

Diversidad e implicaciones de los polimorfismos de las enzimas glutatión S transferasas en la patogénesis del asma

Diversity and implications of glutathione S-transferase enzymes polymorphisms in the pathogenesis of asthma

Yosed Anaya Chávez, Biol*

Beatriz Martínez, MSc**

Resumen

Las glutatión S-transferasas (GST) representan una superfamilia de enzimas presentes en todos los organismos aerobios. Existen tres familias principales que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se clasifican en citosólicas, mitocondriales y microsomales de acuerdo con su localización en la célula. Existen polimorfismos en los genes de estas enzimas los cuales se han encontrado asociados con enfermedades como el asma bajo los efectos de los contaminantes ambientales. La distribución de la frecuencia de estos polimorfismos varía en las distintas poblaciones y por ende la susceptibilidad de los individuos frente a las enfermedades relacionadas con ellos. Teniendo en cuenta la importancia de los polimorfismos en las GST y su relación con enfermedades de tipo respiratorio, se hace una revisión teórica actualizada acerca de las propiedades y funciones de estas enzimas, descripción de los polimorfismos genéticos y metodologías usadas para su genotipificación, así como la participación de los mismos en la patogénesis del asma. [Anaya Y, Matínez B. *Diversidad e implicaciones de los polimorfismos de las enzimas Glatatión S transferasas en la patogénesis del Asma. MedUNAB 2011; 14:48-57*].

Palabras claves: Detoxificación, Asma, Glutatión S-transferasas, Contaminantes ambientales, Glutatión, Polimorfismo.

Introducción

El asma es una enfermedad crónica que se caracteriza por una respuesta inflamatoria con obstrucción reversible en las vías respiratorias. Hay evidencia de que existe una predisposición genética que contribuye con su aparición al igual que la participación de un componente ambiental, por lo que se cataloga como una enfermedad compleja y multifactorial.^{1, 2} Actualmente, los estudios genéticos

Summary

The glutathione S-transferases (GST) represent a superfamily of enzymes present in all aerobic organisms. There are three main families that are widely distributed in nature and are classified into cytosolic glutathione s transferases, mitochondrial and microsomal according to their location in the cell. Polymorphisms reported in the genes encoding these enzymes have been associated with the onset of diseases such as asthma under the influence of environmental contaminants. The frequency distribution of these polymorphisms is different in the populations and therefore the susceptibility of individuals to the diseases associated with them. Given the importance of polymorphisms in GST and their relation with the respiratory diseases, we present a theoretical review updates on the properties and functions of glutathione S transferases, description of genetic polymorphisms and methodologies used for genotyping, as well as their participation in the pathogenesis of asthma. [Anaya Y, Martínez B. *Diversity and implications of glutathione S-transferases enzymes polymorphisms in the pathogenesis of asthma. MedUNAB 2011; 14: 48-57*].

Key words: Detoxification, Asthma, Glutathione S-transferases, Air pollutants, Glutathione, Polymorphism.

revelan que muchas regiones cromosómicas como 1p, 1q, 3p, 9q, 17q, 5q y 17p contienen genes de susceptibilidad asociados con varios fenotipos asmáticos, dentro de estos genes se encuentran los que codifican las enzimas glutatión S-transferasas (GST) ya que dichos polimorfismos afectan la actividad antioxidante de estas proteínas.³⁻⁵ Por consiguiente, los individuos que carecen de esta vía interna de defensa contra agentes tóxicos son susceptibles de desarrollar la enfermedad.

* Instituto de Investigaciones Inmunológicas; Estudiante Maestría en Inmunología, Universidad de Cartagena, Cartagena. Colombia.

** Profesor Asociado; Jefe del Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

Correspondencia: Dra. Beatriz Martínez. Calle de la Tablada 7-57, San Diego, Cartagena, Colombia. E-mail: beatri23@yahoo.com

Artículo recibido: 23 de Junio de 2010; artículo aceptado, 22 de febrero de 2011.

Algunos contaminantes ambientales como el ozono favorecen el proceso inflamatorio que se desarrolla en el asma, ya que estos compuestos aumentan el estrés oxidativo en las vías respiratorias, lo que induce la formación de radicales libres que contribuyen con el desprendimiento del epitelio.^{6, 7} Este fenómeno también facilita la sensibilización con alérgenos, desencadenando de esta forma la cronicidad del proceso. Dentro de los mecanismos que la célula utiliza para evitar estos daños se encuentran las enzimas GST capaces de catalizar la conjugación del glutatión con el agente oxidante y facilitar así su excreción de la célula.⁸

En la presente revisión se recopila información reciente acerca de las propiedades y funciones de estas enzimas, descripción de los polimorfismos genéticos y metodologías usadas para su genotipificación. Por último, se resalta la participación de los mismos en la patogénesis del asma. La elaboración de esta revisión se hizo realizando una amplia búsqueda de artículos científicos relacionados con los ejes temáticos planteados en el texto, almacenados en las bases de datos Pubmed e Hinari. Además, los artículos se eligieron teniendo en cuenta su año de publicación con el propósito de realizar una revisión lo más actualizada posible.

Generalidades

Los seres vivos están expuestos continuamente a sustancias químicas que en su mayoría son tóxicas, y la capacidad de resistir a éstas representa una adaptación biológica fundamental para su sobrevivencia.⁹ Los mecanismos bioquímicos de protección contra estos agentes nocivos han ido evolucionado con el tiempo (biotransformación) y dentro de estos encontramos las enzimas GST que juegan un papel importante, puesto que son capaces de metabolizar un amplio rango de estructuras químicas al catalizar la conjugación del glutatión reducido con compuestos electrolíticos como carcinógenos, toxinas ambientales y productos del estrés oxidativo.

