

IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA GLUTATION-S-TRANSFERASA P1 EN UNA POBLACIÓN DEL SUROCCIDENTE COLOMBIANO

Aleyda Maritza Acosta, Silvio Marino Carvajal*,
Luz Stella Hoyos*, Carlos Hernán Sierra

RESUMEN

Los genes de la familia de las Glutation S-transferasas juegan un papel importante en el metabolismo de sustancias genotóxicas. La Glutation S-transferasa P1 (GSTP1) pertenece a esta familia de genes y tiene una variante polimórfica en el codón 105 que sustituye Isoleucina por Valina originando cambios en la función enzimática. En este trabajo se estandarizó una técnica de PCR-RFLP para identificar el polimorfismo genético de GSTP1-I105V en 90 personas del Sur-Occidente Colombiano. La frecuencia del genotipo mutante GSTP1-I105V fue del 62,2%. Las frecuencias genotípicas observadas no difieren significativamente de las esperadas, asumiendo apareamiento aleatorio y ausencia de factores evolutivos; no obstante, se observa una ligera presión selectiva en contra de los individuos con genotipo homocigótico mutante.

Palabras clave: glutacion S-transferasa P1 (GSTP1), reacción en cadena de la polimerasa (RCP), epidemiología molecular, metabolismo de xenobióticos.

ABSTRACT

The Glutathione S-transferase genes play an important role in the metabolism of genotoxic compounds. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene belongs to this family and has a polymorphic variant at codon 105 has been identified the mutant causes a substitution from Isoleucine to Valine and consequently it produced changes in the enzymatic function. In

Recibido para evaluación: diciembre 15 de 2005. Aprobado para publicación: febrero 19 de 2006

* Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Universidad del Cauca.

** Grupo de Investigación en Genética Humana Aplicada, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca. Email

this research we standardized a PCR-RFLP technique to identify the genetic polymorphism of GSTP1-I105V in 90 people of the Colombian southwest. The frequency of mutant genotype GSTP1-I105V was 62.2%. The observed genotype frequencies were not significantly different from the expected frequencies, assuming random matching and lack of evolutionary factors; nevertheless, a slight selective pressure was observed against the individuals with the homozygous mutant genotype.

Key words: Glutathione S-transferase P1 (GSTP1), polymerase chain reaction (PCR), molecular epidemiology, xenobiotic metabolism.

INTRODUCCIÓN

La exposición a agentes genotóxicos y la variabilidad genética son factores determinantes en el desarrollo de enfermedades ambientales como el cáncer.(1) Los genes del metabolismo cumplen una función muy importante en la biotransformación de compuestos tóxicos exógenos (xenobióticos) y endógenos. El proceso consiste en convertir un xenobiótico no polar (insoluble en agua) en un compuesto soluble en agua que sea fácilmente eliminado del organismo, generalmente en la orina.(2)

La biotransformación de compuestos tóxicos se agrupa en dos fases. En la fase I, se presentan reacciones de oxidación, volviendo más hidrófilo al xenobiótico y activando sus grupos funcionales para facilitar reacciones secundarias; esto también se logra adicionando nuevos grupos funcionales como hidroxilo, amino y carboxilo, entre otros. En la fase II, se presentan reacciones de conjugación donde se adiciona un grupo polar a los grupos funcionales del metabolito, dando como resultado un incremento de su solubilidad en el agua para ser finalmente excretado.(3)

La fase II de detoxificación es de vital importancia en el mantenimiento de la salud porque protege a la célula contra numerosos agentes tóxicos que se encuentran en el ambiente.(4) Los polimorfismos genéticos en las enzimas que participan en la detoxificación celular han sido ampliamente estudiados en muchos grupos étnicos para establecer su importancia en el desarrollo de enfermedades por exposición ambiental.(5) Lo anterior permite identificar individuos y poblaciones más susceptibles a desarrollar problemas de salud por exposición a agentes genotóxicos. La superfamilia del gen de la Glutathione S-transferasa (GST) representa el mayor grupo de enzimas de detoxificación, catalizando la conjugación del glutathione con sustratos electrofilicos incluyendo sustancias carcinógenas.(6)

