

¿Los polimorfismos de los genes *GSTT1* y *GSTM1* de la glutatión-s-transferasa protegen contra la enfermedad del hígado graso no alcohólico?

Autores Mercedes Fernández-Mestre¹, Katherine González-Lugo², Edgardo Mengual-Moreno³ , Mayerly Nava de García², Maribel Lizarábal-García⁴ .

Afiliación 1 Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela.
2 Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.
3 Instituto de Investigaciones Biológicas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.
4 Postgrado de Gastroenterología. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Autor de Correspondencia: Edgardo Mengual Moreno. Correo: mengual88@hotmail.com ORCID: [0000-0002-9872-5186](https://orcid.org/0000-0002-9872-5186)

Revista GEN (Gastroenterología Nacional) 2022; 76(4): 143-149.

© Sociedad Venezolana de Gastroenterología. Caracas, Venezuela- ISSN 2477-975X.

Fecha de recepción: 18/06/2022

Fecha de revisión: 15/08/2022

Fecha de Aprobación: 21/09/2022

Resumen

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) abarca un amplio espectro clínico-patológico, en cuyo desarrollo, progresión y gravedad influyen el ambiente, estilo de vida y progresión genética. Varios polimorfismos que codifican para isoenzimas de la familia Glutatión-S-transferasa, involucradas en la desintoxicación de compuestos nocivos y productos del estrés oxidativo, han sido asociados a la protección o a la susceptibilidad aumentada al desarrollo de la EHGNA, con resultados controversiales. Para contribuir a dilucidar este aspecto, se investigaron los polimorfismos de los genes *GSTT1* y *GSTM1* y su asociación con datos antropométricos, bioquímicos y clínicos, en 53 individuos con EHGNA (26 obesos - 27 no obesos) y 17 controles sin EHGNA, de 3 centros hospitalarios del municipio Maracaibo, edo. Zulia. El ADN genómico extraído de la sangre periférica fue amplificado mediante PCR-SSP y las frecuencias genotípicas fueron contadas. En individuos con EHGNA, se observó una frecuencia significativamente menor del alelo *GSTT1*- (OR: 0.19, IC 95%: 0.03-1.24, $p < 0.02$) así como la ausencia de la combinación *GSTT1*-/*GSTM1*- (OR: 0.06, IC 95%: 0.002-1.27, $p < 0.001$) con respecto a los controles, sugiriendo que estos alelos de la Glutatión-S-Transferasa podrían conferir protección contra el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico en la población estudiada.

Palabras clave: Enfermedad del hígado graso no alcohólico, EHGNA, Glutatión-S-transferasa, Polimorfismos, *GSTT1*, *GSTM1*, Estrés Oxidativo.

DO THE POLYMORPHISMS OF *GSTT1* AND *GSTM1* GENES OF GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE PROTECT AGAINST NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE?

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) covers a wide clinical-pathological spectrum, whose development, progression and severity are influenced by the environment, lifestyle and genetic progression. Several polymorphisms that code for isoenzymes of the Glutathione-S-transferase family, involved in the detoxification of harmful compounds and products of oxidative stress, have been associated with protection or increased susceptibility to the development of NAFLD, with controversial results. To help elucidate this aspect, the polymorphisms of the *GSTT1* and *GSTM1* genes and their association with anthropometric, biochemical and clinical data were investigated in 53 individuals with NAFLD (26 obese - 27 non-obese) and 17 controls without NAFLD, from 3 hospitals centers from Maracaibo municipality, edo. Zulia. Genomic DNA extracted from peripheral blood was amplified by PCR-SSP and genotypic frequencies were counted. In individuals with NAFLD, a significantly lower frequency of the *GSTT1*- allele (OR: 0.19, 95% CI: 0.03-1.24, $p < 0.02$) as well as the absence of the *GSTT1*-/*GSTM1*- combination (OR: 0.06, CI 95%: 0.002-1.27, $p < 0.001$) compared to controls, suggesting that these Glutathione-S-Transferase alleles could confer protection against the development of non-alcoholic fatty liver disease in the population studied.

Key words: Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD, Glutathione-S-transferase, Polymorphisms, GSTT1, GSTM1, Oxidative Stress.