La conjugación del glutatión representa el primer paso para la síntesis del ácido mercaptúrico, un importante producto de excreción identificado inicialmente en la orina de animales tratados con bromo benceno. El conjugado formado es soluble en agua y puede ser eliminado de la célula por la acción de proteínas de resistencia a múltiples drogas (MRP).^{9,11}

Las GST representan una superfamilia de enzimas presentes en todos los organismos aerobios. Existen tres familias principales que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. De acuerdo con su localización celular se clasifican en citosólicas, mitocondriales y microsomales o MAPEG. Además son expresadas en células del hígado, pulmón, corazón, intestino, eritrocitos y linfocitos.^{8, 12} Por otra parte, estas enzimas se han encontrado implicadas en la

síntesis de ligandos que se acoplan a receptores de superficie celular y en la inhibición de los mismos. De igual forma, este tipo de enzimas puede interactuar con proteínas tipo quinasas que participan en las vías de transducción de señales.¹³

Dentro de las GST, la familia más compleja y ampliamente estudiada es la citosólica; éstas son proteínas diméricas con subunidades que van desde 199 a 244 aminoácidos de longitud. De acuerdo con la homología en la secuencia de aminoácidos, especificidad del sustrato y el punto isoeléctrico, se han agrupado en cinco clases designadas como GSTA (), GSTM (μ), GSTP (), GSTT () y GSTO () cuyos genes se encuentran localizados en los cromosomas 6p12, 1q13.3, 11q13, 22q11.2, y 10q24.3, respectivamente.^{12, 13} Cada una de las clases de GST presentan distintas isoformas codificadas por varios genes: la clase α está codificada por GSTA1, GSTA2, GSTA3 y GSTA4;¹² la clase μ por el gen GSTP1, mientras que la clase π consiste de dos genes como GSTT1 y GSTT2.^{12, 14} De igual forma, la clase μ está codificada por cinco genes que dan lugar a distintas isoformas como son GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 y GSTM5.¹⁵

Polimorfismos en las GST

Los genes que codifican las enzimas GST son polimórficos; esas variantes han sido asociadas con aumento en la susceptibilidad a enfermedades inflamatorias como el asma, alergias y artritis reumatoide, además con el riesgo a padecer diversos tipos de cáncer como: tiroides,^{16,17} mama,¹⁸ pulmón o próstata,¹⁹ así como con enfermedades cardiovasculares,²⁰ entre otras.

Dentro de los polimorfismos mejor estudiados se encuentran las delecciones de los genes GSTM1 y GSTT1 (llamadas comúnmente alelo nulo), así como un polimorfismo tipo SNP presente en el gen GSTP1. Recientemente, los polimorfismos en los genes pertenecientes a la familia Omega están despertando el interés de los investigadores ya que también se han encontrado asociaciones significativas de estas variantes con enfermedades.^{21, 22} Adicionalmente, variantes funcionales presentes en los genes GSTA1 y GSTA2, influyen notablemente en la actividad y en la cantidad de las proteínas codificadas por los mismos y cumplen una función fundamental en el hígado.^{23, 24} Los diversos tipos de polimorfismos que han sido descritos hasta la fecha en los genes de las GST se pueden observar en la tabla 1.

El gen que codifica la enzima GSTM1 se encuentra localizado en el cromosoma 1p13.3 del humano.¹⁵ Este gen presenta diversos tipos de polimorfismos que han sido caracterizados, los cuales incluyen cambios en una sola base nitrogenada originando los alelos GSTM1*A y GSTM1*B, duplicaciones del gen GSTM1*1x2 y una

Tabla 1. Tabla 1. Tipos de polimorfismos encontrados en las enzimas GST. Modificado de Hayes y McLellan.⁹

Clase	Gen	Alelo	Alteraciones en la secuencia nucleotídica	Proteína o aminoácido afectado*
Alfa ()	GSTA2	GSTA2*A GSTA2*B	C335, A629 G335, C629	Thr ¹¹² , Glu ²¹⁰ Ser ¹¹² , Ala ²¹⁰
Mu (μ)	GSTM1	GSTM1*A GSTM1*B GSTM1*0 GSTM1*1x2	G519 C519 Delección del gen Duplicación del gen	Lys ¹⁷³ Asn ¹⁷³ No proteína Sobrexpresión
		GSTM3	Tipo silvestre Delección en intrón 6	Proteína normal Estructura primaria alterada.
	GSTM4	GSTM4*A GSTM4*B	Tipo silvestre Cambios en intrones	Proteína normal Ningún cambio
Pi ()	GSTP1	GSTP1*A GSTP1*B GSTP1*C GSTP1*D	A313, C341, C555 G313, C341, T555 G313, T341, T555 A313, T341	Ile ¹⁰⁵ , Ala ¹¹⁴ , Ser ¹⁸⁵ Val ¹⁰⁵ , Ala ¹¹⁴ , Ser ¹⁸⁵ Val ¹⁰⁵ , Val ¹¹⁴ , Ser ¹⁸⁵ Ile ¹⁰⁵ , Val ¹¹⁴
Teta ()	GSTT1	GSTT1*A GSTT1*0	Gen Delección del gen	Proteína normal No proteína
Zeta ()	GSTZ1	GSTZ1*A GSTZ1*B GSTZ1*C GSTZ1*D	A94, A124, C245 A94, G124, C245 G94, G124, C245 G94, G124, T245	Lys ³² , Arg ⁴² , Thr ⁸² Lys ³² , Gly ⁴² , Thr ⁸² Glu ³² , Gly ⁴² , Thr ⁸² Glu ³² , Gly ⁴² , Met ⁸²
Omega ()	GSTO1	GSTO1*A GSTO1*B GSTO1*C GSTO1*D	C419 C419, 464 delección A419 A419, delección 464	Ala ¹⁴⁰ Ala ¹⁴⁰ , delección Glu ¹⁵⁵ Asp ¹⁴⁰ Asp ¹⁴⁰ , delección Glu ¹⁵⁵
		GSTO2	GSTO2*A GSTO2*B	A424 G424
MAPEG	MGST1	MGST1*A	T598 (region no codificadora 3)	Proteína normal
		MGST1*B	G598 (region no codificadora 3)	ND
	LTC ₄ S	LTC ₄ S*A LTC ₄ S*B	A-444 (Promotor) C-444 (Promotor)	Proteína normal Sobrexpresión

