cuando se utiliza la ASAT como marcador de lesión (7) (40). La determinación de la actividad plasmática de las GST ha sido utilizada en variadas oportunidades patológicas como sensible indicador de lesión hepática, tanto en medicina

humana como en medicina veterinaria. A vía de ejemplo: han sido empleadas para medir los cambios de la integridad hepatocelular en la anestesia general por halotano en el hombre y otras especies (17), en la detección del rechazo en los trasplantes de hígado en el hombre (80) (86), en la detección de las hepatitis ya sea en las agudas (Tsuru, 1978 in Beckett, 1993), o en las virales activas (9), o en las crónicas activas de origen autoinmune (37), como así también en las intoxicaciones con paracetamol (37).

En los ovinos se ha establecido la actividad de las GST hepáticas en la fasciolosis experimental -constatándose una disminución de la detoxificación hepática (31) (32) (60)-, así como también se ha determinado en casos de úlcera bucal, en neumonías, parasitosis gastrointestinal, infecciones banales (46) y en la fotosensibilización hepatógena (27).

USOS TERAPEUTICOS

Los precursores del glutatión han sido utilizados en situaciones *patológicas* diversas con un fin *protector* y *curativo*; así, se les ha administrado a cerdos con shock séptico (Groenveld, 1990 in Fettman, 1991), a las cabras en la aflatoxicosis (Hatch, 1982 in Fettman, 1991) y a los ovinos en la endotoxemia (Lutch, 1987 in Fettman, 1991).

A partir de la purificación y de la síntesis por clonación de antígenos del *Schistosoma mansoni*, Taylor *et al.*, (1988) identificaron una proteína con una actividad GST que serviría para la defensa del parásito contra las moléculas reactivas de la respuesta inmune del organismo huésped. Esta proteína es un antígeno con la propiedad de desencadenar la respuesta inmune de un organismo huésped y es utilizado como *vacuna* en especies diversas (Balloul *et al.*, 1987 in Sexton, 1994) (39) (78) (84). El mismo procedimiento a sido utilizado en forma experimental contra la *Fasciola hepatica* en los ovinos (60) (71).

Otra utilización reciente de las

actividades de las GST ha sido también el desarrollo de *vacunas combinadas*, con la producción de proteínas de fusión entre las GST del parásito y drogas antiparasitarias, potenciándose entonces el efecto de la respuesta inmune con el de la droga antiparasitaria (76).

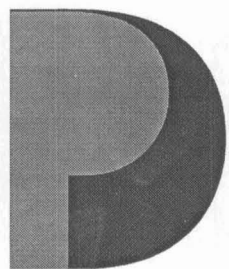
Para concluir, visto el desarrollo de los conocimientos científicos, así como de las variadas aplicaciones de las actividades de las glutatión S-transferasas, debería profundizarse en el estudio de las variaciones fisiológicas y patológicas en los animales domésticos y desarrollar de esta manera su utilización en medicina veterinaria.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, P.; Matthews, J.; Berrett, S.; Brush, P. & Patterson, D. (1981). Changes in plasma enzyme activities and other blood components in response to acute and chronic liver damage in cattle. *Res. vet. Sci.*, 31:1-4.
- Anderson, M. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.*, 113:548-555.
- Awasthi, Y.; Sharma, R. & Singhal, S. (1994). Human glutathione S-transferases. *Int. J. Biochem.*, 26(3):295-308.
- Balistreri, W. & Setchell, K. (1989). Newer liver function tests. In: *Front Gastrointest. Res.*, ed. Basel, Karger, 16:220-245.
- Balistreri, W.; Kader, H.; Setchell, K.; Gremse, D.; Ryckman, F. & Schroeder, T. (1992). New methods for assessing liver function in infants and children. *Ann. Clin. Lab. Sc.*, 22(3):162-173.
- Barros, L.; Braun, J.; Galtier, P. & Toutain, P. (1995). Plasma glutathione S-transferase activity in plasma of sheep: reference values; changes in experimental liver damage. *ISSX Proceedings, International ISSX-Workshop on Glutathione S-Transferases, Noordwijkerhout, The Netherlands*, P6,41.
- Bass, N.; Kirsch, R.; Tuff, S. & Saunders, S. (1978). Radioimmunoassay of plasma ligandin. A sensitive index of experimental hepatocellular necrosis. *Gastroenterology*, 75:589-594.
- Bauman, P.; Smith, T. & Bray, T. (1988). The effect of dietary protein and sulfur amino acids on hepatic glutathione concentration and glutathione-dependent enzyme activities in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 66:8,1048-1052.
- Beckett, G. & Hayes, J. (1993). Glutathione S-transferases: biomedical applications. *Adv. Clin. Chem.*, 30:281-381.
- Bidlack, W.; Brown, R. & Mohan, C. (1986). Nutritional parameters that alter hepatic drug metabolism; conjugation; and toxicity; in Effects of nutritional factors on xenobiotics metabolism and disposition. *Fed. Proc.*, 45(2):142-148.
- Blanco, P.; Machado, A. & Satrústegui, J. (1987). Variations due to hyperoxia and ageing in the activities of glutathione S-transferase and NADPH-Cytochrome c reductase. *Mech. Age. Devel.*, 39:11-19.