Introducción

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), consiste en el almacenamiento de vacuolas de grasa en forma de triacilglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos, excediendo el 5% del peso del hígado¹. La EHGNA es considerada un problema de salud pública debido a que afecta significativamente a la población y su prevalencia mundial oscila entre el 20% y 30%². Se caracteriza por causar una serie de cambios histológicos y patológicos que engloban un amplio espectro de lesiones hepáticas, que comprenden distintas formas de manifestación clínica dependiendo el estadio evolutivo, como: a) esteatosis hepática simple caracterizada por la presencia de vacuolas grasas en el parénquima hepático, b) esteatohepatitis que además del depósito graso existe infiltrado inflamatorio, lesión hepatocelular y en algunas ocasiones fibrosis, c) cirrosis hepática y d) cáncer de hígado³.

Estudios recientes sugieren que el ambiente, la predisposición genética y el estilo de vida juegan un papel fundamental en el desarrollo y progresión de la enfermedad, explicando la variación considerable en la gravedad de la misma y la tasa de progresión en diferentes grupos familiares y étnicos⁴. Entre los factores de progresión se han encontrado alteraciones metabólicas, la liberación de citoquinas, mediada por endotoxinas, y el estrés oxidativo⁵.

Se ha demostrado que los polimorfismos de genes que codifican para enzimas implicadas en la protección celular y desintoxicación, tanto de compuestos exógenos y endógenos, como los productos del estrés oxidativo, aumentan la susceptibilidad a enfermedades relacionadas con el hígado⁶. Entre las enzimas de gran importancia en mecanismos de desintoxicación celular se encuentran la familia Glutathión-S-transferasas (GST), expresadas en la mayoría de los tejidos de todos los mamíferos y sintetizadas a partir de sus aminoácidos precursores (Glutamato, Cisteína y Glicina)⁷.

Dado a que el balance entre la producción y eliminación de las especies reactivas de oxígeno están relacionadas con la progresión y desarrollo de la enfermedad. En la actualidad se han realizado estudios de asociación entre los polimorfismos de los genes que codifican las enzimas Glutathión-S-Transferasas M1 y T1 (*GSTM1* y *GSTT1*) y el desarrollo de la EHGNA. Sin embargo, no se ha podido dilucidar el papel del polimorfismo de los genes que las codifican debido a que los resultados obtenidos son contradictorios y varían según la población de estudio⁸⁻¹⁰.

El objetivo del presente estudio fue determinar la variabilidad de los genes *GSTT1* y *GSTM1* en pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), procedentes de diferentes centros hospitalarios del municipio Maracaibo, Edo. Zulia.

Pacientes y Métodos

Tipo de estudio: estudio prospectivo, de casos y controles, de asociación y descriptivo.

Población de estudio: en la presente investigación se incluyeron 70 individuos venezolanos, no relacionados, procedentes del Estado Zulia, sin antecedentes de enfermedades infecciosas, hepáticas, autoinmunes o neoplásicas. Clasificados en 3 grupos: un grupo control conformado por 17 individuos sanos y dos grupos de pacientes con EHGNA, clasificados en obesos (26 individuos) y no obesos (27 individuos), de acuerdo a su IMC y circunferencia de cintura. Los pacientes acudieron, durante el período comprendido entre Julio 2016 y agosto 2017, al Servicio Autónomo del Hospital Universitario, Fundación Centro de Investigación Endocrino Metabólicas y Hospital Coromoto, ubicados en el municipio Maracaibo, Edo. Zulia. Los pacientes diagnosticados con EHGNA fueron seleccionados bajo una rigurosa historia clínica realizada por un especialista en hepatología, tomando en cuenta la evaluación ecográfica y pruebas bioquímicas, tales como: glicemia, insulina, transaminasa oxalacética y transaminasa glutámico-pirúvica, perfil lipídico, así como la exclusión de otras enfermedades hepáticas mediante la realización de todas las pruebas existentes de descarte.

Criterios de inclusión: individuos nacidos en Venezuela. No emparentados, de cualquier grupo etario y sin consideración de sexo. Aquellos que participaron voluntariamente y firmaron el consentimiento informado.

Criterios de exclusión: individuos no venezolanos. Indígenas Individuos con Enfermedades autoinmunitarias, neoplásicas, con enfermedades hepáticas causadas por alcohol o infecciones. Individuos que no quisieron participar en la investigación. Pacientes que no completaran todas las pruebas para descartar otras patologías. No se incluyeron pacientes con cirrosis hepática ni cáncer de hígado.