La GSTP1 pertenece a esta superfamilia de genes y tiene un polimorfismo en el codón 105 donde una transición A/G cambia Isoleucina por Valina, provocando diferencias en la afinidad de unión a los sustratos y en su actividad catalítica.(7,8) La GSTP1 metaboliza una gran variedad de carcinógenos potenciales, incluyendo químicos deri-

vados del humo del cigarrillo tales como el benzo(a)pireno diol epóxido y acroleína.(9) Varios estudios poblacionales han demostrado que existe una relación entre el polimorfismo GSTP1-I105V y susceptibilidad a desarrollar cáncer de seno, pulmón, cerebro, esófago, y vejiga y testículo.(10-14)

El objetivo de este trabajo fue estandarizar un procedimiento para identificar el polimorfismo genético de GSTP1-I105V, utilizando las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el Polimorfismo de la Longitud en los Fragmentos de Restricción (RFLP). Además, se describe la frecuencia de distribución del polimorfismo genético de GSTP1-I105V en una población del Sur-Occidente Colombiano y su análisis comparativo con las frecuencias del mismo gen encontradas en otras poblaciones. Esta técnica mejorará el desarrollo investigativo por cuanto permite conocer molecularmente la variabilidad genética de GSTP1 que existe entre individuos y poblaciones, para relacionarlas con efectos biológicos y potenciales problemas de salud.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Un total de 90 muestras de ADN genómico, pertenecientes a hombres del sur-occidente colombiano, fueron seleccionadas al azar de un banco de ADN previamente establecido en un estudio realizado por Hoyos, et al.15 Este banco de ADN posee muestras de consumidores de drogas psicoactivas que se encontraban en proceso de rehabilitación en la Fundación SHADAI y de un grupo control no consumidor seleccionado de instituciones locales (Policía, ejército, colegios y universidad). En resumen, los procedimientos para la obtención de muestras consistieron en la obtención del consentimiento informado de los posibles participantes, la toma de una muestra de sangre de 20 mL por venopunción con jeringas heparinizadas, y la extracción de ADN de linfocitos humanos por el método de "salting out", el cual fue resuspendido en 200 L de buffer Tris-EDTA (pH 8.2) y almacenado a -20°C para su posterior uso.16 Todos los procedimientos de la investigación

se realizaron teniendo en cuenta los principios bioéticos establecidos en la Declaración de Helsinki.(17)

Reactivos

Los primers utilizados para el gen GSTP1 fueron sintetizados por Sigma-Genosys (The Woodlands, TX, USA), la Taq polimerasa provenía de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), la Nusieve Agarosa de Fisher Scientific (Houston, TX, USA) y la enzima de restricción BsmAI de New England BioLabs (Beverly, MA, USA). Otros reactivos fueron adquiridos de casas comerciales como Sigma y Promega, quienes elaboran productos de alta calidad para optimizar las reacciones biológicas y químicas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR para GSTP1 descrita en este artículo es una modificación de un protocolo realizado previamente.(18) El volumen total de la reacción de PCR para cada muestra de ADN fue de 25 μ L. La mezcla contenía 0,4 μ g de ADN genómico, 10 pmol de cada uno de los primers GSTP1-I105V (5'-CTC TAT GGG AAG GAC CAG CAG GAG-3' y 5'-CAA GCC ACC TGA GGG GTA AGG-3'), 200 M de cada dNTP, Buffer 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl₂ y 0,5 unidades de Taq polimerasa. Se realizó master mix para la mayoría de las muestras de ADN. La reacción de PCR se llevo a cabo en un termociclador Gene AMP PCR System 2700 (Applied Biosystems) y después de una denaturación inicial de 95°C por 10 minutos, el DNA fue amplificado por 35 ciclos, así: 95°C por 40 segundos para la denaturación, 63°C por 45 segundos para el alineamiento y 72°C por 1 minuto para la extensión. Un paso final de extensión de 72°C por 10 minutos finalizó el proceso de la PCR. Para verificar las condiciones de la amplificación, se analizaron 13 μ L del producto de PCR mediante electroforesis con 3% de Nusieve Agarosa, Bromuro de etidio (10 mg/mL) y TBE 0,5X a 80 Voltios durante 45 minutos. La presencia de una banda a 193 pb ante una lámpara de luz ultra-violeta confirmó la amplificación del gen.