* Posición del aminoácido en la secuencia que codifica la proteína.
ND: no determinado.

delección que da origen al genotipo identificado como GSTM1*0 o alelo nulo.^{23,25}

Los alelos GSTM1*A y GSTM1*B codifican para las proteínas GSTM1 A y GSTM1 B, las cuales son funcionalmente idénticas y difieren solo en un simple aminoácido. La enzima GSTM1*A contiene lisina en la posición 172,²⁶ mientras que GSTM1*B tiene asparagina en la misma posición.²⁷ La duplicación del gen GSTM1 ocurre

por un mal alineamiento de las cromátides hermanas, seguido por un evento de recombinación desigual entre ellas. El resultado de este fenómeno, es la generación de un gran segmento de ADN que contiene dos genes GSTM1 en tándem.²⁵

Estudios realizados en poblaciones caucásicas demuestran que la delección del gen GSTM1, que ocurre por una recombinación desigual entre dos regiones altamente

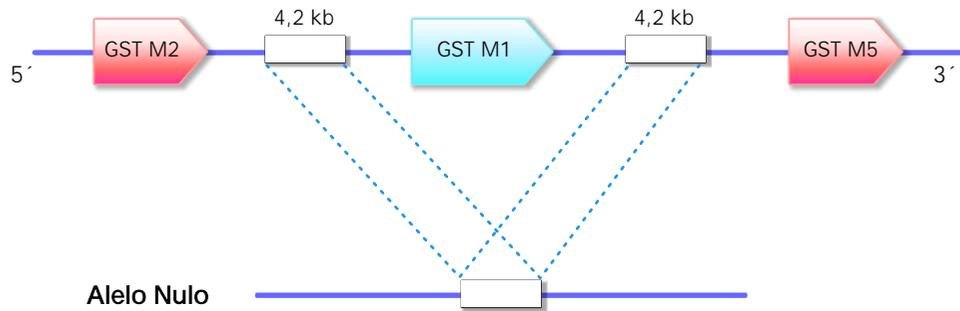


Figura 1. Mecanismo de la delección del gen GSTM1. Modificado de Timofeeva y cols.²⁹

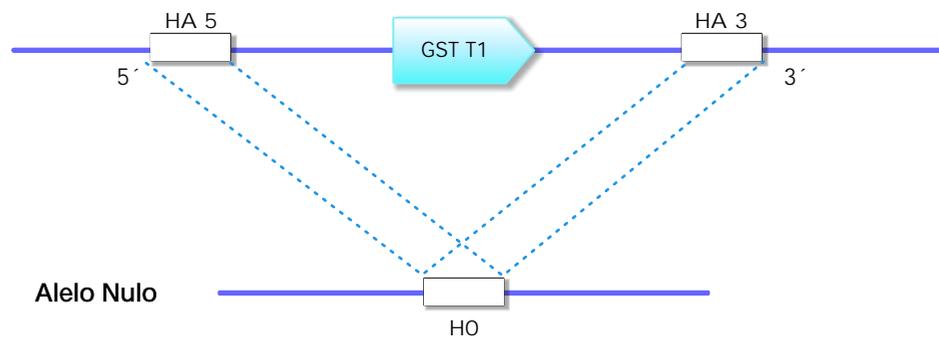


Figura 2. Mecanismo de la delección del gen GSTT1. Modificado de Sprenger y cols.³⁰

conservadas de 4.2 Kb que se ubican en los extremos 5' y 3' del gen respectivamente, lleva a la pérdida de un segmento de aproximadamente 18 Kb. La recombinación se produce por la unión de los dos segmentos repetidos que flanquean el gen, específicamente en una región “hot spot” de aproximadamente 23 Kb que no codifica para proteína (figura 1).^{15,28}

Esta delección de GSTM1 se caracteriza por una deficiencia de la enzima en los individuos. Es un polimorfismo poco frecuente comparado con los cambios de una sola base en el genoma, por lo cual se ha convertido en el objeto de estudio de muchas investigaciones. La técnica de PCR convencional ha permitido detectar la presencia y ausencia del gen, sin embargo, la discriminación entre los genotipos heterocigóticos GSTM1^{+/-} y homocigóticos GSTM1^{+/+} no ha sido posible sino por métodos de más alta resolución que describiremos más adelante.²⁸

Otro de los polimorfismos que ha sido ampliamente estudiado es la delección del gen GSTT1, la cual afecta la actividad de la enzima GSTT1. Este gen está ubicado en el cromosoma 22q11.2 humano, está formado por 5 exones y tiene una longitud de 8 Kb; se encuentra separado del gen GSTT2 por un segmento de ADN de aproximadamente 49,741 pb.³⁰ Al igual que ocurre con GSTM1, el gen sufre una delección debida a un proceso de recombinación homóloga entre dos segmentos de aproximadamente 18 Kb

los cuales se encuentran flanqueando a GSTT; dichos segmentos se caracterizan por tener más del 90% de homología en su secuencia (HA5 y HA3). Los puntos claves para que se dé la recombinación se encuentran ubicados, uno entre los genes GSTT2 y GSTT1, y el otro, corriente abajo del gen GSTT1. Cuando se produce la delección se forma entonces un segmento conocido como H0 que difiere en algunos nucleótidos de las dos secuencias homólogas que se están fusionando. Este polimorfismo en estado homocigoto (genotipo nulo) lleva a la pérdida total de la actividad enzimática y es detectado por la ausencia del fragmento que corresponde al gen una vez se amplifica mediante PCR la región donde se encuentra (figura 2).^{14,30}

