



## ORIGINAL

# Papel de las variantes *GSTM1*, *GSTT1* y *MnSOD* en el desarrollo de enfermedad de Alzheimer de aparición tardía y su relación con el alelo 4 de *APOE*



E. de Mendonça, E. Salazar Alcalá y M. Fernández-Mestre\*

Laboratorio de Fisiopatología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela

Recibido el 3 de mayo de 2014; aceptado el 10 de octubre de 2014

Accesible en línea el 24 de diciembre de 2014

### PALABRAS CLAVE

Polimorfismo;  
Alzheimer;  
*GSTM1*;  
*GSTT1*;  
*MnSOD*;  
Daño oxidativo

### Resumen

**Introducción:** Diversos estudios han descrito que en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) hay una mayor oxidación de lípidos, proteínas y ADN. Además, en estos pacientes se ha observado diferencias en la actividad y polimorfismos de los genes que codifican las enzimas GST (T1 y M1) y MnSOD. En virtud de ello se planteó estudiar la variabilidad de los genes *GSTT1*, *GSTM1* y *MnSOD* en individuos venezolanos sanos y con EA.

**Métodos:** Se incluyeron 179 individuos venezolanos, no relacionados, agrupados en pacientes con EA (n = 79) e individuos sanos (n = 100). La presencia o ausencia de los genes *GSTT1/GSTM1* se determinó por PCR-SSP y los polimorfismo de los genes *MnSOD* y *APOE* por PCR-RFLP.

**Resultados:** El genotipo *GSTT1+/GSTM1-* parece favorecer el desarrollo de la EA (OR = 2,06; p = 0,01), siendo el riesgo mayor al estar en combinación con el alelo  $\epsilon 4$  del gen *APOE*: *GSTT1+/GSTM1-/\epsilon 3\epsilon 4* (OR = 3,07; p = 0,05), *GSTT1+/GSTM1-/\epsilon 4\epsilon 4* (OR = 5,52; p = 0,02). El polimorfismo *Ala-9Val* por sí solo no parece estar relacionado con la EA, sin embargo, la presencia del genotipo *Ala/Ala* incrementa el riesgo que proporciona el alelo  $\epsilon 4$  del gen *APOE*: *AlaAla/\epsilon 3\epsilon 4* (OR = 3,47; p = 0,03), *AlaAla/\epsilon 4\epsilon 4* (OR = 6,3; p = 0,01).

**Conclusiones:** Los resultados apoyan la hipótesis de que el deterioro de la función mitocondrial y el aumento de daño oxidativo están involucrados en la patogénesis de la EA. Es importante estudiar otros genes relacionados con estrés oxidativo y vías antioxidantes, los cuales pudiesen estar involucrados en la susceptibilidad a desarrollar la EA.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

\* Autora para correspondencia.

Correos electrónicos: [mfernandezmestre@gmail.com](mailto:mfernandezmestre@gmail.com), [mfernand@ivic.gob.ve](mailto:mfernand@ivic.gob.ve) (M. Fernández-Mestre).

**KEYWORDS**

Polymorphism;  
Alzheimer disease;  
*GSTM1*;  
*GSTT1*;  
*MnSOD*;  
Oxidative damage

## Role of genes *GSTM1*, *GSTT1*, and *MnSOD* in the development of late-onset Alzheimer disease and their relationship with *APOE*\*4

**Abstract**

**Introduction:** Several studies have reported increased oxidation of lipids, proteins and DNA in the brains of patients with Alzheimer disease (AD). Moreover, these patients display differences in the activity and polymorphisms of the genes encoding the enzymes GST (T1, M1) and MnSOD. For these reasons, we designed a study of the variability in *GSTT1*, *GSTM1*, and *MnSOD* genes in healthy and AD groups from a Venezuelan population.