12. Bohets, H.; Nouwen, E.; De Broe, M. & Dierickx, P. (1994). The glutathione S-transferase isoenzyme pattern in the porcine kidney cell line LLC-PK1 compared to the pig kidney cortex. *Soc. Belge Bioch., Sint-Genesiu-Rode (VUB), mars*:B33.
13. Bompard, G.; Prévot, D. & Bascands, J. (1990). Rapid automated analysis of glutathione reductase; peroxidase and S-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity. *Clin.Biochem.*, 23:501-504.
14. Boyd, J. (1982). The comparative activity of some enzymes in sheep; cattle and rats -Normal serum and tissue levels and changes during experimental liver necrosis. *Res.vet.Sci.*, 3:256-268.
15. Boyer, T. (1989). The Glutathione S-Transferases: an update. *Hepatology*, 9(3):486-496.
16. Braun, J.; Bézille, P. & Rico, A. (1986). Sémiologie biochimique du foie chez les ruminants. *Reprod.Nutr.Dévelop.*, 26(1):227-243.
17. Brown, A. & Gandolfi, J. (1994). Glutathione-S-transferase is a target for covalent modification by a haloethane reactive intermediate in the guinea pig liver. *Toxicology*, 89:35-47.
18. Clark, A. (1989). The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non vertebrate organisms. *Review. Comp.Biochem.Physiol.*, 92B(3):419-446.
19. Coecke, S.; Vanderberghe, Y.; Callaerts, A.; Sonck, W.; Verleye, G.; Van Bezooijen C.; Vercautysse, A. & Rogiers, V. (1991). Hepatic cytosolic glutathione S-transferase activities in ageing Brown Norway rats -importance of sex differences and phenobarbital treatment for studies of ageing. *Mech.Age.Develop.*, 55:189-198.
20. Colvin, M.; Friedman, H.; Gamcsik, M.; Fenselau, C. & Hilton, J. (1993). Role of glutathione in cellular resistance to alkylating agents. *Advan.Enzyme Regul.*, 33:19-26.
21. Chen, L.; Hu, N. & Snyder, D. (1994). Effects of age and dietary restriction on liver glutathione transferase activities in Lobund-Wistar rats. *Arch.Gerontol.Geriatr.*, 18:191-205.
22. D'Silva, C. (1990). Inhibition and recognition studies on the glutathione-binding site of equine liver glutathione S-transferase. *Biochem.J.*, 271:161-165.
23. Di Simplicio, P. & Rossi, R. (1994). The time-course of mixed disulfide formation between GSH and proteins in rat blood after oxidative stress with tert-butyl hydroperoxide. *Bioch.Biophys.Acta*, 1199:245-252.
24. Doxey, D. (1983). The value of isoenzymes in the diagnosis of disease in ruminants. *Vet.Annu.*, 24:112-117.
25. Evans, R. (1988). Hepatobiliary damage and dysfunction: a critical overview. *Animal clinical biochemistry*; ed. Blackmore, D., Cambridge University Press, Cambridge; pp.117-150.
26. Fettman, M. (1991). Comparative aspects of Glutathione Metabolism affecting individual susceptibility to oxidant injury. *Comp.Cont.Educ.Pract.Vet.*, 13(7):1079-1088.
27. Flåoyen, A.; Skaare, J.; Bråten, K. (1992). Glutathione transferase activity in livers from lambs of three different breeds of Norwegian sheep; and its possible relationship to alveid. *Vet.Res.Comm.*, 16:199-203.
28. Frenkel, M. (1983). Diagnostic methods in liver disease. Chapter 17. In: *The Liver Annual*, 3, Ed.Arias, I.; Frenkel, M. & Wilson, J. *Excerpta Medica*; Amsterdam-New York-Oxford, pp.394-427.
29. Freundl, K. & Ubrahm; H. (1991). Influence of Pb; Cd; Zn; Mn; Cu; Hg; or Be salts on the Glutathione S-Transferases of the rat liver. *Bull.Enviroin.Contam.Toxicol.*, 46:618-624.