Con respecto al gen GSTP1, este se encuentra localizado en el cromosoma 11q13 y codifica enzimas expresadas en tejido epitelial, con gran abundancia en el pulmón, esófago y placenta. Cuatro variantes han sido reportadas, las cuales corresponden a diferentes alelos: GSTP1*A (Ile105 – Val114), GSTP1*B (Val105 – Ala114), GSTP1*C (Val105 – Val114) y GSTP1*D (Ile105 – Val114). Los polimorfismos Ile105Val en el exón 5 y Ala114Val en el exón 6 fueron publicados inicialmente por Board y cols,³¹ quienes encontraron que estos cambios se presentan en el sitio activo de la enzima GSTP1. Además, estudios de expresión *in vitro* de ADNC sugieren que esta sustitución reduce la actividad de la enzima.³²

Metodologías utilizadas para la detección de los polimorfismos en las GST

Inicialmente, la técnica utilizada para la detección de los alelos nulos de GSTT1 y GSTM1 en su condición homocigótica (-/-) fue PCR convencional y electroforesis en geles de agarosa. Sin embargo, estas herramientas no permiten distinguir entre individuos homocigóticos (+/+) y heterocigóticos (+/-) que portan dichos genes. Teniendo en cuenta lo anterior, Roodi y cols en el 2004,²⁸ publicaron una metodología a través de la cual se logró establecer la diferencia entre los genotipos de GSTM1 mediante combinaciones de ensayos de PCR *long-range* y PCR *short-range*. A partir de cada una de esas reacciones de PCR se obtienen independientemente dos productos, un fragmento de ADN de 273 pb (PCR *short-range*) que indica la presencia del genotipo silvestre en la muestra y otro de 14 Kb (PCR *long-range*) que revela la delección del gen. Para la clasificación de los individuos en portadores del alelo nulo, heterocigóticos u homocigóticos, se compararon los productos resultantes de las dos amplificaciones realizadas en cada individuo, de modo que, en los individuos con el alelo nulo solo se observó la banda correspondiente al segmento de 14 Kb, en heterocigóticos los dos fragmentos (14 Kb y 273 pb) y finalmente en los homocigóticos para GSTM1 se visualizó la banda que corresponde al segmento de 273 pb. Posteriormente, Buchard y cols³³ desarrollaron una reacción de PCR múltiple/electroforesis en geles de agarosa al 1.5% que permite diferenciar si un individuo tiene una, dos o ninguna de las copias funcionales de los genes GSTM1 y GSTT1 y, adicionalmente, el polimorfismo A/G en GSTP1.

En la actualidad, la genotipificación de estos polimorfismos ha sido posible gracias a la aplicación de tecnologías de alto rendimiento como es la reacción de PCR en tiempo real, la cual permite cuantificar el número de copias de un gen de interés (CNV) dentro del genoma. La PCR en tiempo real es una técnica muy utilizada en diversos estudios de epidemiología molecular, su principal ventaja es que el producto generado se puede observar a medida que la amplificación progresa, eliminando así los análisis postPCR que se hacían en las metodologías anteriormente mencionadas.³⁴

La técnica se basa en el uso de una sonda de ADN doblemente marcada con fluorocromos en sus extremos, la cual es cortada por una Taq polimerasa con actividad 5'nucleasa durante la fase de extensión de la PCR. El fluorocromo en un extremo de la sonda funciona como reportero (i.e., 6-carboxyfluoresceína), cuya señal de fluorescencia es bloqueada por la señal del otro fluorocromo (apagador) ubicado en el otro extremo de la sonda (i.e., 6-carboxy-tetrametil rodamina). Durante la fase de extensión, la degradación de la sonda libera al apagador, lo que resulta en la emisión de una señal de fluorescencia por parte del reportero; esta señal es medida por un detector de fluorescencia. En cada ciclo de reacción de PCR, la señal

generada es proporcional a la cantidad del producto amplificado.³⁴

Esta técnica fue aplicada por Brasch-Andersen y cols,³⁵ quienes evaluaron el efecto dosis respuesta de las GST en una población de 100 individuos atópicos de la población Danesa. Los autores realizaron dos ensayos basados en PCR cuantitativa múltiple para detectar el número de copias de los genes GSTT1 y GSTM1. Estas pruebas se basaron en la amplificación y cuantificación de los genes con relación a un gen de referencia, que en este caso fue la albúmina. El valor de Ct (ciclo de detección del umbral) de cada gen candidato y del gen de referencia fue utilizado para calcular las CNV de los genes analizados (Ct). Además, el polimorfismo presente en el exón 5' del gen GSTT1 fue examinado empleando sondas fluorescentes TaqMan específicas para cada alelo. Esta metodología ha sido validada por Girault y cols³⁶ en una población de 29 caucásicos.

Recientemente, Timofeeva y cols,²⁹ realizando algunas modificaciones a esta metodología, consiguieron detectar las CNV de GSTT1 y GSTM1. Ambos genes son amplificados en un mismo tubo de reacción y se utiliza como control interno el gen de la albumina para normalizar la cantidad de ADN genómico en cada reacción. Los investigadores introdujeron un método de corrección de la eficiencia de la reacción para que la interpretación de los resultados sea más confiable y precisa. Por su parte, Norskov y cols³⁷ optimizaron el mismo método con el objetivo de aumentar el poder de resolución de la técnica y determinar las variaciones en el número de copias de los genes de glutatión s transferasas así como de otros genes. Para ello, realizaron la PCR múltiple en tiempo real, con la que fue posible detectar en la misma mezcla de reacción ambos genes, el endógeno (RNAsaP) y el gen blanco. Esto resulta en una considerable reducción del número de procedimientos por muestra, y en el aumento de la eficiencia de la técnica, ya que hace posible la determinación de más de 4,600 genotipos por día, mediante el uso de una plataforma de 384 celdas. El método de Ct fue utilizado para determinar los CNV de cada muestra.