Aspectos bioéticos: se realizó una base de datos con la información del paciente, la cual fue usada exclusivamente por los investigadores, respetando la confidencialidad de la misma. Se recopiló información personal, se realizó evaluación adipométrica, clínica y paraclínica. Los individuos participantes fueron informados del proyecto y del interés por parte de los investigadores, de su participación como voluntario en la investigación, también que dicha investigación no tenía consecuencias sobre la salud y ni inversión económica por parte del paciente. Los individuos estuvieron de acuerdo con participar, se le citó al centro correspondiente, donde firmaron el consentimiento, donaron la muestra de sangre y se hicieron las evaluaciones correspondientes. Previo a la recolección de las muestras del grupo de pacientes y controles, se les solicitó la firma de un consentimiento informado, aprobado por el Comité de Bioética de cada Centro Hospitalario. A cada individuo se le informó del estudio y del destino que se le daría a la muestra de sangre voluntariamente donada.

Parámetros antropométricos: A cada uno de los individuos participantes, en colaboración con un nutricionista, se les determinó las siguientes medidas antropométricas: peso, estatura, índice de masa corporal y se traficaron según los criterios de Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017) en normopeso, con sobrepeso y obesos.

Parámetros bioquímicos: Los valores bioquímicos, tales como glicemia, pruebas de funcionalismo hepático, como enzimas hepáticas como aspartato aminotransferasa o transaminasa glutámico oxalacética (AST o TGO) y alanina aminotransferasa o transaminasa glutámico pirúvica (ALT o TGP), fueron determinadas (incluyendo los controles) así como pruebas no invasivas para estimar esteatohepatitis como APRI y FIB-4. También se realizaron una serie de pruebas que permitieron descartar otras enfermedades hepáticas y se excluyeron paciente con antecedente de consumo de alcohol.

Determinación de los polimorfismos GSST1 y GSTM1:

Recolección y almacenamiento de la muestra: se extrajo por punción venosa 5 ml de sangre periférica a los pacientes y controles, respectivamente, utilizando EDTA-Na₂ (ácido etilendiamino-tetra-acético di sódico) como anti-coagulante. La muestra fue almacenada en condiciones apropiadas (temperatura de refrigeración entre 4-8°C) y posteriormente trasladada al Centro de Medicina Experimental, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Extracción del ADN genómico: el ADN genómico fue extraído de las células blancas por la Lic. María Hernández, siguiendo el protocolo Bunce, método en el que se utiliza cloroformo como solvente orgánico (Bunce, 2000). La muestra de sangre periférica se centrifugó durante 10 min a 800 g para obtener los glóbulos blancos (leucocitos y linfocitos), los cuales fueron lavados con 10 ml de buffer de lisis de células rojas (RCLB, red cell lysis buffer). Luego se centrifugó a 800 g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado con RCLB hasta que el precipitado de glóbulos blancos quedó de color blanco. El precipitado se resuspendió en 3 ml de buffer de lisis nuclear (NLB, Nuclear Lysis Buffer) y se dejó en baño a 56°C hasta que se disolvió. Luego se añadió 1 ml de cloruro de sodio (NaCl 5,25 M), se agitó durante 20 segundos y se añadieron 2 ml de cloroformo, se volvió a agitar hasta formar una solución lechosa, en seguida se centrifugó durante 20 min a 1000 g, se tomó la fase acuosa y se transfirió a un tubo de polipropileno. A la fase acuosa extraída se le añadieron 2 volúmenes de etanol 95% frío, se rotó el tubo hasta que precipitó el ADN, se atrapó el ADN en forma de malla con una pipeta de transferencia de polipropileno y se pasó a un tubo estéril de 1,5 ml. El ADN se resuspendió en etanol 70% y se centrifugó durante 5 min a máxima velocidad y se volteó el tubo sobre una servilleta para eliminar el exceso de etanol. Finalmente, se resuspendió el ADN en buffer TE 1X para su dilución.

Determinación de la concentración y pureza de ADN: La concentración de ADN se estimó por la lectura de la densidad óptica (DO), midiendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm de cada muestra (2 µl) utilizando un nanodrop modelo

(NanoDrop™, 2000). La concentración del ADN (µg/ml) se determinó a través de la siguiente fórmula: (ADN) doble cadena= 50 µg/ml (factor constante) x DO 260nm. DO: densidad óptica / 1 DO 260 nm = 50 µg de ADN/ ml. La pureza del ADN se calculó mediante la relación DO260nm / DO280nm. Esta relación debe ser mayor o igual a 1.7 para garantizar la pureza del ADN aislado (Termo Scientific, 2009).

Calidad del ADN genómico: la calidad del ADN genómico, extraído de las muestras de sangre, se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (Agarosa LE, ACTGENE) al 0,75% en buffer TBE 1X (Tris-Ácido Bórico- EDTA), coloreado con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). En cada pozo del gel se colocaron 2 µl de buffer de carga con 5 µl de ADN. En uno de los pozos del gel se colocó, como control, 5 µl del fago lambda (Promega) sin digerir y ajustado a una concentración de 200 µg/ml. La corrida electroforética se realizó a 100 voltios, por 30 minutos. (Figura 1).