**Methods:** We included 179 unrelated Venezuelan subjects classified as either AD patients (n=79) or healthy individuals (n=100). Presence or absence of the *GSTT1/GSTM1* genes was determined using PCR-SSP, and polymorphisms of *MnSOD* and *APOE* genes were identified with PCR-RFLP.

**Results:** The genotype *GSTT1+/GSTM1-* seems to favour development of AD (OR=2.06, P=.01). The risk level is higher when it is combined with the  $\epsilon$ 4 allele of the *APOE* gene: *GSTT1+/GSTM1-/\epsilon*3 $\epsilon$ 4 (OR=3.07, P=.05), *GSTT1+/GSTM1-/\epsilon*4 $\epsilon$ 4 (OR=5.52, P=.02). The Ala-9Val polymorphism does not appear to be related to AD. However, the presence of the Ala/Ala genotype increases the risk provided by the  $\epsilon$ 4 allele of the *APOE* gene: *AlaAla/\epsilon*3 $\epsilon$ 4 (OR=3.47, P=.03), *AlaAla/\epsilon*4 $\epsilon$ 4 (OR=6.3, P=.01).

**Conclusions:** The results support the hypothesis that impaired mitochondrial function and increased oxidative damage are involved in the pathogenesis of AD. It is important to study other genes related to oxidative stress and antioxidant pathways which could be involved in susceptibility to AD.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

**Introducción**

En las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA), el daño oxidativo es común, aunque no está claro si es causa o consecuencia de la enfermedad<sup>1</sup>. El daño oxidativo puede ser causado por el péptido  $\beta$  amiloide (A $\beta$ ) y los filamentos pareados helicoidalmente de la proteína tau, los cuales constituyen las lesiones características de la EA. Se ha descrito que el péptido A $\beta$  puede originar radicales libres<sup>2</sup> e inhibir la enzima citocromo oxidasa, contribuyendo así al estrés oxidativo<sup>3</sup>. Igualmente, se ha evidenciado que los filamentos pareados helicoidalmente de la proteína tau pueden formar productos avanzados de glucación, generando especies reactivas de oxígeno (ERO) suficientes para causar daño oxidativo<sup>4</sup>. Al poseer el cerebro un alto consumo de oxígeno, con altas demandas de energía, así como una capacidad antioxidante limitada en comparación con otros tejidos, lo hacen muy susceptible al daño oxidativo, por lo que es de gran importancia que las defensas antioxidantes sean efectivas en la eliminación de los radicales libres<sup>5</sup>. En pacientes con EA se han observado alteraciones en la actividad de las enzimas glutatión S transferasa (GST) y superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD)<sup>6</sup>. Las GST constituyen una familia de enzimas que ejercen un control crítico en la protección celular contra sustancias tóxicas y estrés oxidativo y son codificadas por, aproximadamente, 16 genes, subdivididos en 8 clases<sup>7</sup>. La clase  $\mu$  comprende 5 isoenzimas diferentes, denominadas desde *GSTM1* a *GSTM5*, mientras que la clase  $\theta$  comprende 2 isoenzimas, la *GSTT1* y la *GSTT2*. Los genotipos nulos de los genes *GSTM1* y *GSTT1* se caracterizan por una eliminación homocigota del gen completo, por lo que no hay actividad

de la enzima (revisado en Cooper<sup>8</sup>). Tanto la enzima *GSTT1* como la *GSTM1* son conocidas por su capacidad de catalizar la desintoxicación de oxígeno reactivo y los productos de la peroxidación lipídica<sup>9</sup>, por esta razón la inactividad enzimática de *GSTT1/M1* se relaciona con una mayor exposición al estrés oxidativo<sup>10</sup>.