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Para determinar el polimorfismo de GSTP1, 12 μ L del producto amplificado fueron digeridos con 1 μ L (5 unidades) de la enzima de restricción BsmAI (*Bacillus stearothermophilus*), 3 μ L de 1xNEB2 y 0,2 L de BSA durante 14 horas a 55°C. Este procedimiento también se realizó usando master mix. El producto digerido fue analizado

por electroforesis en 3% de Nusieve Agarosa y Bromuro de Etidio (10 mg/mL), TBE 0,5X a 80 voltios durante 45 minutos. El polimorfismo GSTP1-I105V tiene un sitio de corte para la enzima de restricción BsmAI, formando tres genotipos: el genotipo homocigoto normal I/I a 193 pb, el genotipo heterocigoto I/V con tres bandas a 193, 110 y 88 pb, y el genotipo homocigoto mutante V/V con dos bandas a 110 y 88 pb.

Análisis estadístico

Las frecuencias del gen GSTP1-I105V fueron analizadas como variables dicotómicas (I/I y I/V + V/V). La prueba de similitud entre las frecuencias encontradas en este estudio y las frecuencias de otras poblaciones se hizo con base en el intervalo de confianza (IC) del 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estandarización del protocolo para identificar el polimorfismo genético de GSTP1-I105V mostró una clara separación de bandas, acorde con los pesos moleculares esperados, así: para el polimorfismo GSTP1-I105V hay una banda a 193 pb que corresponde al genotipo homocigoto silvestre (Ile/Ile), dos bandas de 110 pb y 83 pb para el genotipo homocigoto mutante (Val/Val), y tres bandas de 193 pb, 110 pb y 83 pb para el genotipo heterocigoto (Ile/Val).

Durante los ensayos existieron diferencias en la nitidez de las bandas entre las muestras de estudio, posiblemente causado por la diferencia en la calidad del ADN extraído por "salting out". Los mejores resultados se observaron al utilizar master mix, es decir, la mezcla de suficiente cantidad de reactivos (excepto el ADN) para n muestras que luego es dividido equitativamente en n tubos de PCR y se adiciona el ADN. De manera semejante se realizó master mix para RFLP obteniendo excelentes resultados. La master mix es un procedimiento que optimiza los resultados de la PCR y RFLPs ya que asegura que la concentración de los reactivos es igual para todas las muestras, reduce tiempo, costos y fuente de error en la manipulación de los reactivos.

Para asegurarse de la reproducibilidad de la técnica se repitió el procedimiento con varias muestras de ADN al azar, y al compararlas no se presentó ninguna disparidad con las observaciones iniciales. Al menos dos personas estuvieron presentes en la lectura de las bandas para la identificación del polimorfismo de GSTP1-I105V. Inicialmente, se trabajó con un volumen total de PCR de 50 μ L pero dada la efectividad del procedimiento fue posible reducir el volumen de la PCR a 25 μ L sin perder la calidad de las bandas.

En la población estudiada ($n = 90$), 34 individuos (37,8%) presentaron el genotipo homocigoto silvestre I/I, 49 (54,4%) el genotipo heterocigoto I/V, y 7 (7,8%) el genotipo homocigoto mutante V/V. El genotipo mutante (I/V + V/V) se presentó en un 62,2% de la población ($n = 56$). Con base en este último dato se puede estimar que en la población del Sur-Occidente Colombiano (representada por las muestras analizadas) el genotipo mutante está entre el 52 y el 72% (intervalo de confianza del 95%), con un error estándar de 0,051.

Con base en las frecuencias genotípicas antes anotadas, se calcularon las respectivas frecuencias alélicas, así: 65% para el alelo silvestre I y 35% para el alelo mutante V. Asumiendo apareamiento aleatorio y ausencia de factores evolutivos (Equilibrio de Hardy-Weinberg), las frecuencias genotípicas esperadas son: 38,025 individuos (42,25%) con el genotipo homocigoto silvestre I/I, 40,95 individuos (45,5%) con el genotipo heterocigoto I/V, y 11,025 individuos (12,25%) con el genotipo homocigoto mutante V/V. Mediante prueba de Chi cuadrado se logra inferir que hay una leve presión selectiva en contra del genotipo homocigótico mutante ($0,1 > p > 0,05$), observándose un número menor de individuos con este genotipo que el esperado en el equilibrio de Hardy - Weinberg. No obstante, dicha diferencia no alcanza a ser significativa a nivel del 0,05.

