

Influence of glutathione s-transferase on the ototoxicity caused by aminoglycosides

Influência dos polimorfismos da glutathione s-transferase na ototoxicidade dos aminoglicosídeos

Bruna Palodetto ¹, Mariana Postal ², Carlos Roberto Escrivão Grignoli ³, Edi Lúcia Sartorato ⁴, Camila Andréa de Oliveira ⁵

Keywords:

aminoglycosides,
molecular biology,
oxidative stress,
hearing loss,
genetic polymorphism.

Abstract

The process of hair cell damage and death as a result of exposure to noise and ototoxins seems to be mediated by reactive oxygen species. **Aim:** To investigate the relationship between genetic polymorphisms in the Glutathione S-transferase and the susceptibility to hearing loss induced by aminoglycosides. **Materials and Methods:** Null genotypes were analyzed by multiplex-PCR in the DNA samples from 50 patients and 72 controls. The patients were divided into 3 groups, 10 with hearing loss using aminoglycosides (group A), 20 with hearing loss without exposure to the drug (group B) and 20 hearing individuals who used the antibiotic (group C). **Study Design:** Experimental. **Results:** Polymorphisms in the GSTM1 and GSTT1 genes were found in 16% and 42% of patients and in 18% and 53% of the control group, respectively. After statistical analysis no significant difference was observed between the control groups and A ($p=0.86$) and ($p=0.41$), controls and B ($p=0.27$) and ($p=0.24$), controls and C ($p=0.07$) and ($p=0.47$), controls and A + C ($p=0.09$) and ($p=0.47$), C and A ($p=0.32$) and ($p=0.75$), GSTT1 and GSTM1, respectively. **Conclusion:** Our data show that polymorphisms in GSTM1 and GSTT1 genes have no influence on the ototoxicity of aminoglycosides.

Palavras-chave:

aminoglicosídeos,
biologia molecular,
estresse oxidativo,
perda auditiva,
polimorfismo genético.

Resumo

O processo de morte e danos em células ciliadas devido à exposição ao ruído e ototoxinas parece ser mediado por espécies reativas de oxigênio. **Objetivo:** Investigar a relação entre polimorfismos gênicos na Glutathione S-transferase e a susceptibilidade à deficiência auditiva induzida pelos aminoglicosídeos. **Casística e Método:** Genótipos nulos foram analisados por PCR-multiplex em amostras de DNA de 50 pacientes e 72 controles. Os pacientes foram divididos em três grupos, sendo 10 com deficiência auditiva e uso de aminoglicosídeos (grupo A), 20 com deficiência auditiva sem exposição à droga (grupo B), e 20 ouvintes que utilizaram o antibiótico (grupo C). **Forma de Estudo:** Experimental. **Resultados:** Polimorfismos nos genes GSTT1 e GSTM1 foram encontrados em 16% e 42% dos pacientes e em 18% e 53% do grupo controle, respectivamente. Após a análise estatística nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos controle e A ($p=0,86$) e ($p=0,41$), controle e B ($p=0,27$) e ($p=0,24$), controle e C ($p=0,07$) e ($p=0,47$), controle e A+C ($p=0,09$) e ($p=0,47$), C e A ($p=0,32$) e ($p=0,75$), GSTT1 e GSTM1, respectivamente. **Conclusão:** Nossos dados demonstram que polimorfismos na GSTT1 e GSTM1 não exercem influência sobre a ototoxicidade dos aminoglicosídeos.

¹ Graduação, Biomédica.

² Graduação, Biomédica.

³ Mestrado, Professor Adjunto, Centro Universitário Hermínio Ometto - UNIARARAS.

⁴ Livre Docente, Pesquisador do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, CBMEG - UNICAMP.

⁵ Doutorado, Professor Assistente do Núcleo de Ciências da Saúde, NUCISA - Centro Universitário Hermínio Ometto - UNIARARAS.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da BJORL em 3 de março de 2009. cod. 6298

Artigo aceito em 2 de abril de 2009.

INTRODUÇÃO

São muitos os fatores responsáveis pela deficiência auditiva (DA), podendo ser de origem ambiental, devido a infecções, ruídos e agentes ototóxicos, que lesam o nervo auditivo, ou genética¹. Dentre os casos genéticos, acredita-se que mais de 100 genes estejam envolvidos na etiologia da deficiência auditiva neurossensorial não-sindrômica².