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es una de las principales defensas contra los daños que puede provocar el radical superóxido (O<sup>-2</sup>), catalizando la conversión del superóxido en oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que luego será convertido en agua por la acción de la enzima catalasa o la glutatión peroxidasa<sup>11</sup>. Existen 3 isoformas de esta enzima: la citosólica [Cu/ZnSOD], la extracelular [EC-SOD] y la mitocondrial [MnSOD]<sup>12</sup>. El 90% de las ERO se originan en la mitocondria, por lo que la MnSOD es un antioxidante crítico en la protección de las células frente al estrés oxidativo. La actividad de esta enzima mitocondrial provee una defensa frente a la peroxidación de lípidos y, a nivel cerebral, protege la viabilidad de la membrana neuronal<sup>13</sup>. La enzima MnSOD es sintetizada en el citosol y luego es transportada a la mitocondria. En este transporte está involucrada una secuencia de 24 aminoácidos que se denomina secuencia blanco mitocondrial (MTS), la cual forma una estructura anfífilica helicoidal necesaria para su transporte hacia la mitocondria<sup>14</sup>. Se ha descrito que el gen que codifica para la MnSOD posee un polimorfismo que consiste en una sustitución de una timina (T) por una citosina (C) en el nucleótido 47, provocando un cambio de aminoácido (Val  $\rightarrow$  Ala) en la posición -9 de la MTS, causando alteraciones en la estructura de la enzima. Estos cambios en la estructura afectan el transporte de la MnSOD dentro de la mitocondria y, por tanto, afectan la defensa celular contra

los radicales superóxidos<sup>14</sup>. Asimismo, existen diversos estudios que muestran el papel de la *MnSOD* en la supervivencia de las neuronas frente al estrés oxidativo<sup>15,16</sup>. Considerando el papel de las enzimas *GSTT1*, *GSTM1* y *MnSOD* en la defensa frente al estrés oxidativo y la existencia de una posible relación entre el estrés oxidativo y la patogénesis de la EA, nos planteamos estudiar el papel de los polimorfismos de los genes *GSTT1*, *GSTM1* y *MnSOD* en el desarrollo de dicha enfermedad y correlacionar las asociaciones con la presencia del alelo  $\epsilon 4$  del gen *APOE*.

## Materiales y métodos

### Sujetos

El estudio fue realizado en 79 pacientes (edad promedio de  $70 \pm 10$  años) diagnosticados con EA del tipo esporádico, quienes acudieron al Servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario de Caracas, entre septiembre del 2004 y octubre del 2006. Estos pacientes fueron seleccionados según el protocolo clínico aplicado en la Unidad de Neuropsicología Dr. Luis Borges, del Servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario de Caracas. Dicho protocolo se estructuró de acuerdo a los criterios de la Sociedad Psiquiátrica Americana (DSM-IV) del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos, de la Comunicación y de Accidentes Vasculares Cerebrales (NINCDS) y los criterios de la Asociación para la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Conexos (ADRDA).

El grupo control estuvo conformado por 100 individuos sanos, venezolanos, con un promedio de edad de  $71 \pm 10$  años. A este grupo se le realizó el minexamen mental de Folstein, las pruebas de laboratorio e imagenológicas.

Todos los individuos participantes en el estudio firmaron un consentimiento informado, el cual en el caso de los pacientes con EA fue autorizado por su representante. Dicho consentimiento fue aprobado por el Comité de Bioética del IVIC y del Hospital Clínico Universitario de Caracas.

### Extracción del ADN genómico

El ADN genómico fue extraído de los leucocitos y linfocitos de sangre periférica siguiendo el método de Bunce<sup>17</sup>.

### Detección de los genes *GSTT1/GSTM1*

Para detectar la presencia o ausencia de los genes *GSTM1* y *GSTT1* se utilizó un protocolo de PCR múltiple, siguiendo la metodología descrita por Lin et al.<sup>18</sup>, con algunas modificaciones, y los iniciadores específicos publicados por Chen et al.<sup>19</sup>.

### Genotipificación del gen *MnSOD*

El polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD* se estudió mediante la técnica de PCR-RFLP, utilizando los iniciadores y el protocolo descrito por Ambrosone et al.<sup>20</sup>.