La prueba de similitud (Tabla 1) indica que la frecuencia del genotipo mutante (I/V + V/V) reportada en este estudio no difiere significativamente de las frecuencias encontradas en otras poblaciones como la Euro-Americana, Afro-America-

na, Inglesa, Alemana, Australiana, Portuguesa, Hispánica, Negra y Asiática ($p > 0,05$). Estos resultados pueden ser indicio de una cercanía genética entre las poblaciones antes mencionadas y la población Colombiana de estudio. Sin embargo, las frecuencias del genotipo mutante reportadas en las poblaciones Noruega, Taiwanesa, Japonesa, Francesa, Caucásica e Italiana fueron significativamente menores a las del presente estudio ($p < 0,05$). Como se indica en la figura 1, no se encontraron frecuencias del genotipo mutante que pudieran ser significativamente mayores a las reportadas en este estudio.

CONCLUSIONES

Las frecuencias genotípicas observadas no difieren significativamente de las esperadas asumiendo apareamiento aleatorio y ausencia de factores evolutivos; no obstante, se observa una ligera presión selectiva en contra de los individuos con genotipo homocigótico mutante.

La técnica de identificación del polimorfismo genético de GSTP1-I105V podría constituirse en una herramienta importante para determinar la asociación entre la variabilidad del gen y el desarrollo de enfermedades por exposición ambiental. Cabe anotar que el tamaño de muestra del presente estudio es reducido y se debe inferir que las frecuencias reportadas son preliminares, siendo necesario incrementar el tamaño muestral para confirmar las frecuencias del genotipo mutante de GSTP1 en Colombia.

Población	n	GM±EE	t	p	Bibliografía
P. de Estudio	90	0,622 ± 0,051	-	-	-
Noruega	297	0,485 ± 0,029	2,33130	0,02*	19
Euro-Americana	287	0,580 ± 0,029	0,71390	0,500	20
Afro-Americana	137	0,650 ± 0,041	-0,42834	0,500	20
Taiwanesa	116	0,330 ± 0,044	4,34399	0,001*	20
Japonesa	122	0,238 ± 0,039	5,95549	0,001*	21
Inglesa	178	0,540 ± 0,037	1,29525	0,200	22
Francesa	211	0,310 ± 0,032	5,18122	0,001*	23
Alemana	64	0,500 ± 0,063	1,51106	0,100	24
Australiana	292	0,610 ± 0,029	0,20498	0,500	25
Finlandesa	482	0,447 ± 0,023	3,13037	0,002*	26
Portuguesa	141	0,567 ± 0,042	0,83356	0,500	27
Hispánica	517	0,714 ± 0,020	-1,67762	0,100	28
Negra	79	0,683 ± 0,052	-0,83441	0,500	28
Asiática	96	0,511 ± 0,051	1,53625	0,100	28

GM: genotipo mutante I/V + V/V

EE: error estándar de las frecuencias obtenido mediante la fórmula $EE = \sqrt{pq/n}$

t: prueba t de student para comparar dos frecuencias poblacionales mediante la fórmula $t = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{(p_1q_1/n_1 + p_2q_2/n_2)}}$

p: probabilidad de error tipo I (prueba de significancia).

* Poblaciones que difieren significativamente de la frecuencia reportada en este estudio.