Espécies reativas de oxigênio (EROS) estão envolvidas em um número cada vez maior de patologias, incluindo, em menor frequência, a perda da audição. No entanto, o estresse oxidativo está fortemente relacionado com as deficiências auditivas adquiridas pela ação ototóxica dos aminoglicosídeos ou induzidas pelo ruído. Nesses casos, os compostos tóxicos são convertidos em radicais hidroxilas altamente destrutivos, ocasionando a morte de células ciliadas da cóclea³. Porém, em processos metabólicos normais, importantes EROS (ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila) também são geradas durante a redução de O₂ e H₂O. Dessa forma, enzimas pertencentes ao sistema antioxidante, que atuam no metabolismo das glutatonas e na decomposição dos ânions superóxido e peróxido de hidrogênio, são ativadas na tentativa de neutralizar essas moléculas que potencialmente danificam o tecido coclear⁴.

As glutatonas (GSH) detoxificam uma variedade de substâncias exógenas e endógenas tanto por vias não-enzimática, como por conjugação enzimática de metabólitos catalisada pela glutatona S-transferase (GST)⁵. As GSTs são divididas em oito classes gênicas que codificam enzimas citosólicas e genes microsossomais: α (GSTA), μ (GSTM), π (GSTP), θ (GSTT), z (GSTZ), σ (GSTS), ω (GSTO) e κ (GSTK)⁶. As enzimas GST possuem afinidades diferentes a vários substratos e são encontradas em diferentes níveis em muitos tecidos⁷.

Em humanos, duas dessas subclasses, GSTM1 e GSTT1, apresentam variabilidade genética. Cerca de 30-50% dos indivíduos apresentam genótipo nulo para o gene GSTM1, dependendo da etnia⁸ e 25-40% carregam o genótipo nulo do gene GSTT1⁹. Indivíduos que apresentam genótipo nulo não conjugam metabólitos ou toxinas específicas para essas enzimas, aumentando, assim, a susceptibilidade a danos causados pelo estresse oxidativo e possivelmente a deficiência auditiva induzida pelo ruído¹⁰.

Alterações no sistema antioxidante e o aumento do estresse oxidativo podem potencializar as respostas toxicológicas pela redução das glutatonas. Isso indica que os radicais gerados modulam a atividade e a expressão das enzimas antioxidantes¹¹. Na cóclea, as atividades antioxidantes desempenham um papel crucial para a redução dos danos ocasionados por drogas ototóxicas, ruídos e envelhecimento. In vitro, a gentamicina forma um complexo com o ferro, produzindo radical livre¹². Similarmente, in vivo, aumenta os níveis de peróxido dos lipídeos¹³. Em

cultura de células ciliadas externas, a glutatona impede a citotoxicidade induzida pela gentamicina e atenua a perda auditiva induzida pelo antibiótico em animais subnutridos¹⁴. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade genética dos genes GSTM1 e GSTT1 e a susceptibilidade ototóxica dos antibióticos aminoglicosídeos em indivíduos ouvintes e com deficiência auditiva.

CASUÍSTICA E MÉTODO

Seleção dos grupos

O estudo foi realizado em indivíduos com deficiência auditiva (DA) que utilizaram, ou não, antibióticos ototóxicos aminoglicosídeos, e em recém-nascidos ouvintes, prematuros e de alto risco que permaneceram no mínimo 48 horas em UTI neonatal e foram expostos ao antibiótico. Os pacientes foram divididos em três grupos: grupo A, indivíduos com deficiência auditiva e que utilizaram aminoglicosídeos (n=10); grupo B, com deficiência auditiva e que não utilizaram aminoglicosídeos (n=20); e grupo C, ouvintes que utilizaram aminoglicosídeos (n=20). O grupo controle foi composto de 72 indivíduos da população geral selecionados aleatoriamente.

Análise Molecular dos genes GSTM1 e GSTT1

Amostras de DNA genômico foram extraídas a partir de sangue periférico após obtenção do Termo de Consentimento Livre Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética (Parecer nº 484/2006). Para extração de DNA dos indivíduos da população geral foi utilizado o reagente DNAzol, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen®). Nas amostras dos demais grupos foi utilizado o método padrão fenol-clorofórmio.

As sequências polimórficas nos genes GSTM1 e GSTT1 foram determinadas por PCR-multiplex incluindo o gene da b-globina como controle interno de amplificação de 630pb¹⁵. A reação foi realizada utilizando 200 a 500ng de DNA genômico, 10mM de solução contendo desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20pmol/ml dos primers do gene b-globina, 10pmol/ml de cada primer dos genes GST; 2,5U de Taq DNA polimerase; tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 3mM de MgCl₂, em um volume final de 50ml. As condições de PCR-multiplex se deram por uma desnaturação inicial a 95°C por 3min seguido de 35 ciclos (95°C por 1min; 60°C por 1min; 72°C por 1min) e uma extensão final a 72°C por 10min. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, sendo que o genótipo nulo (ambos os alelos com deleção) para os genes GSTT1 e GSTM1 foi identificado pela ausência dos fragmentos de amplificação de 480pb e 273pb, respectivamente (Figura 1).