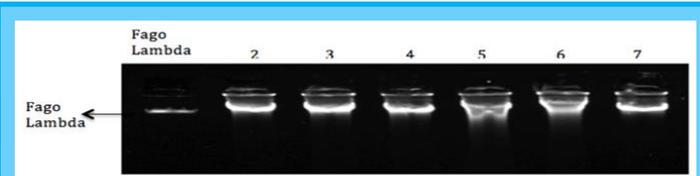


Figura 1. Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,75%) en buffer TBE 1X.

El carril 1 corresponde al fago lambda ajustado a 200 µg/ml (marcador de referencia), los carriles 2 al 7 corresponden a las muestras de ADN de algunos de los individuos incluidos en el estudio.

Método para el análisis de los polimorfismos: Para el análisis de los polimorfismos genéticos se utilizó la técnica PCR-SSP (reacción de cadena de polimerasa utilizando iniciadores de secuencia específicas), la cual permitió distinguir directamente la presencia o ausencia del gen. Se fundamenta en que solo los iniciadores cuyas secuencias son perfectamente complementarias a la muestra del ADN, hibridan y producen el fragmento correspondiente al gen de interés¹¹. Cabe destacar, que en este tipo de PCR es incluido un par de iniciadores que amplifican un control interno, éste par de iniciadores amplifica una región conservada de un gen constitutivo, que está presente en todas las muestras de ADN humano y se utiliza para verificar la eficacia de la reacción de PCR¹² (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores utilizados¹².

| Gen | Iniciadores | Secuencia (5'-3') | Tamaño (pb) |
|----------|-------------|--------------------------|-------------|
| GSTM1 | F1 | GAAGTCCCTGAAAAGCTAAA GC | 215 |
| | R1 | GTTGGGCTCAAATATACGGTGG | |
| GSTT1 | F1 | TTCCTTACTGGTCTCACATCTC | 480 |
| | R1 | TCACCGGATCATGGCCAGCA | |
| Albúmina | F1 | GCCCTCTGCTAACAAAGTCT A | 350 |
| | R1 | GCCCTAAAAAGAAAATCGCCAATC | |

F: iniciador forward (sentido), R: iniciador reverse (anti-sentido), pb: pares de base, indica el tamaño del producto amplificado correspondiente, así como las características de los iniciadores para *Albúmina*, como control interno de la reacción.

PCR-SSP de los genes *GSTT1/GSTM1*: Para detectar la presencia o ausencia de los genes *GSTM1* y *GSTT1* se utilizó el método PCR múltiplex, siguiendo el protocolo modificado y los iniciadores específicos publicados (12). La PCR se realizó empleando la siguiente mezcla de reacción: Buffer 1X, 0.75 µM de cada uno de los iniciadores para los genes *GSTM1* y *GSTT1*, 0.2 µM de los iniciadores de *Albumina*, 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de KCl, 0.4 mM de Tris-HCl, 3.25 mM de MgCl₂, 0.02 U/µL de la enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen), 2 µl de muestra de ADN genómico (50-100 ng) y agua destilada para completar un volumen total de reacción de 20 µl (12). Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa (Agarosa LE, ACTGENE) al 2 %, coloreado con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó por 40 min a 100 voltios. Tabla 2 y Figura 2.

Tabla 2. Protocolo de PCR multiplex utilizado 12.

| Paso | Temperatura (°C) | Duración (min) | Nº Repeticiones |
|---------------------------|------------------|----------------|-----------------|
| Desnaturalización Inicial | 95 °C | 2 min | |
| Desnaturalización | 94 °C | 1 min | x 30 ciclos |
| Hibridación | 64 °C | 1 min | |
| Extensión | 72 °C | 1 min | |
| Extensión Final | 72 °C | 5 min | |

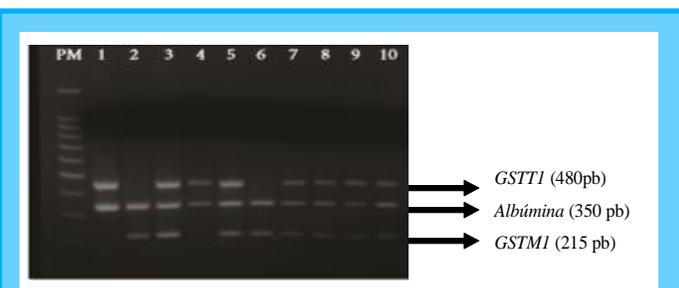


Figura 2.- Visualización de los productos amplificados correspondientes al polimorfismo de los alelos *GSTT1* y *GSTM1* mediante electroforesis de geles de agarosa al 2%.