30. Fujita, S.; Kitagawa, H.; Ishizawa, H.; Suzuki, T. & Kitani, K. (1985). Age-associated alterations in hepatic glutathione-S-transferase activities. *Bioch.Pharmacol.*, 34(21):3890-3894.
31. Galtier, P.; Larrieu, G.; Tufenkji, A. & Franc, M. (1986). Incidence of experimental fascioliasis on the activity of drug-metabolizing enzymes in lamb liver. *Drug Metab.Dispos.*, 14(1):137-141.
32. Galtier, P. & Larrieu, G. (1986). Enzymologie hépatique de biotransformation chez l'agneau. *Description et évolution en cours de fasciolose. Repr.Nutr.Dévelop.*, 26,(1 B):375-376.
33. Galtier, P. (1992). Physiopathology of liver drug metabolism in sheep. *Current Topics Pharmacol.*, 1:33-41.
34. Habig, W.; Pabst, M. & Jacoby, W. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J.Biol.Chem.*, 249(22):7130-7139.
35. Hall, R. (1985). Laboratory evaluation of liver disease. *Vet.Clin.Nth.Amer.-Small Anim. Pract.*, 15(1):3-19.
36. Hayes, J.; Gilligan, D.; Chapman, B. & Beckett, G. (1983). Purification of human hepatic glutathione S-transferases and the development of a radioimmunoassay for their measurement in plasma. *Clin.Chim.Acta*, 134:107-121.
37. Hayes, P.; Husset, A.; Keating, J.; Bouchier, I.; Williams, R.; Beckett, G. & Hayes, J. (1988). Glutathione S-transferase levels in autoimmune chronic active hepatitis: a more sensitive index of hepatocellular damage than aspartate transaminase. *Clin.Chim.Acta*, 172:211-216.
38. Hinchman, C. & Ballatori, N. (1994). Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intracellular process. *J.Toxicol.Environ.Hlth*, 41:387-409.
39. Hughes, A. (1994). Conserved Proteins as Immunogens: Glutathione S-transferase of *Schistosoma*. *Parasitol.Today*, 10(4):149-151.
40. Hussey, A.; Howie, J.; Allan, L.; Drummond, G.; Hayes, J. & Beckett, G. (1986). Impaired hepatocellular integrity during general anaesthesia; as assessed by measurement of plasma glutathione S-transferase. *Clin.Chim.Acta* 161:19-28.
41. Jakoby, W. (1988). Detoxication: conjugation and hydrolysis. Chapter 21, In: *The Liver Biology and Pathobiology*, 2nd.Ed.; Ed. Arias, I.; Jacoby, W.; Popper, H.; Schachter, D. & Shafritz, D.; Raven Press; New York, pp.375-388.
42. Jaskot, R.; Charlet, E.; Grose, E.; Grady, M. & Roycroft, J. (1983). An automated analysis of Glutathione Peroxidase; S-Transferase; and Reductase activity in animal tissue. *J.Anal.Toxicol.*, 7:86-88.
43. Johnson, J.; Neal, T.; Collins, J. & Siegel, F. (1990). Characterization of methylation of rat liver cytosolic glutathione S-transferases by using reverse-phase h.p.l.c. and chromatofocusing. *Biochem.J.*, 270:483-489.
44. Kaddouri, M.; Larrieu, G.; Eeckhoutte, C. & Galtier, P. (1990). The development of drug-metabolizing enzymes in female sheep livers. *J.Vet.Pharmacol.Therap.*, 13:340-349.
45. Kamei-Hayashi, K.; Oshino, R. & Hara, S. (1993). Amino acid sequence of glutathione S-transferase from Guinea pig liver. *J.Biochem.*, 114(6):835-841.
46. Kawalek, J. & El Said, K. (1990). Maturation development of drug-metabolizing enzymes in sheep. *Am.J.Vet.Res.*, 51(11):1736-1741.
47. Ketterer, B. (1986). Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica*, 16(10/11):957-973.