Participación de las glutatión S transferasas en la patogénesis del asma

El asma es una enfermedad crónica que se caracteriza por hiperrespuesta bronquial, inflamación y obstrucción reversible de las vías respiratorias. Hay evidencia de que existe una predisposición genética que contribuye con su aparición al igual que un componente ambiental, por lo que se cataloga como una enfermedad compleja y multifactorial.^{1,2} Actualmente, los estudios genéticos revelan que muchas regiones del genoma humano contienen genes de susceptibilidad asociados con varios fenotipos asmáticos.^{4,5,38} Además, recientemente se ha encontrado que variaciones en los genes que codifican las enzimas glutatión s transferasas juegan un papel fundamental en la patogénesis

del asma,^{39,40} debido a que afectan la actividad antioxidante de estas enzimas; por lo tanto, en los individuos que carezcan de esta vía interna de defensa contra agentes tóxicos existe una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad.

Teniendo en cuenta que existen varios tipos de polimorfismos en los genes que codifican estas enzimas, los estudios genéticos se han centrado en ciertas variantes que están asociadas con características fenotípicas de la enfermedad. Chelbi y cols,⁴¹ por ejemplo, demostraron que los polimorfismos en GSTM1, GSTT1 y GSTP1 se encuentran asociados con asma y atopía en la población infantil de Túnez, África. Estos mismos ya habían sido reportados en poblaciones caucásicas y asiáticas. De igual forma, Brasch-Andersen y cols,³⁵ en un estudio basado en familias (TDT), confirman que el genotipo nulo para GSTT1 es un factor de riesgo para asma. Gilliland y cols⁴² también reportan que niños con la delección de GSTM1 y expuestos en el útero al humo del cigarrillo son más susceptibles al desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, los resultados que se han obtenido presentan ciertas inconsistencias, debido a que en algunas poblaciones como es el caso de la población china, la delección de GSTM1 está asociada con una disminución del riesgo a padecer asma.⁴³ Mapp y cols,⁴⁴ al evaluar una población de 131 individuos no relacionados procedentes del norte de Italia, encontraron que el genotipo homocigótico Val/Val105 en GSTP1 confiere un efecto protector contra el asma comparado con la variante Ile/Ile105. Estos resultados sugieren que los individuos que carecen de este genotipo, pueden con el tiempo mostrar procesos inflamatorios como consecuencia del remodelamiento de las vías respiratorias, conduciendo así a la aparición irreversible de los síntomas de la enfermedad por exposición prolongada a tolueno diisocianato, compuesto que es sensibilizador común de asma ocupacional.

Otros investigadores, como Spiteri y cols,⁴⁵ encontraron que una disminución en la frecuencia de la variante Val/Val105 en un estado homocigótico (con un incremento del homocigoto Ile/Ile) está relacionada con el aumento en la severidad de la inflamación en las vías respiratorias de pacientes atópicos. Sin embargo, estos datos no son consistentes con los reportados por Romieu y cols,⁴⁶ quienes evidencian que niños asmáticos con el alelo nulo GSTM1 y homocigóticos para Val en GSTP1, pueden ser más susceptibles al efecto que ejerce la exposición del ozono en sus pulmones. Imboden y cols⁴⁷ también encontraron que las variantes funcionales Val105 y un SNP que se encuentra en la región promotora del gen GSTP1 influyen en el desarrollo de asma y que Val105 junto con el genotipo nulo de GSTM1 son factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad en aquellos jóvenes que practican deporte en lugares con altos niveles de ozono. Además, se reportó que el genotipo Ile105Val también influye en la susceptibilidad al asma en un ambiente donde este gas está presente.⁴⁸ Imoden y cols⁴⁷ también reportaron que estos polimorfismos

están implicados en la disminución de la función del pulmón en la población caucásica, encontrando un 20% de la delección de GSTT1, 50% de la delección de GSTM1 y un 10% de portadores de las dos delecciones en esta población. Es de resaltar que en este último estudio, se detectó una diferencia entre los géneros femenino y masculino con respecto a la asociación de los polimorfismos en las glutatión s transferasas y los cambios relacionados con la edad en la función del pulmón. Estos resultados pueden ser atribuidos en parte a los patrones hormonales e inmunológicos específicos de cada sexo y a que el género femenino es más susceptible a la exposición de sustancias exógenas como el ozono.^{49,50}

Adicionalmente, estudios sobre el efecto que ejerce el ozono sobre el asma, indican que este contaminante promueve una migración de neutrófilos hacia las vías respiratorias inflamadas, tanto en individuos sanos como asmáticos.⁷ Además, se observa que los individuos asmáticos muestran posteriormente a la exposición, un incremento en la susceptibilidad a alérgenos inhalados. En la zona inflamada también se han encontrado células presentadoras de antígeno como monocitos y macrófagos, las cuales contribuyen a la exacerbación de la enfermedad.⁷ De igual forma, la exposición al ozono causa una significativa sobre regulación de moléculas de superficie celular asociadas con la inmunidad innata (mCD14, CD11b, CD16) y la presentación antigénica (CD86, HLA-DR) sobre los monocitos de las vías respiratorias.⁷ Acerca de esto, Lay y cols⁷ proponen que la presencia de estas células podría potenciar la respuesta inmune a contaminantes ambientales inhalados como los alérgenos. En los individuos atópicos que desarrollan una respuesta inmune mediada por IgE, el incremento en la presentación antigénica por parte de los monocitos puede promover la exacerbación del asma asociada con la exposición al ozono. Además, la desviación hacia el perfil TH2 mediada por esas células mononucleares podría promover un fenotipo alérgico en las vías respiratorias explicando en parte el efecto adyuvante del ozono sobre la respuesta a alérgenos inhalados en individuos con alergias.