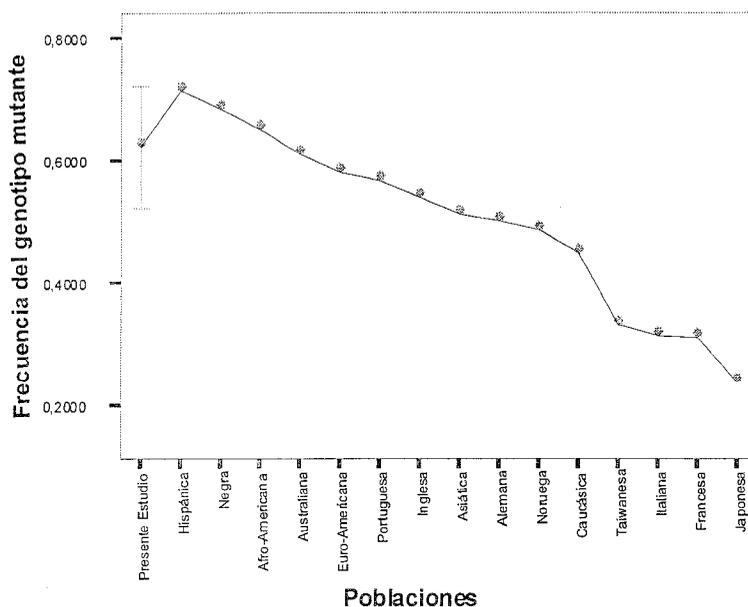


Figura 1. Frecuencias del genotipo mutante

AGRADECIMIENTOS

A los Grupos de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética y Genética Humana Aplicada de la Universidad del Cauca por el apoyo económico y logístico para la ejecución de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Perera FP. Environment and cancer: who are susceptible? *Science* 1997;278:1068-1073.
2. Coles B, Ketterer B. The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1990;25:47-70.
3. Daly AK, Cholerton S, Armstrong M, Idle JR. Genotyping for polymorphisms in xenobiotic metabolism as a predictor of disease susceptibility. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 9:55-61.
4. Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000;61:154-166.
5. Vineis P, Malats N, Boffetta P. Chapter 1. Why study metabolic susceptibility to cancer? *IARC Sci Publ* 1999;1-3.
6. Lang M, Pelkonen O. Chapter 3. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC Sci Publ* 1999;148:13-22.
7. Board PG, Johnston PN, Ross VL, Webb GC, Coggan M, Suzuki T. Molecular genetics of the human glutathione S-transferase. *Princess Takamatsu Symp* 1990;21:199-211.
8. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem* 1997;272:10004-10012.
9. 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.
10. Egan KM, Cai Q, Shu XO, Jin F, Zhu TL, Dai Q, et al. Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTP1, and GSTT1 and the risk for breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:197-204.
11. Miller DP, Neubergh D, de V, I, Wain JC, Lynch TJ, Su L, et al. Smoking and the risk of lung cancer: susceptibility with GSTP1 polymorphisms. *Epidemiology* 2003;14:545-551.
12. De Roos AJ, Rothman N, Inskip PD, Linet MS, Shapiro WR, Selker RG, et al. Genetic polymorphisms in GSTM1, -P1, -T1, and CYP2E1 and the risk of adult brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:14-22.

13. van Lieshout EM, Roelofs HM, Dekker S, Mulder CJ, Wobbes T, Jansen JB, *et al.* Polymorphic expression of the glutathione S-transferase P1 gene and its susceptibility to Barrett's esophagus and esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:586-589.
14. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;18:641-644.
15. Hoyos, L. S., Carvajal, S., and Sierra-Torres, C. H. Evaluación del efecto genotóxico y citotóxico de las drogas psicoactivas en el departamento del Cauca. 1-70. 2001. Popayan, Colombia, Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética. Ref Type: Report
16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
17. World Medical Association. The Helsinki declaration. *Orv Hetil* 1965;106:1715-5.
18. Harris MJ, Coggan M, Langton L, Wilson SR, Board PG. Polymorphism of the Pi class glutathione S-transferase in normal populations and cancer patients. *Pharmacogenetics* 1998;8:27-31.
19. Ryberg D, Skaug V, Hewer A, Phillips DH, Harries LW, Wolf CR, *et al.* Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;18:1285-1289.
20. 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. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;19:275-280.
21. Katoh T, Kaneko S, Takasawa S, Nagata N, Inatomi H, Ikemura K, *et al.* Human glutathione S-transferase P1 polymorphism and susceptibility to smoking related epithelial cancer; oral, lung, gastric, colorectal and urothelial cancer. *Pharmacogenetics* 1999;9:165-169.
22. Welfare M, Monesola AA, Bassendine MF, Daly AK. Polymorphisms in GSTP1, GSTM1, and GSTT1 and susceptibility to colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:289-292.
23. Longuemaux S, Delomenie C, Gallou C, Mejean A, Vincent-Viry M, Bouvier R, *et al.* Candidate genetic modifiers of individual susceptibility to renal cell carcinoma: a study of polymorphic human xenobiotic-metabolizing enzymes. *Cancer Res* 1999;59:2903-2908.
24. Stanulla M, Schrappe M, Brechlin AM, Zimmermann M, Welte K. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood* 2000;95:1222-1228.
25. Spurdle AB, Webb PM, Purdie DM, Chen X, Green A, Chenevix-Trench G. Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;22:67-72.
26. Mätrunén K, Jourenkova N, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, *et al.* Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:229-236.
27. Jeronimo C, Varzim G, Henrique R, Oliveira J, Bento MJ, Silva C, *et al.* 1105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:445-450.
28. Gilliland FD, Gauderman WJ, Vora H, Rappaport E, Dubeau L. Effects of glutathione-S-transferase M1, T1, and P1 on childhood lung function growth. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:710-716.