48. Kim, Y. & Combs, G. (1993). Effects of dietary selenium and vitamin E on glutathione concentrations and glutathione S-transferase activities in chick liver and plasma. *Nutr.Res.*, 13:455-463.
49. Klaassen, C. (1975). Biliary excretion of drugs: role of ligandin in newborn immaturity and the action of microsomal enzyme inducers. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 195(2):311-319.
50. Klinga-Levan, K.; Andersson, A.; Hanson, Ch.; Ridderström, M.; Stenberg, G.; Mannervik, B.; Vajdy, M.; Szpirer, J.; Szpirer, C. & Levan, G. (1994). Mapping of glutathione transferase (GST) genes in the rat. *Hereditas*, 119:285-296.
51. Kodera, Y.; Isobe, K.; Yamauchi, M.; Kondo, K.; Akiyama, S.; Ito, K.; Nakashima, I. & Takagi, H. (1994). Expression of glutathione-S-transferases alpha and pi in gastric cancer: a correlation with cisplatin resistance. *Cancer Chemother Pharmacol*; 34:203-208.
52. Larsson, P.; Busk, L. & Tjälve, H. (1994). Hepatic and extrahepatic bioactivation and GSH conjugation of aflatoxin B1 in sheep. *Carcinogenesis*, 15:5, 947-955.
53. Lytle, M.; Hocker, M.; Hui, H.; Caldwell, C.; Aaron, D.; Engqvist-Goldstein, A.; Flatgaard, J. & Bauer, K. (1994). Isozyme-Specific Glutathione-S-transferase inhibitors: design and synthesis. *J.Med.Chem.*, 37:189-194.
54. Mannervick, B.; Alim, P.; Guthenberg, C.; Jensson, H.; Tahir, M.; Warholm, M. & Jörnvall, J. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 82:7202-7206.
55. Mannervick, B. & Danielson U. (1988). Glutathione transferases - structure and catalytic activity. *CRC Bioch.*, 23(3):283-337.
56. Mannervick, B.; Awasthi, Y.; Board, P.; Hayes, J.; Di Illio, C.; Ketterer, B.; Listowsky, I.; Muramatsu, M.; Pearson, W.; Pickett, C.; Sato, K.; Widersten, M. & Wolf, C. (1992). Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.*, 282:305-308.
57. Mera, N.; Ohmori, S.; Itahashi, K.; Kiuchi, M.; Igarashi, T.; Rikihisa, T. & Kitada, M. (1994). Immunochemical evidence for the occurrence of mu class glutathione S-transferase in human fetal livers. *J. Biochem.*, 116(2):315-320.
58. Meyer, D. (1982). The liver. Part I. Biochemical tests for the evaluation of the hepatobiliary system. *Comp.Cont.Educ.Pract. Vet.*, 4(8):663-673.
59. Meyer, D.; Coles, B.; Pemble, S.; Gilmore, K.; Fraser, G. & Ketterer, B. (1991). Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem.J.*, 274:409-414.
60. Miller, D.; Howell, M. & Boray, J. (1993). Host effects on glutathione S-transferase activity in *Fasciola Hepatica*. *Int.J.Parasitol.*, 23(8):1073-1076.
61. Miyaura, S.; Horie, K. & Isono, H. (1988). Glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferase in rabbit liver. *Chem.Pharm.Bull.*, 36(7):2523-2530.
62. Morel, F.; Schulz, W. & Sies, H. (1994). Gene structure and regulation of expression of human glutathione S-transferases Alpha. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler*, 375:641-649.
63. Moscow, J. & Dixon, K. (1993). Glutathione-related enzymes; glutathione and multidrug resistance. *Cytotechnology*, 12:155-170.
64. Ong, F.; Wan Ngah, W.; Top, A.; Khalid, B. & Shamaan, N. (1994). Vitamin E; Glutathione S-Transferase and γ -Glutamyl Transpeptidase activities in cultured hepatocytes of rats treated with carcinogens. *Int.J.Biochem.*, 26(3):397-402.
65. Pabst, M.; Habig, W. & Jakoby, W. (1974).