### Genotipificación del gen *APOE*

La genotipificación y evaluación del polimorfismo de *APOE* se realizó mediante PCR-RFLP, utilizando los iniciadores descritos por Emi et al.<sup>21</sup> y utilizando el protocolo descrito por Hixson y Vernier<sup>22</sup>.

### Análisis estadísticos

Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron calculadas. La significación estadística de las diferencias de frecuencias (alelos, genotipos, combinaciones genotípicas) entre los grupos fue estimada por la prueba de ji cuadrado ( $\chi^2$ ) Mantel-Haenszel usando tablas de contingencia  $2 \times 2$ . Los valores de *p* se corrigieron multiplicándolos por el número de comparaciones hechas (corrección de Bonferroni) y se consideraron significativas cuando el valor de  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Distribución de los genotipos y combinación genotípica de los genes *GSTT1-GSTM1* en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Alzheimer

En la [tabla 1](#) se muestra la distribución de los genotipos *GSTM1* [silvestre (+), nulo (-)] y *GSTT1* [silvestre (+), nulo (-)] en individuos sanos y pacientes con EA. Al comparar las frecuencias, el genotipo *GSTM1* silvestre presentó una frecuencia significativamente incrementada en los sanos con respecto a los pacientes (OR: 0,58; IC 95%: 0,3235-1,0659;  $p = 0,04$ ;  $pc = ns$ ). En contraste, el genotipo *GSTM1* nulo presentó una frecuencia significativamente incrementada en los pacientes con respecto a los sanos (OR: 1,7; IC 95%: 0,9381-3,0903;  $p = 0,04$ ;  $pc = ns$ ). Sin embargo al corregir el valor de *p* estas perdieron significación.

Al realizar la combinación de los genotipos de los genes *GSTT1* y *GSTM1*, se observaron en ambos grupos todas las combinaciones posibles. En los pacientes con EA la combinación *GSTT1+/GSTM1-* presentó la mayor frecuencia, seguida por las combinaciones *GSTT1+/GSTM1+*, *GSTT1-/GSTM1+* y *GSTT1-/GSTM1-*. En el grupo control (sanos) la combinación *GSTT1+/GSTM1+* presentó la frecuencia más elevada, seguida por las combinaciones *GSTT1+/GSTM1-*, *GSTT1-/GSTM1+* y *GSTT1-/GSTM1-*. Al comparar las frecuencias, la combinación *GSTT1+/GSTM1-* presentó una frecuencia significativamente incrementada en los pacientes con respecto a los sanos (OR: 2,06; IC 95%: 1,1118-3,8036;  $p = 0,009$ ;  $pc = 0,036$ ) y al corregir el valor de *p* esta permaneció significativa ([tabla 1](#)).

### Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MnSOD* en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Alzheimer

En los 2 grupos el genotipo *Ala/Val* presentó la mayor frecuencia, seguido por los genotipos *Ala/Ala* y *Val/Val* en los pacientes y por los genotipos *Val/Val* y *Ala/Ala* en los

**Tabla 1** Distribución de los genotipos y de las combinaciones genotípicas de los genes *GSTT1* y *GSTM1* en pacientes con EA e individuos sanos

	EA n = 79	Sanos n = 100	OR IC 95%	p
<b>Alelos <i>GSTT1</i></b>				
Silvestre (+)	83,5 (66)	78 (78)	1,43	ns
Nulo (-)	16,5 (13)	22 (22)	0,69	ns
<b>Alelos <i>GSTM1</i></b>				
Silvestre (+)	46,8 (37)	60 (60)	0,58	0,04
Nulo (-)	53,2 (42)	40 (40)	1,7	0,04
<b>Combinación de alelos</b>				
<i>GSTT1+</i> <i>GSTM1+</i>	35,4 (28)	47 (47)	0,61	0,08
<i>GSTT1-</i> <i>GSTM1-</i>	5,1 (4)	9 (9)	0,53	ns
<i>GSTT1+</i> <i>GSTM1-</i>	48,1 (38)	31 (31)	2,06	0,009*
<i>GSTT1-</i> <i>GSTM1+</i>	11,4 (9)	13 (13)	0,86	ns

EA: enfermedad de Alzheimer; IC 95%: intervalo de confianza; ns: no significativo; OR: odds ratio.