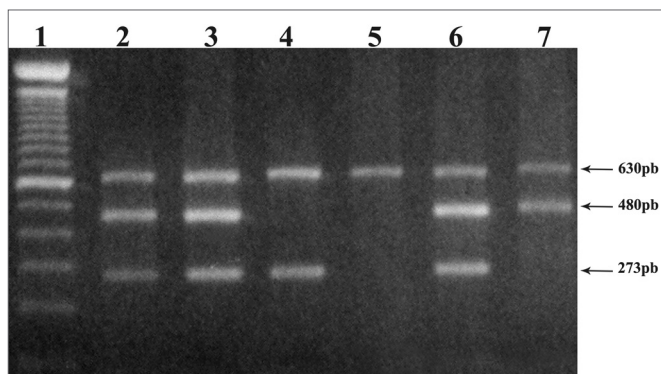


Figura 1. Detecção dos genótipos nulos GSTM1 e GSTT1. Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando os produtos de PCR-multiplex de 273bp e 480pb, correspondendo . presença do alelo normal dos genes GSTM1 e GSTT1, respectivamente. O fragmento de 630pb representa o controle interno de amplificação. (1) - marcador de peso molecular (100pb); (2,3,6) - indivíduos com alelos GSTM1 e GSTT1 normais, (4) - indivíduo com alelo nulo para o gene GSTT1, (5) - indivíduo com alelo nulo combinado para os genes GSTM1 e GSTT1, (7) - indivíduo com alelo nulo para o gene GSTM1.

Análise Estatística

As diferenças de significância estatística entre os grupos foram calculadas por χ^2 seguida de correção de Yates com nível de significância de 5% (valores de $p \leq 0,05$ são considerados significantes).

RESULTADOS

Os genótipos foram agrupados pela normalidade da audição, presença de deficiência auditiva e exposição aos antibióticos aminoglicosídeos. O genótipo nulo GSTT1 foi encontrado em 16% (08 de 50) dos pacientes e em 18% (13 de 72) dos indivíduos controles ($p= 0,009$).

Tabela 1. Genótipos nulos dos genes GSTT1 e GSTM1 em indivíduos controles, e em pacientes com e sem exposição aos aminoglicosídeos.

Genótipos*	Grupo A (n=10)	Grupo B (n=20)	Grupo C (n=20)	Controle (n=72)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
GSTM1				
Positivo [+]	6 (60)	12 (60)	11 (55)	34 (47)
Nulo [-]	4 (40)	8 (40)	9 (45)	38 (53)
GSTT1				
Positivo [+]	8 (80)	17 (85)	13 (65)	59 (82)
Nulo [-]	2 (20)	3 (15)	7 (35)	13 (18)
Combinados GSTM1/ GSTT1				
[-]/[-]	2 (20)	0 (0)	4 (20)	6 (9)
[+]/[+]	6 (60)	9 (45)	8 (40)	27 (37)
[+]/[-]	0 (0)	3 (15)	3 (15)	7 (10)
[-]/[+]	2 (20)	8 (40)	5 (25)	32 (44)

[-]: genótipo nulo; [+]: genótipo não nulo.

Alelos nulos GSTM1 foram encontrados em 21 (42%) dos 50 pacientes estudados e em 38 (53%) indivíduos da população geral ($p= 0,049$). A frequência dos genótipos homocigotos GSTT1 e GSTM1 foi significativamente menor nos pacientes avaliados quando comparados com os indivíduos controles.

A frequência dos genótipos nulos GSTT1 e GSTM1 e a comparação dos resultados entre os grupos estão demonstrados na Tabela 1. No entanto, nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre os grupos controle e A ($p= 0,86$) e ($p= 0,41$), controle e B ($p= 0,27$) e ($p= 0,24$), controle e C ($p= 0,07$) e ($p= 0,47$), controle e A+C ($p= 0,09$) e ($p= 0,47$), C e A ($p= 0,32$) e ($p= 0,75$), GSTT1 e GSTM1, respectivamente.

DISCUSSÃO

Reações detoxificantes e antioxidantes relacionadas às glutatônicas são essenciais para a proteção intracelular. Sabe-se, contudo, que o tratamento com algumas drogas e a ação do tempo afetam esse sistema de defesa na orelha interna de mamíferos. A exposição ao ruído e o tratamento com gentamicina não afetam os níveis de glutatona nos tecidos. No entanto, o sistema antioxidante está sendo influenciado pelo envelhecimento e pelo uso de cisplatina¹⁶.