- Glutathione S-Transferase A. A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration. *J.Biol.Bioch.*, 249(22):7140-7148.
66. Pearson, E. & Craig, A. (1980). The diagnosis of liver disease in equine and food animals. *Modern Vet.Pract.*, (march):233-237.
 67. Pickett, C. & Lu, A. (1989). Glutathione S-transferases: Gene structure; regulation; and biological function. *Ann.Rev.Biochem.*, 58:743-764.
 68. Ploemen, J. (1994). Inhibition of Glutathione S-transferases. Studies with quinones and ethacrynic acid. Tesis of the Universiteit Utrecht; Faculteit Diergeneeskunde, Netherlands.
 69. Sato, K. (1988). Glutathione S-transferases and hepatocarcinogenesis. *Jpn.J.Cancer Res.(Gann)*, 79:566-572.
 70. Sato, K.; Satoh, K.; Tsuchida, S.; Hatayama, I.; Shen, H.; Yokohama, Y.; Yamadami, Y. & Tamai, K. (1992). Specific expression of glutathione S-transferase Pi forms in (pre)neoplastic tissues: their properties and functions. *Tohoku J.Exp.Med.*, 168:97-103.
 71. Sexton, J.; Wilce, M.; Colin, T.; Wijffels, G.; Salvatore, L.; Feil, S.; Parker, M.; Spithill, T. & Morrison, Ch. (1994). Vaccination of Sheep against *Fasciola hepatica* with Glutathione S-Transferase. *J.Immunol.*, 152:1861-1872.
 72. Simons, P. & Vander Jagt, D. (1977). Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Anal.Bioch.*, 82:334-341.
 73. Singh, S.; Brunnert, S.; Roberts, B. & Kishan, A. (1990). Differential expression of glutathione S-transferase; glutathione peroxidase and glutathione reductase in normal and malignant human breast tissues. *Cancer Letters*, 51:43-48.
 74. Smith, S. & Watkins, J. (1984). Biotransformations of xenobiotics in tissues of cattle and sheep. *Can.J.Anim.Sci.*, 64(Suppl):278-280.
 75. Srivastava, S.; Singhal, S.; Bajpai, K.; Chaubey, M.; Ansari, N. & Awasthi, Y. (1994). A group of novel glutathione S-transferase isozymes showing high activity towards 4-hydroxy-2-nonenal are present in bovine ocular tissues. *Exp.Eye Res.*, 59:151-159.
 76. Tainer, J. (1995). Shistosoma GST: crystal structure and drug binding. ISSX-Proceedings. International ISSX-Workshop on Glutathione S-transferases. Noordwijkerhout; The Netherlands, pp.85.
 77. Takikawa, H. & Kaplowitz, N. (1988). Comparison of the binding sites of GSH S-transferases of the Ya- and Yb-subunit classes: effect of glutathione on the binding of bile acids. *J.Lipid Res.*, 29:279-286.
 78. Taylor, J.; Vidal, A.; Torpier, G.; Meyer, D.; Roitsch, C.; Balloul, J.; Southan, C.; Sondermeyer, P.; Pemble, S.; Lecocq, J.; Capron, A. & Ketterer, B. (1988). The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned M, 28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO Journal*, 7(2):485-472.
 79. Tew, K. (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.*, 54:4313-4320.
 80. Trull, A.; Facey, S.; Rees, G.; Wight, D.; Noble-Jamieson, G.; Joughin, C.; Friend, P. & Alexander, G. (1994). Serum alpha-glutathione S-transferase. A sensitive marker of hepatocellular damage associated with acute liver allograft rejection. *Transplantation*, 58(12):1345-1351.
 81. Tuñón, M.; González, P.; López, P.; Salido, G. & Madrid, J. (1992). Circadian rhythms in glutathione and glutathione-S transferase activity of rat liver. *Arch.Int.Physiol.Bioch. Biophys.*, 100:83-87.