Los valores mostrados en paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje. significativo después de la corrección de Bonferroni

sanos. Al compararse las frecuencias, el genotipo *Ala/Val* presentó una frecuencia significativamente incrementada en los pacientes con respecto a los sanos (OR: 1,9; IC 95%: 0,9147-3,9498; p=0,04; pc=ns). Sin embargo, al corregir el valor de p esta perdió significación (tabla 2).

### Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *APOE* en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Alzheimer

En la tabla 3 se muestran los genotipos del gen *APOE* presentes en pacientes y sanos. Las frecuencias de los genotipos  $\epsilon 2/\epsilon 3$  (OR=0,04; IC 95%: 0,002-0,764; p=0,0007; pc=0,0035) y  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (OR=0,55; IC 95%: 0,3073-1,0136; p=0,02; pc=ns) están significativamente incrementadas en los sanos con respecto a los pacientes. En contraste, en los pacientes las frecuencias de los genotipos  $\epsilon 3/\epsilon 4$  (OR=1,93; IC 95%: 1,0164-3,6980; p=0,02; pc=ns) y  $\epsilon 4/\epsilon 4$  (OR=4,29; IC

95%: 1,3241-13,9016; p=0,004; pc=0,02) están significativamente incrementadas en comparación con los sanos. Asimismo, al comparar las frecuencias alélicas, el alelo  $\epsilon 2$  (OR=0,04; IC 95%: 0,0059-0,3651; p=0,000025; pc=0,000075) y el alelo  $\epsilon 3$  (OR=0,5; IC 95%: 0,3220-0,8195; p=0,0024; pc=0,0072) presentaron una frecuencia significativamente incrementada en los sanos con respecto a los pacientes. No obstante, en los pacientes el alelo  $\epsilon 4$  presentó una frecuencia significativamente incrementada con respecto a los sanos (OR=2,8; IC 95%: 1,7003-4,6221; p=0,000019; pc=0,000057).

### Estudio del efecto combinado del polimorfismo de los genes *GSTT1*, *GSTM1* y el gen *APOE*

De las 24 combinaciones *GSTT1/GSTM1/APOE* posibles se observaron 11 en el grupo EA y 15 en sanos. Las

**Tabla 2** Frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD* en pacientes con EA y controles sanos

	EA n = 79	Sanos n = 100	OR IC 95%	p
<b>Genotipos</b>				
<i>Ala/Ala</i>	26,6 (21)	16 (16)	1,9	0,04
<i>Ala/Val</i>	54,4 (43)	63 (63)	0,7	ns
<i>Val/Val</i>	19 (15)	21 (21)	0,88	ns
<b>Alelos</b>				
<i>Ala</i>	53,8 (85)	47,5 (95)	1,28	ns
<i>Val</i>	46,2 (73)	52,5 (105)	0,77	ns

EA: enfermedad de Alzheimer; IC 95%: intervalo de confianza; ns: no significativo; OR: odds ratio.

Los valores mostrados en paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje.