A pesar de los estudios mencionados anteriormente, existen otros que reportan resultados contradictorios encontrados en otras poblaciones. Gilliland y cols,⁵¹ por ejemplo, reportaron que los niños con el genotipo nulo GSTM1 tienen un mayor riesgo de padecer síntomas respiratorios como sibilancia y desarrollar asma, cuando ellos son expuestos al humo del cigarrillo en el útero. Así mismo, en Taiwán Lee y cols⁵² reportaron que el genotipo nulo GSTM1 es un factor de riesgo para asma en dicha población. Por otra parte, Mak y cols⁴³ no encontraron asociación significativa entre los genotipos del gen GSTP1 y el riesgo a desarrollar asma y fenotipos relacionados en la población de Hong Kong, China. Finalmente, Nickel y cols,⁵³ al genotipificar las variantes Ile/Val 105 y Val/Val 114 en la cohorte "Multicenter Allergy Study and Asthmatic Children from Freiburg" no observaron asociación con asma bronquial o

hiperreactividad bronquial, por lo que concluyen que estas variantes no juegan un papel principal en el desarrollo de dichas enfermedades en los niños de Alemania.

Como vemos, existe controversia en los resultados encontrados en los estudios de asociación con los genes de las GST y enfermedades de tipo respiratorio, incluidos los nuestros. Estas variaciones pueden ser explicadas en parte por las interacciones particulares entre gen – gen y entre gen – ambiente que pueden estar ocurriendo en las poblaciones estudiadas. Es posible que el efecto de los polimorfismos evaluados en estos genes sea más evidente y detectable cuando hay una interacción con otros genes también implicados en las respuestas al estrés oxidativo. David y cols⁵⁴ muestran evidencias de esta interacción entre el genotipo nulo de GSTM1 y el polimorfismo Pro187Ser del gen NQO1 que está asociada en niños expuestos a altas concentraciones de ozono.

De igual forma, la función de una variante genética puede sufrir alteraciones de acuerdo con la intensidad de la exposición ambiental a la cual estén sometidos los individuos de una población. Esto pudiera explicar también las inconsistencias en los estudios ya que se sabe que los patrones de exposición a contaminantes ambientales en las poblaciones geográficamente distantes son diferentes. Estas interacciones gen-ambiente también pueden enmascarar el efecto de los genes, o por el contrario, hacer que los efectos de los mismos se revelen solo en presencia de una fuerte exposición oxidativa y, por lo tanto, no puedan ser detectados en las poblaciones.^{38,55}

GST y genética de poblaciones

Existe en la literatura un número moderado de estudios realizados en poblaciones distintas con el propósito de entender y aclarar el papel que desempeñan los polimorfismos presentes en los genes de las GST; sin embargo, los resultados de estas investigaciones revelan claras diferencias en las frecuencias alélicas. En un estudio realizado por Garter y cols⁵⁶ se observó que hay diferencias significativas en las frecuencias alélicas de los genotipos de las GST entre tres poblaciones principales; para el genotipo nulo de GSTM1, el promedio de las frecuencias eran de 50% a 58% en varias poblaciones caucásicas, 49% a 63% en asiáticos y de 20% a 33% en grupos africanos. Con respecto al alelo nulo de GSTT1, se ha reportado una frecuencia menor en caucásicos (27.6%) y significativamente mayor en asiáticos (64.4%).⁵⁷ Buchard y cols³³ encontraron que la distribución en la población Danesa fue significativamente diferente en comparación con las encontradas en los individuos de Somalia y Groenlandia, mientras que entre las dos últimas no hubo diferencia significativa.

Con respecto a los polimorfismos en GSTP1, Watson y cols⁵⁸ han reportado que la variante Ala114Val en el exón 6 del gen es menos común que Ile105Val en poblaciones

euroamericanas y afroamericanas, mientras que el alelo Ile105Val es más frecuente en poblaciones afroamericanas que en euroamericanas. Esto sugiere la posibilidad de que exista una susceptibilidad variable a la exposición a tóxicos o diferencias en la efectividad de los compuestos que son inactivados por la actividad de biotransformación de la GSTP1. De igual forma, se han podido observar diferencias intraétnicas debidas a la mezcla reciente que caracteriza la mayoría de las poblaciones actuales. Thoudam y cols⁵⁹ encontraron que la frecuencia de los alelos nulos de GSTM1 y GSTT1 es más alta en la población del noreste de India, donde encontraron que los porcentajes van desde 32.7% a 41.9%, respectivamente, comparada con las reportadas para las poblaciones del centro (12.4% y 35.4%), norte (19% y 12%) y del sur (16.8% y 30.3%) del país. Esta diferencia también fue observada cuando se compararon las frecuencias obtenidas de la combinación de ambos polimorfismos en las poblaciones. Los individuos del noreste de India difieren del resto de la población en cuanto a la distribución de los polimorfismos en las GST y estas diferencias podrían deberse a que dicha región es habitada principalmente por varias tribus nativas y emigrantes de países del sureste asiático, lo que hace que sea racial, lingüística y culturalmente distinta a los otros sectores de la India.