El carril PM corresponde al marcador de 100 pb (Lucigen), los carriles 3, 5, 7, 8, 9 y 10 corresponden a individuos con el genotipo *GSTM1+ / GSTT1+* (presencia de las bandas de 215 pb y 480 pb, respectivamente); los carriles 1 y 4 corresponden a individuos con el genotipo *GSTM1- / GSTT1+* (presencia de la banda de 480 pb). En todos los bolsillos se observa la presencia del control interno, *Albumina* (350 pb).

Análisis Estadístico: La frecuencia alélica de los genes, así como las combinaciones genotípicas, se obtuvo por conteo directo a partir de los fenotipos asignados a cada individuo. Para evaluar las diferencias y establecer la asociación se calcularon valores de significancia (probabilidad $p < 0,05$) mediante la prueba exacta de χ^2 Mantel-Haenszel y Odds Ratio (OR) intervalos de confianza (95%). La base datos y los cálculos fueron procesados utilizando el paquete estadístico SPSS Statistics 20.0.

Resultados

La tabla 3 muestra la distribución de los alelos del gen *GSTM1* (alelo presente +, alelo nulo -), el gen *GSTT1* (alelo presente +, alelo nulo -) y las posibles combinaciones *GSTM1/ GSTT1* en individuos sanos y con EHGNA incluidos en el estudio. En los controles la frecuencia de los alelos *GSTM1-* y *GSTT1-* (32.3% y 8,9%, respectivamente) fue mayor que en los pacientes con EHGNA (25.5% y 1.9%, respectivamente). Se observó cuatro combinaciones de genotipos en los controles (*GSTT1+/GSTM1+*, *GSTT1+/GSTM1-*, *GSTT1-/GSTM1+* y *GSTT1-/GSTM1-*), mientras que en EHGNA sólo se observó tres de ellas (*GSTT1+/GSTM1+*, *GSTT1+/GSTM1-*, *GSTT1-/GSTM1+*). Se evidenció una frecuencia significativamente menor del alelo *GSTT1-* en los pacientes con EHGNA con respecto a los controles (1.9% versus 8.9%, respectivamente, OR: 0.19, IC95%: 0.03-1.24, $p= 0.02$). La ausencia de la combinación *GSTT1-/GSTM1-* en los pacientes con EHGNA con respecto a los controles (0% versus 11.7%, respectivamente, OR= 0.06, IC95%: 0.002-1.27, $p= 0.001$).

Tabla 3. Distribución de frecuencia de los alelos nulos de *GSTT1* y *GSTM1* y sus posibles combinaciones en pacientes con EHGNA y controles.

| Alelos | EHGNA (n=53) | Controles (n=17) | OR IC 95% | p |
|----------------|--------------|------------------|--------------------|------|
| <i>GSTM1 +</i> | 26 (24.5%) | 6 (17.6%) | 1.5 (0.57 – 4.06) | 0.20 |
| <i>GSTM1 -</i> | 27 (25.5%) | 11 (32.3%) | 0.71 (0.31 - 1.66) | 0.20 |
| <i>GSTT1 +</i> | 51 (48.1%) | 14 (41.2%) | 1.32 (0.60 – 2.89) | 0.24 |
| <i>GSTT1 -</i> | 2 (1.9%) | 3 (8.9%) | 0.19 (0.03 – 1.24) | 0.02 |
| Combinaciones | EHGNA (n=53) | Controles (n=17) | OR IC 95% | p |
| T1+/M1+ | 24 (45.3%) | 5 (29.4%) | 1.98 (0.61 – 6.43) | 0.12 |
| T1-/M1- | 0 (0%) | 2 (11.7%) | 0.06 (0.00 – 1.27) | 0.00 |
| T1+/M1- | 27 (50.9%) | 9 (52.9%) | 0.92 (0.31 – 2.75) | 0.44 |
| T1-/M1+ | 2 (3.7%) | 1 (5.9%) | 0.62 (0.05 – 7.38) | 0.35 |

La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis indican el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado. OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza 95%, $p < 0.05$: significativo.

En la tabla 4, se muestra la distribución de los alelos del gen *GSTM1* y combinaciones en pacientes con y sin síndrome metabólicos (SM) incluidos en el estudio. No se observaron diferencias estadísticamente significativas y los valores de OR no indican una relación entre la variabilidad de los genes *GSST1* y *GSTM1* y el síndrome metabólico. Sin embargo, observamos una frecuencia incrementada, aunque no estadísticamente significativa, de la combinación *GSTT1 + / GSTM1+* (OR: 2.68; IC95%: 0.78 – 9.18).