**Tabla 3** Frecuencias de los genotipos y alelos del gen *APOE* en pacientes con EA e individuos sanos

	EA n = 79	Controles n = 100	OR IC 95%	p
<b>Genotipo</b>				
$\epsilon 2/\epsilon 3$	0 (0)	12 (12)	0,04	0,0007
$\epsilon 2/\epsilon 4$	1,3 (1)	0 (0)	3,84	ns
$\epsilon 3/\epsilon 3$	45,6 (36)	60 (60)	0,55	0,02
$\epsilon 3/\epsilon 4$	37,9 (30)	24 (24)	1,93	0,02
$\epsilon 4/\epsilon 4$	15,2 (12)	4 (4)	4,29	0,004
<b>Alelos</b>				
$\epsilon 2$	0,6 (1)	6 (12)	0,04	0,00002
$\epsilon 3$	64,6 (102)	78 (156)	0,513	0,0024
$\epsilon 4$	34,8 (55)	16 (32)	2,8	0,000019

EA: enfermedad de Alzheimer; IC 95%: intervalo de confianza; ns: no significativo; OR: odds ratio.

Los valores mostrados en paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo. La frecuencia está expresada en porcentaje

**Tabla 4** Frecuencias de las combinaciones genotípicas *GSTT1/GSTM1/APOE* en pacientes con EA e individuos sanos

	EA n = 79	Controles n = 100	OR IC 95%	p (X <sup>2</sup> )
<b>Genotipo</b>				
<i>GSTT1+/GSTM1+/ε2ε3</i>	0 (0)	5 (5)	0,10	0,02
<i>GSTT1+/GSTM1+/ε3ε3</i>	14 (11)	26 (26)	0,46	0,02
<i>GSTT1+/GSTM1-/ε3ε4</i>	14 (11)	5 (5)	3,07	0,019
<i>GSTT1+/GSTM1-/ε4ε4</i>	10 (8)	2 (2)	5,52	0,009

EA: enfermedad de Alzheimer; IC 95%: intervalo de confianza; OR: odds ratio; X<sup>2</sup>: prueba de ji cuadrado.

Los valores mostrados en paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo. La frecuencia está expresada en porcentaje

frecuencias de las combinaciones *GSTT1+/GSTM1+/ε2ε3* (OR=0,1; IC 95%: 0,0059-2,004; p=0,02; pc=ns) y *GSTT1+/GSTM1+/ε3ε3* (OR=0,46; IC 95%: 0,2114-1,002; p=0,02; pc=ns) están significativamente incrementadas en sanos con respecto a los pacientes. Por el contrario, las frecuencias de las combinaciones genotípicas *GSTT1+/GSTM1-/ε3ε4* (OR=3,07; IC 95%: 1,0210-9,2514; p=0,019; pc=ns) y *GSTT1+/GSTM1-/ε4ε4* (OR=5,52; IC 95%: 1,1381-26,7837; p=0,009; pc=ns) están significativamente incrementadas en los pacientes con respecto a los sanos (tabla 4).

#### Estudio del efecto combinado del polimorfismo *Ala-9Val* del gen *MnSOD* y el gen *APOE*

De las 18 combinaciones *MnSOD/APOE* posibles, 12 se observaron en sanos y 9 en pacientes. Las combinaciones *AlaAla/ε3ε4* (OR=3,4; IC 95%: 1,0476-11,5486; p=0,016; pc=ns) y *AlaVal/ε4ε4* (OR=7,9; IC 95%: 1,7027-36,8988; p=0,001; pc=ns) presentaron una frecuencia significativamente incrementada en pacientes con respecto a sanos. Es importante destacar que las combinaciones genotípicas *AlaVal/ε2ε3* (OR=0,09; IC 95%: 0,0050-1,6480; p=0,014; pc=ns), *AlaVal/ε3ε3* (OR=0,5; IC 95%: 0,2642-0,9461; p=0,016; pc=ns) y *ValVal/ε2ε3* (OR=0,1; IC 95%: 0,0059-2,0049; p=0,02; pc=ns) estaban presentes únicamente en los individuos sanos (tabla 5).