En América hay escasa información acerca de la frecuencia de los polimorfismos en las GST. Sin embargo, varios estudios han reportado que la frecuencia del alelo nulo de GSTM1 en nativos de Latinoamérica va desde un 0% a un 43%. Por otra parte, las frecuencias del alelo nulo de GSTT1 en Sur América van de 0% a un 38.2%, siendo más bajas que las encontradas en población asiática.⁵⁹

Las variaciones en las frecuencias alélicas encontradas entre los diferentes grupos étnicos podrían deberse a diferencias en la distribución de los genes de detoxificación en la población. Esta distribución no se da al azar sino que está influenciada por patrones tanto geográficos que son específicos, como étnicos. Además, la mezcla reciente que se presenta en las distintas poblaciones mundiales también contribuye en esas variaciones.⁵⁶ Teniendo en cuenta lo anterior, es necesario tipificar todos los polimorfismos de las glutatión S transferasas en las diferentes poblaciones para realizar los respectivos estudios de asociación con la enfermedad, y de esta manera se evitarían falsos positivos producto de la estratificación poblacional.

Conclusión

Las enzimas GST son mecanismos esenciales para los organismos aerobios ya que les permiten resistir a un amplio rango de compuestos tóxicos producto tanto del metabolismo interno de los individuos como del ambiente. Dentro de estos compuestos se encuentra el ozono, un fuerte contaminante ambiental que provoca inflamación en las vías respiratorias puesto que libera radicales libres que

dañan el tejido epitelial; este proceso se ve incrementado en individuos que presentan polimorfismos en estas enzimas detoxificadoras. Las variantes descritas en los genes de las GST (alelo nulo GSTT1 y GSTM1 y cambios de base en la secuencia de GSTP1), han sido relacionadas con el desarrollo de enfermedades en las vías respiratorias, tales como el asma, particularmente en personas que se encuentran bajo los efectos oxidativos que producen los contaminantes ambientales. Los polimorfismos en las GST presentan una distribución variable en las diferentes poblaciones, debido a la diversidad en la estructura genética y a patrones geográficos específicos a los cuales están sometidas las etnias en la actualidad.

La amplia información recopilada en esta revisión, permite concluir que los polimorfismos en las enzimas GST (GSTM1, GSTP1, GSTT1, GSTA1, GSTO2) son un gran factor de riesgo para el desarrollo de diversas patologías que afectan la salud de los individuos; por tanto, es indispensable investigar sobre el origen de este tipo de variaciones en los genes y la frecuencia con la cual estas se encuentran distribuidas en las poblaciones, ya que nos facilita entender las diferencias observadas en cuanto a la susceptibilidad a determinadas enfermedades en las distintas etnias y empezar a diseñar estrategias de tratamiento para éstas.

Referencias

- London SJ, Romieu I. Gene by environment interaction in asthma. *Annu Rev Public Health* 2009; 30:55-80.
- Martinez FD. Toward asthma prevention--does all that really matters happen before we learn to read? *N Engl J Med* 2003; 349:1473-5.
- Kabesch M. Novel asthma-associated genes from genome-wide association studies: what is their significance? *Chest* 2010; 137:909-15.
- Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:169-82.
- Holloway JW, Arshad SH, Holgate ST. Using genetics to predict the natural history of asthma? *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:200-9; quiz 210-1.
- Henricks PA, Nijkamp FP. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2001; 14:409-20.
- Lay JC, Alexis NE, Kleeberger SR, Roubey RA, Harris BD, Bromberg PA, et al. Ozone enhances markers of innate immunity and antigen presentation on airway monocytes in healthy individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:719-22.
- Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30:445-600.
- Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 1999; 31:273-300.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 2001; 360:1-16.
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 2003; 57:145-55.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:51-88.
- Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000; 61:154-66.
- Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994; 300:271-6.
- Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 1998; 273:3517-27.
- Ho T, Zhao C, Zheng R, Liu Z, Wei Q, Sturgis EM. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of differentiated thyroid carcinomas: a case-control analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 132:756-61.
- Morari EC, Leite JL, Granja F, da Assumpção LV, Ward LS. The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:1485-8.
- Rundle A, Tang D, Zhou J, Cho S, Perera F. The association between glutathione S-transferase M1 genotype and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in breast tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:1079-85.
- Mo Z, Gao Y, Cao Y, Gao F, Jian L. An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. *Prostate* 2009; 69:662-88.
- Manfredi S, Federici C, Picano E, Botto N, Rizza A, Andreassi MG. GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 detoxification gene polymorphisms and susceptibility to smoking-related coronary artery disease: a case-only study. *Mutat Res* 2007; 621:106-12.
- Piacentini S, Piacentini S, Moscatelli B, Re MA, Fucciarelli R, Manfellotto D, et al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms and air pollution as interactive risk factors for asthma in a multicentre Italian field study: A preliminary study. *Ann Hum Biol* 2008; 37:427-39.
- Polimanti R, Piacentini S, Moscatelli B, Pellicciotti L, Manfellotto D, Fucciarelli M. GSTA1, GSTO1 and GSTO2 gene polymorphisms in Italian asthma patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37:870-2.
- Tetlow N, PG Board. Functional polymorphism of human glutathione transferase A2. *Pharmacogenetics* 2004; 14:111-6.
- Morel F, Rauch C, Coles B, Le Ferrec E, Guillouzo A. The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter. *Pharmacogenetics* 2002; 12:277-86.
- McLellan RA, Oscarson M, Alexandrie AK, Seidegard J, Evans DA, Rannung A, et al. Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity. *Mol Pharmacol* 1997; 52:958-65.