Tabla 4. Distribución de frecuencia de los alelos nulos de *GSTT1* y *GSTM1* y sus posibles combinaciones en los individuos con y sin Síndrome Metabólico.

| Alelos | SM (n=36) | No SM (n=17) | OR IC 95% | p |
|----------------|------------|--------------|--------------------|------|
| <i>GSTT1</i> + | 35 (48.6%) | 16 (47.1%) | 1.06 (0.47 – 2.4) | 0.44 |
| <i>GSTM1</i> + | 20 (27.8%) | 6 (17.6%) | 1.79 (0.64 – 4.98) | 0.13 |
| <i>GSTT1</i> - | 1 (1.4%) | 1 (2.9%) | 0.46 (0.02 – 7.66) | 0.29 |
| <i>GSTM1</i> - | 16 (22.2%) | 11 (32.4%) | 0.59 (0.29 – 1.48) | 0.13 |
| Combinaciones | SM (n=36) | No SM (n=17) | OR IC 95% | p |
| T1+/M1+ | 19 (52.8%) | 5 (29.4%) | 2.68 (0.78 – 9.18) | 0.06 |
| T1+/M1- | 16 (44.4%) | 11 (64.7%) | 0.43 (0.13 – 1.43) | 0.08 |
| T1-/M1+ | 1 (2.8%) | 1 (5.9%) | 0.45 (0.02 – 7.77) | 0.28 |
| T1-/M1- | 0 (0%) | 0 (0%) | - | - |

La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado o el número de veces que se repite el alelo. SM: síndrome metabólico, OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza, p: probabilidad, p< 0.05: significativo.

Se observó diferencias significativas al comparar las frecuencias de los polimorfismos estudiados entre pacientes no obesos con y sin síndrome metabólico (Tabla 5).

Tabla 5. Distribución de frecuencia de los alelos nulos de *GSTT1* y *GSTM1* y sus posibles combinaciones en los individuos no obesos con y sin Síndrome Metabólico.

| Alelo/ Combinación | No obesos con SM (n=24) | No obesos sin SM (n=3) | OR IC 95% | p | Confiere |
|--------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|------|-----------------|
| <i>GSTT1</i> - | 2.1% (1) | 16.7% (1) | 0.08 (0.00 – 1.98) | 0.03 | Protección |
| T1+/M1+ | 58.3% (14) | 0 | 9.66 (0.44 – 207.73) | 0.01 | Susceptibilidad |
| T1-/M1+ | 4.2% (1) | 33.3% (1) | 0.08 (0.003 – 1.98) | 0.03 | Protección |

La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado o el número de veces que se repite el alelo. SM: síndrome metabólico, OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza, p: probabilidad, p< 0.05: significativo.

El alelo *GSTT1*- se está incrementado en los pacientes no obesos sin SM con respecto a los no obesos con SM (OR: 0.08, IC95%: 0.006-1.97, p= 0.03), confirmando la presencia del mismo, protección contra el desarrollo de SM en los pacientes no obesos. Se apreció una frecuencia incrementada de la combinación *GSTT1*+/*GSTM1*+ (OR: 9.66; IC95%: 0.44 - 207.73, p= 0.001) en los no obesos con SM con respecto a los nos obesos sin SM, sugiriendo que los pacientes no obesos con esta combinación tienen ~10 veces mayor posibilidades de

desarrollar el síndrome metabólico. Se confirmó una frecuencia incrementada de la combinación *GSTT1*-/*GSTM1*+ en los pacientes no obesos sin SM con respecto a los no obesos con SM (OR: 0.08, IC95%: 0.003 – 1.98, p= 0.03) sugiriendo que la presencia de dicha combinación confiere protección contra el desarrollo del SM.

Discusión

Considerando que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de las alteraciones vasculares, resistencia a la insulina y la producción de energía alterada, se ha propuesto como un factor desencadenante de los procesos bioquímicos que acompañan al síndrome metabólico y la progresión de la EGHNA¹³.

Los resultados del presente estudio, demuestran que el alelo *GSTT1* nulo y la combinación *GSTT1*-/*GSTM1*- parecen estar asociados con protección para el desarrollo EGHNA y síndrome metabólico en individuos no obesos, mientras que la combinación *GSTT1*+/*GSTM1*+ está asociado con susceptibilidad a desarrollar síndrome metabólico en individuos no obesos.