#### Discusión

El desbalance entre la producción de las ERO y nitrógeno, y su eliminación es lo que se conoce como estrés oxidativo, el

cual la célula debe contrarrestar para restaurar el balance redox y así evitar la pérdida de funciones neuronales y la muerte neuronal, que se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas<sup>23</sup>. Las investigaciones relacionadas con la patogénesis de la EA se han centrado en el papel del estrés oxidativo, debido al alto consumo energético y al bajo nivel de defensa antioxidante del sistema nervioso central, que lo hacen altamente sensible al estrés oxidativo<sup>24</sup>. En el cerebro con EA los sistemas antioxidantes son menos funcionales, pudiendo guiar a un incremento de las ERO y de las especies reactivas de nitrógeno que reaccionarían con biomoléculas, incluyendo proteínas, lípidos, hidratos de carbono, ADN y ARN, provocando alteraciones en su estructura y la pérdida de sus funciones<sup>25</sup>. El estrés oxidativo en el cerebro con EA está bien documentado, observándose concentraciones alteradas de las enzimas antioxidantes, así como un aumento en la concentración de los marcadores de estrés oxidativo en el cerebro con EA en comparación con los controles pareados por edad. Además, se ha evidenciado el papel del estrés oxidativo en la progresión de la EA, al comparar la aparición de las mismas proteínas cerebrales oxidadas en sujetos con deterioro cognitivo leve, EA temprana y EA en fase tardía, mostrando que ciertas vías principales se activan y podrían estar implicadas en la progresión de la EA<sup>25</sup>. Debido a que la familia de enzimas GST conjugan el glutatión reducido con compuestos electrofílicos y de esta manera facilitan su eliminación de las células, evitando el daño oxidativo<sup>26</sup>, se han publicado estudios sobre el papel de los genes que codifican para las enzimas GSTM1 y GSTT1 en diferentes patologías. Estas enzimas poseen un fenotipo nulo, caracterizado por la ausencia de la actividad de la enzima, debido a la herencia de una eliminación homocigota del gen completo. En

**Tabla 5** Frecuencias de las combinaciones genotípicas *MnSOD/APOE* en pacientes con EA e individuos sanos

	EA n = 79	Controles n = 100	OR IC95%	p (X <sup>2</sup> )
<b>Genotipo</b>				
<i>AlaAla/ε3ε4</i>	12,6 (10)	4 (4)	3,4	0,03
<i>AlaVal/ε2ε3</i>	0 (0)	6 (6)	0,09	0,03
<i>AlaVal/ε3ε3</i>	26,6 (21)	42 (42)	0,5	0,02
<i>AlaVal/ε4ε4</i>	11,4 (9)	2 (2)	7,9	0,01
<i>ValVal/ε2ε3</i>	0 (0)	5 (5)	0,1	0,05

EA: enfermedad de Alzheimer; IC 95%: intervalo de confianza; OR: odds ratio; X<sup>2</sup>: prueba de ji cuadrado.

Los valores mostrados en paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje.