Muitos estudos sugerem, ainda, que a atividade antioxidante pode interferir na susceptibilidade da perda auditiva. Há relatos de polimorfismos genéticos na GSTM1 que atuam contra a ototoxicidade da droga cisplatina¹⁷, além de demonstrar um aparente efeito protetor nas células ciliadas externas em indivíduos expostos ao ruído¹⁰. Nesse caso, indivíduos com genótipo nulo para o gene GSTM1, na emissão otoacústica, apresentaram menor amplitude

para altas frequências quando comparados a indivíduos sem polimorfismos nesse gene. Por outro lado, em outro estudo, não foi demonstrada nenhuma evidência, de que a variabilidade genética do sistema antioxidante predomine sobre outros fatores potenciais na susceptibilidade à perda auditiva induzida pelo ruído¹⁸.

A disponibilidade de informações sobre os polimorfismos GSTT1 e GSTM1 na população brasileira ainda é escassa¹⁹. Em um estudo realizado na população brasileira proveniente dos estados do Pará e São Paulo, mostraram frequências de 18% e 47,3% para os genótipos nulos dos genes GSTT1 e GSTM1, respectivamente²⁰. Neste trabalho, as frequências encontradas foram semelhantes, genótipo nulo GSTT1 foi de 16% e de GSTM1 foi de 42%. No entanto, não há dados descritos na literatura de que polimorfismos da glutathione S-transferase (GSTT1 e GSTM1) estejam associados com a susceptibilidade à perda auditiva induzida pelos aminoglicosídeos.

Sabe-se, no entanto, que inúmeros fatores ambientais podem ocasionar a perda da audição e que a glutathione S-transferase tem um importante papel na defesa contra o estresse oxidativo causado por esses fatores.

CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem fortemente que os genótipos nulos GSTT1 e GSTM1 não estão correlacionados com a deficiência auditiva induzida pela utilização de aminoglicosídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet.* 1998;7(10):1589-97.
2. Sobe T, Vreugde S, Shahin H, Berlin M, Davis N, Kanaan M, et al. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet.* 2000;6:50-1.
3. Jacono AA, Hu B, Kopke RD, Henderson D, Van De Water TR, Steinman HM. Changes in cochlear antioxidant enzyme activity after sound conditioning and noise exposure in the chinchilla. *Hear Res.* 1998;117:31-8.
4. Clerici WJ, Yang L. Direct effects of intraperilymphatic reactive oxygen species generation on cochlear function. *Hear Res.* 1996;101:14-22.
5. Meister A, Anderson ME. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci.* 1983;80:707-11.
6. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res.* 2001;482:21-6.
7. Wang L, Groves MJ, Hepburn MD, Bowen DT. Glutathione S-transferase enzyme expression in hematopoietic cell lines implies a differential protective role for T1 and A1 isoenzymes in erythroid and for M1 in lymphoid lineages. *Haematologica.* 2000;85:573-9.
8. Losi-Guembarovski R, Colus IMS. Glutathione S-transferase M1 (GSTM-1): Distribuição étnica e relação com câncer. *Ci Biol Saúde.* 2001;22:3-9.
9. Pemble S, Schroeder K, Spencer S, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): DNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J.* 1994;300:271-6.
10. Rabinowitz PM, Pierce Wise J Sr, Hur Mobo B, Antonucci PG, Powell C, Slade M. Antioxidant status and hearing function in noise-exposed workers. *Hear Res.* 2002;173:164-71.
11. Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol Ther.* 1991;51(2):155-94.
12. Priuska EM, Schacht J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(11):1749-52.
13. Sadzuka Y, Shoji T, Takino Y. Effect of cisplatin on the activities of enzymes which protect against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 1992;43(8):1872-5.
14. Lautermann J, McLaren J, Schacht J. Glutathione protection against gentamicin ototoxicity depends on nutritional status. *Hear Res.* 1995;86:15-24.
15. Arruda VR, Lima CS, Grignoli CR, de Melo MB, Lorand-Metze I, Alberto FL, et al. Increased risk for acute myeloid leukaemia in individuals with glutathione S-transferase mu1 (GSTM1) and theta1 (GSTT1) gene defects. *Eur J Haematol.* 2001;66(6):383-8.
16. Lautermann J, Crann SA, McLaren J, Schacht J. Glutathione-dependent antioxidant systems in the mammalian inner ear: effects of aging, ototoxic drugs and noise. *Hear Res.* 1997;114:75-82.
17. Peters U, Preisler-Adams S, Hebeisen A, Hahn M, Seifert E, Lanvers C, et al. Glutathione S-transferase genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Anticancer Drugs.* 2000;11(8):639-43.
18. Carlsson P, Laer LV, Borg E, Bondeson ML, Thys M, Fransen E, et al. Influence of genetic variation in oxidative stress genes on human noise susceptibility. *Hear Res.* 2005;202:87-96.
19. Rossit ARB, Cabral IR, Conforti-Froes NDT. Avaliação das frequências alélicas de genes do biometabolismo em uma população brasileira. *Genet Mol Biol.* 1999;22:23.
20. Rebbeck T. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6:733-43.