Estudios realizados en Latinoamérica han mostrado una frecuencia incrementada del alelo *GSTM1* nulo (*GSTM1*-) en la población general, siendo más alta en México y Venezuela, con valores de 42.6% y 51%, respectivamente. Para el polimorfismo *GSTT1* nulo, reportan frecuencias de 9.6 en México % y 11 % en Venezuela. Para la combinación de los dos alelos nulos se reportaron en México un 4.2 %^{14,15}.

La ausencia de la actividad de las enzimas codificadas por los genes *GSTM1* y *GSTT1* será compensada por otras isoenzimas de la familia GST, debido a que estas enzimas presentan altos niveles de homología de secuencia y actúan sobre los mismos sustratos¹⁶. Por lo tanto, es relevante estudiar la variabilidad de los distintos genes *GST* y establecer haplotipos que pudiesen explicar la susceptibilidad y/o protección conferida por los polimorfismos de estos genes a desarrollar esta patología hepática.

En relación a la asociación de estos genes con EGHNA, un estudio reciente sugiere que el polimorfismo *GSTM1*- y polimorfismo funcional le105Val del gen *GSTP1*+ pueden contribuir a la vulnerabilidad a NAFLD en una muestra de sujetos iraníes¹⁰. Los polimorfismos de los genes xenobióticos (*GSTM1* y *GSTP1*) y proinflamatorios se asocian con EGHNA en la población iraní y parece ser una herramienta útil para la prevención y atención⁸. En el presente estudio no se encontró asociación de riesgo o protección entre los polimorfismos estudiados y la esteatohepatitis (datos no mostrados).

En la población estudiada el 67.92% (36) de los pacientes con EHGNA presentan síndrome metabólico, mientras que en un 32.07% (17) de los pacientes y el 100% de los controles el síndrome metabólico está ausente. El Síndrome metabólico predominó en el grupo de pacientes no obesos con sobrepeso (37.73%) en comparación con los pacientes obesos (22.64%) y

los no obesos sin sobrepeso (7.54%). No se observó asociación entre los polimorfismos estudiados y otras variables del síndrome metabólico.

Tomando en cuenta la alta heterogeneidad de la variabilidad de los genes *GSTM1* y *GSTT1* que ha sido descrita en estudios de poblacionales clasificados por región geográfica y grupos étnicos, es importante estimar las frecuencias de estos polimorfismos en distintos estados de Venezuela, debido a que la población venezolana es producto del mestizaje de una población amerindia original, la cual ha recibido genes europeos y africanos en distinta proporción, de acuerdo al área geográfica que se considere.

Los genes *GST* están organizados en grupos cromosómicos, y en su mayoría son genes altamente polimórficos, observándose con mayor frecuencia los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y con menor frecuencia, eliminaciones¹⁸. En base a esto, los resultados obtenidos pueden comprenderse considerando el hecho de que los genes *GSTT1* y *GSTM1* presentan polimorfismos que generan alelos funcionales que pudiesen disminuir la actividad enzimática y, por tanto, explicar las asociaciones observadas con la susceptibilidad o protección a desarrollar síndrome metabólico en pacientes no obesos.

Conclusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio, sugieren que el alelo *GSTT1*- y la combinación *GSTT1*-/*GSTM1*- confieren una posible protección contra el desarrollo de la enfermedad de hígado graso no alcohólico en la población estudiada. Se recomienda ampliar el tamaño de muestra, determinar otros polimorfismos asociados a los genes *GSTT1* y *GSTM1* así como realizar un estudio en individuos venezolanos procedentes de distintas regiones del país.