26. DeJong JL, Chang CM, Whang-Peng J, Knutsen T, Tu CP. The human liver glutathione S-transferase gene superfamily: expression and chromosome mapping of an Hb subunit cDNA. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:8541-54.
27. Seidegard J, Pero RW. The hereditary transmission of high glutathione transferase activity towards trans-stilbene oxide in human mononuclear leukocytes. *Hum Genet* 1985; 69:66-8.
28. Roodi N, Dupont WD, Moore JH, Parl FF. Association of homozygous wild-type glutathione S-transferase M1 genotype with increased breast cancer risk. *Cancer Res* 2004; 64:1233-6.
29. Timofeeva M, Jäger B, Rosenberger A, Sauter W, Wichmann HE, KORA Study Group, et al. A multiplex real-time PCR method for detection of GSTM1 and GSTT1 copy numbers. *Clin Biochem* 2009; 42:500-9.
30. Sprenger R, Schlagenhauser R, Kerb R, ruhn C, Brockmüller J, Roots I, et al. Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics* 2000; 10:557-65.
31. Board PG, GC Webb, Coggan M. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Ann Hum Genet* 1989; 53:205-13.
32. Zimniak P, Nanduri B, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J, Singhal SS, Srivastava SK, et al. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 1994; 224:893-9.
33. Buchard A, Sanchez JJ, Dalhoff K, Morling N. Multiplex PCR detection of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 gene variants: simultaneously detecting GSTM1 and GSTT1 gene copy number and the allelic status of the GSTP1 Ile105Val genetic variant. *J Mol Diagn* 2007; 9:612-7.
34. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6:986-94.
35. Brasch-Andersen C, Christiansen L, Tan Q, Haagerup, Vestbo J, Kruse TA. Possible gene dosage effect of glutathione-S-transferases on atopic asthma: using real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers. *Hum Mutat* 2004; 24:208-14.
36. Girault I, Lidereau R, Bieche I. Trimodal GSTT1 and GSTM1 genotyping assay by real-time PCR. *Int J Biol Markers* 2005; 20:81-6.
37. Norskov MS, Frikke-Schimdt R, Loft S, Tybjaerg-Hansen A. High-throughput genotyping of copy number variation in glutathione S-transferases M1 and T1 using real-time PCR in 20,687 individuals. *Clin Biochem* 2009; 42:201-9.
38. von Mutius E. Gene-environment interactions in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:3-11; quiz 12-3.
39. London SJ. Gene-air pollution interactions in asthma. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:217-20.
40. Peden DB. The epidemiology and genetics of asthma risk associated with air pollution. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:213-9; quiz 220.
41. Hanene C, Jihene L, Jamel A, Kamel H, Agnès H. Association of GST genes polymorphisms with asthma in Tunisian children. *Mediators Inflamm* 2007; 2007:19564.
42. Gilliland FD, Li YF, Dubeau L, Berhane K, Avol E, McConnell R, et al., Effects of glutathione S-transferase M1, maternal smoking during pregnancy, and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:457-63.
43. Mak JC, Ho SP, Leung HC, Cheung AH, Law BK, So LK, et al. Relationship between glutathione S-transferase gene polymorphisms and enzyme activity in Hong Kong Chinese asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:1150-7.
44. Mapp CE, Fryer AA, De Marzo N, Pozzato V, Podoan M, Boschetto P, et al. Glutathione S-transferase GSTP1 is a susceptibility gene for occupational asthma induced by isocyanates. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:867-72.
45. Spiteri MA, Bianco A, Strange RC, Fryer AA. Polymorphisms at the glutathione S-transferase, GSTP1 locus: a novel mechanism for susceptibility and development of atopic airway inflammation. *Allergy* 2000; 55:15-20.
46. Romieu I, Ramirez-Aguilar M, Sienra-Monge JJ, Moreno-Macías H, del Rio-Navarro BE, David G, et al. GSTM1 and GSTP1 and respiratory health in asthmatic children exposed to ozone. *Eur Respir J* 2006; 28:953-9.
47. Imboden M, Rochat T, Brutsche M, Schindler C, Downs SH, Gerbase MW, et al. Glutathione S-transferase genotype increases risk of progression from bronchial hyperresponsiveness to asthma in adults. *Thorax* 2008; 63:322-8.
48. Islam T, Berhane K, McConnell R, Gauderman WJ, Avol E, Peters JM, et al. Glutathione-S-transferase (GST) P1, GSTM1, exercise, ozone and asthma incidence in school children. *Thorax* 2009; 64:197-202.
49. Imboden M, Downs SH, Senn O, Matyas G, Brändli O, Russi EW, et al., Glutathione S-transferase genotypes modify lung function decline in the general population: SAPALDIA cohort study. *Respir Res* 2007; 8:2
50. Becklake MR, Kauffmann F. Gender differences in airway behaviour over the human life span. *Thorax* 1999; 54:1119-38.
51. Gilliland FD, Rappaport EB, Berhane K, Islam T, Dubeau L, Gauderman WJ, et al. Effects of glutathione S-transferase P1, M1, and T1 on acute respiratory illness in school children. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:346-51.
52. Lee YL, Hsiue TR, Lee YC, Lin YC, Guo YL. The association between glutathione S-transferase P1, M1 polymorphisms and asthma in Taiwanese schoolchildren. *Chest* 2005; 128:1156-62.
53. Nickel R, Haider A, Sengler C, Lau S, Niggemann B, Deichmann KA, et al. Association study of Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) with asthma and bronchial hyper-responsiveness in two German pediatric populations. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16:539-41.
54. David GL, Romieu I, Sienra-Monge JJ, Collins WJ, Ramirez-Aguilar M, del Rio-Navarro BE, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) reduced quinone oxidoreductase and glutathione S-transferase M1 polymorphisms and childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:1199-204.
55. Minelli C, Granell R, Rose-Zerilli MJ, Torrent M, Ring SM, et al. Glutathione-S-transferase genes and asthma phenotypes: a Human Genome Epidemiology (HuGE) systematic review and meta-analysis including unpublished data. *Int J Epidemiol* 2010; 39:539-62.

56. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Aulstrup JL, Baranova H, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:1239-48.
57. Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuoz ZF, Schwartz BS, et al. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 1995; 16:1243-5.
58. Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998; 19:275-80.
59. Thoudam RD, Yadav DS, Mishra AK, Kaushal M, Ihsan R, Chattopadhyay I, et al. Distribution of glutathione S-transferase T1 and M1 genes polymorphisms in North East Indians: a potential report. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010; 14:163-9.