 82. Uhlig, S. & Wendel, A. (1992). The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sc.*, 51(14):1083-1094.
 83. Uysal, M.; Kutalp, G. & Seçkin, S. (1988). The effect of cholesterol feeding on lipid peroxide; glutathione; glutathione peroxidase and glutathione transferase in the liver of rats. *Internat.J.Vit.Nutr.Res.*, 58:339-342.
 84. Vande Waa, E.; Campbell, C.; O'Leary, K. & Tracy, J. (1993). Induction of *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase by xenobiotics. *Arch.Biochem.Biophys.*, 303(1):15-21.
 85. Véricel, E.; Narce, M.; Ulmann, L.; Poisson, J. & Lagarde, M. (1994). Age-related changes in antioxidant defense mechanisms and peroxidation in isolated hepatocytes from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Mol.Cell.Bioch.*, 132:25-29.
 86. Vickers, A. (1994). Use of human organ slices to evaluate the biotransformation and drug-induced side-effects of pharmaceuticals. *Cell.Biol.Toxicol.*, 10:407-414.
 87. Vos, R.; Ommen, B.; Hoekstein, M.; De Goede, J. & Van Bladeren, P. (1989). Irreversible inhibition of rat hepatic glutathione S-transferase isoenzymes by a series of structurally related quinones. *Chem.Biol.Interactions*, 71:381-382.
 88. Vos, R. & Van Bladeren, P. (1990). Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem.Biol.Interactions*, 75:241-265.
 89. Watkins, J. & Klaasen, C. (1986). Xenobiotic biotransformation in livestock: comparison to other species commonly used in toxicity testing. *J.Anim.Sci.*, 63:933-942.
 90. Waxman, D. (1990). Glutathione S-Transferases: role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy. A review. *Cancer Res.*, 50:6649-6454.
 91. Weber, G. & Waxman, D. (1993). Denitrosation of the Anti-Cancer Drug I, 3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea Catalyzed by Microsomal Glutathione S-Transferase and Cytochrome P450 Monooxygenases. *Arch.Bioch.Biophys.*, 307(2):369-378.
 92. Wheatley, J.; Montali, J. & Schmidt, D. (1994). Coupled affinity-reversed-phase high-performance liquid chromatography systems for the measurement of glutathione S-transferases in human tissues. *J.Chromat. A.*, 676:65-79.
 93. Wheatley, J.; Hughes, B.; Bauer, K. & Schmidt, D. (1994). Study of chromatographic parameters for glutathione S-transferases on an high-performance liquid chromatography affinity stationary phase. *J.Chromat. A.*, 676:81-90.
 94. Wisniewski, J.; Moody, D.; Hammock, B. & Shull, L. (1987). Interlobular distribution of hepatic xenobiotic-metabolizing enzyme activities in cattle; goats and sheep. *J.Anim.Sci.*, 64:210-215.
 95. York, J. & Wolff, G. (1994). Glutathione S-Transferase Activity and Isoenzyme Concentrations in Obese Ayy/a and Lean a/a Mice (43696). *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 205:186-189.
 96. Zhang, L.; Xiao, Y. & Priddy, R. (1994). Increase in placental glutathione S-transferase in human oral epithelial dysplastic lesions and squamous cell carcinomas. *J.Oral Pathol.Med.*, 23:75-79.
 97. Zieper, M.; Zhang, L.; Priddy, R. & Xiao, Y. (1994). The expression of placental glutathione S-transferase (GST-Pi) in human normal salivary glands and tumors. *Int.J.Oncol.*, 5:961-966.



Prondil

Laboratorio Prondil S.A.
Barros Arana 5402
Tel.(598-2) 53 32 54
Fax: (598-2) 53 32 52
Montevideo-URUGUAY