Referencias

- Ramai D, Facciorusso A, Vigandt E, Schaf B, Saadedeen W, Chauhan A, di Nunzio S, Shah A, Giacomelli L, Sacco R. Progressive Liver Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Cells* 2021;10(12):3401. doi: 10.3390/cells10123401. PMID: 34943908; PMCID: PMC8699709.
- Henry L, Paik J, Younossi ZM. Review article: the epidemiologic burden of non-alcoholic fatty liver disease across the world. *Aliment Pharmacol Ther* 2022;56(6):942-956. doi: 10.1111/apt.17158. PMID: 35880713.
- Chrysavgis L, Giannakodimos I, Diamantopoulou P, Cholongitas E. Non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: Clinical challenges of an intriguing link. *World J Gastroenterol* 2022;28(3):310-331. doi: 10.3748/wjg.v28.i3.310. PMID: 35110952; PMCID: PMC8771615.
- Schwimmer JB, Celedon MA, Lavine JE, Salem R, Campbell N, Schork NJ, Shiehorteza M, Yokoo T, Chavez A, Middleton MS, Sirlin CB. Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2009;136(5):1585-92. doi: 10.1053/j.gastro.2009.01.050. PMID: 19208353; PMCID: PMC3397140.
- Barrios-Maya MA, Ruiz-Ramirez A, El-Hafidi M. Endogenous Liver Protections Against Lipotoxicity and Oxidative Stress to Avoid the Progression of Non-alcoholic Fatty Liver to more Serious Disease. *Curr Mol Med* 2022;22(5):401-420. doi: 10.2174/1573405617666210712141600. PMID: 34931979.
- Martínez-Montoro JI, Cornejo-Pareja I, Gómez-Pérez AM, Tinahones FJ. Impact of Genetic Polymorphism on Response to Therapy in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* 2021;13(11):4077. doi: 10.3390/nu13114077. PMID: 34836332; PMCID: PMC8625016.
- Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ* 2010;17(9):1373-80. doi: 10.1038/cdd.2010.80. PMID: 20596078.
- Pryszazhnyuk V, Voloshyn O, Prysiashniuk I, Ilashchuk T, Sydorchuk L, Pryszazhnyuk P. Glutathione S-transferase T1 and M1 null genotype distribution among non-alcoholic fatty liver disease patients and its association with cytokine and adipokine profiles. *Clin Exp Hepatol* 2020;6(2):142-149. doi: 10.5114/ceh.2020.95678. PMID: 32728632; PMCID: PMC7380472.
- Pinheiro DS, Rocha Filho CR, Mundim CA, Júnior Pde M, Ulhoa CJ, Reis AA, Ghedini PC. Evaluation of glutathione S-transferase *GSTM1* and *GSTT1* deletion polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. *PLoS One* 2013;8(10): e76262. doi: 10.1371/journal.pone.0076262. PMID: 24098457; PMCID: PMC3789749.
- Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Fazaeli A, Bahari A, Hashemzahi NA, Shafieipour S, Taheri M, Moazeni-Roodi A, Zakeri Z, Bakhshipour A, Ghavami S. Association of genetic polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (*GSTT1*, *GSTM1*, and *GSTP1*) and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in Zahedan, Southeast Iran. *DNA Cell Biol* 2012;31(5):672-7. doi: 10.1089/dna.2011.1343. PMID: 22011249.
- Shyamala V, Ames GF. Genome walking by single specific primer-polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* 1993; 217:436-46. doi: 10.1016/0076-6879(93)17082-g. PMID: 8474344.
- Arand M, Mühlbauer R, Hengstler J, Jäger E, Fuchs J, Winkler L, Oesch F. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms. *Anal Biochem* 1996;236(1):184-6. doi: 10.1006/abio.1996.0153. PMID: 8619490.
- Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *J Nutr Biochem* 2008;19(8):491-504. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.06.011. PMID: 17855068.

14. Montero R, Araujo A, Carranza P, Mejía-Loza V, Serrano L, Albores A, Salinas JE, Camacho-Carranza R. Genotype frequencies of polymorphic GSTM1, GSTT1, and cytochrome P450 CYP1A1 in Mexicans. *Hum Biol* 2007;79(3):299-312. doi: 10.1353/hub.2007.0037. PMID: 18078203.
15. Chiurillo MA, Griman P, Santiago L, Torres K, Moran Y, Borjas L. Distribution of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and TP53 disease-associated gene variants in native and urban Venezuelan populations. *Gene* 2013;531(1):106-11. doi: 10.1016/j.gene.2013.08.055. PMID: 23994684.
16. Bhattacharjee P, Paul S, Banerjee M, Patra D, Banerjee P, Ghoshal N, Bandyopadhyay A, Giri AK. Functional compensation of glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null by another GST superfamily member, GSTM2. *Sci Rep* 2013; 3:2704. doi: 10.1038/srep02704. PMID: 24048194; PMCID: PMC3776957.
17. Damavandi N, Zeinali S. Association of xenobiotic-metabolizing enzymes (GSTM1 and GSTT 1), and pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) genetic polymorphisms with non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Biol Rep* 2021;48(2):1225-1231. doi: 10.1007/s11033-021-06142-1. PMID: 33492571.
18. Hollman AL, Tchounwou PB, Huang HC. The Association between Gene-Environment Interactions and Diseases Involving the Human GST Superfamily with SNP Variants. *Int J Environ Res Public Health* 2016;13(4):379. doi: 10.3390/ijerph13040379. PMID: 27043589; PMCID: PMC4847041.