este estudio, el genotipo *GSTM1* nulo presentó una frecuencia significativamente incrementada en los pacientes con EA (OR: 1,7;  $p = 0,04$ ;  $pc = ns$ ) y el genotipo *GSTM1* silvestre una frecuencia significativamente incrementada en los sanos (OR: 0,58;  $p = 0,04$ ;  $pc = ns$ ), contrastando con lo descrito en otros estudios<sup>9,27–30</sup>. Asimismo, la combinación *GSTT1+/GSTM1–* es más frecuente en los pacientes con EA (OR: 2,06;  $pc = 0,036$ ) con respecto a los sanos. Estos resultados sugieren que el genotipo *GSTM1* nulo y la combinación *GSTT1+/GSTM1–* estarían confiriendo hasta 2 veces mayor riesgo de padecer EA en quienes lo portan. Considerando que una gran variedad de estudios sugieren que la variabilidad del gen *APOE* es un factor genético de riesgo en la EA<sup>31–33</sup>, se establecieron las combinaciones entre los genotipos *GSTT1/GSTM1* y *APOE*, obteniéndose resultados interesantes. Las frecuencias de las combinaciones genotípicas *GSTT1+/GSTM1–/ε3ε4* y *GSTT1+/GSTM1–/ε4ε4* estaban significativamente incrementadas en los pacientes con respecto a los individuos sanos, mostrando que la presencia de las mismas podría conferir susceptibilidad al desarrollo de EA y que el riesgo que parece conferir la presencia de uno o 2 alelos  $\epsilon 4$  del gen *APOE* se incrementa en aquella combinación donde el gen *GSTM1* está ausente. Por lo tanto, un aumento en la agregación del péptido A $\beta$  debido a la isoforma E4 de la apolipoproteína E<sup>34</sup>, junto con la disminución de defensas antioxidantes, como consecuencia de la eliminación homocigota del gen *GSTM1*, podrían estar causando un mayor estrés oxidativo y, por ende, una mayor muerte neuronal, explicando así cómo el riesgo proporcionado por el alelo  $\epsilon 4$  del gen *APOE* se ve aumentando en ausencia del gen *GSTM1*. Además, las frecuencias de las combinaciones donde están presentes los genotipos *GSTT1* y *GSTM1* silvestres y la presencia de por lo menos un alelo  $\epsilon 3$  [*GSTT1+/GSTM1+/ε2ε3* y *GSTT1+/GSTM1+/ε3ε3*] estaban significativamente incrementadas en los individuos sanos con respecto a los pacientes, sugiriendo que la presencia de las mismas podría conferir protección contra el desarrollo de la EA. Los péptidos A $\beta$  son componentes de las placas seniles que inician la degeneración de las neuronas del cerebro en la EA al incrementar las ERO que pueden exceder las capacidades de defensa de la célula. Kaminsky y Kosenko<sup>35</sup> investigaron los efectos *in vivo* de los péptidos A $\beta$  sobre las enzimas antioxidantes, de fuentes enzimáticas mitocondriales y no mitocondriales, en cerebro de rata, y describieron que los péptidos A $\beta$  aumentan las actividades enzimáticas formadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inhiben la actividad de las enzimas que consumen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mitocondria y citosol, sugiriendo que el desequilibrio entre las actividades de enzimas generadoras y metabolizadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contribuyen con el estrés oxidativo subyacente en la neurodegeneración y la muerte neuronal en la EA. Igualmente, el péptido A $\beta$  también se ha visto involucrado en la disminución de la expresión de la citocromo c oxidasa en la mitocondria, afectando así la cadena transportadora de electrones y originando ERO<sup>3</sup>. La MnSOD es una enzima que forma parte de las defensas enzimáticas antioxidantes de la célula y es la primera línea de defensa de la células frente al anión superóxido convirtiéndolo en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>12</sup>. Existen diversos estudios que proponen un papel de la MnSOD en la supervivencia de las neuronas frente al estrés oxidativo. Entre estas evidencias está el estudio realizado con ratones knockout para el gen *MnSOD*, en el cual se describió que estos ratones sucumbían poco tiempo

después de nacer y presentaban neurodegeneración<sup>15,16</sup>. Igualmente, en ratones transgénicos se ha reportado que la deficiencia de MnSOD causa un aumento en las concentraciones del péptido A $\beta$ , favoreciendo la formación de las placas neuríticas (revisado en Sompol et al.<sup>36</sup>). Sin embargo, otros estudios describen que la sobreexpresión de la enzima MnSOD protege a las neuronas del daño oxidativo<sup>37–39</sup>. En virtud de ello, se estudió un polimorfismo, *Ala-9Val* del gen *MnSOD*, que altera la estructura secundaria de la proteína y, por tanto, el transporte de la MnSOD dentro de la mitocondria, afectando la defensa celular contra los radicales superóxidos<sup>40</sup>. Al comparar las frecuencias de los genotipos *Ala-9Val* del gen *MnSOD*, el genotipo *Ala/Ala* presentó una frecuencia significativamente incrementada en pacientes con respecto a sanos, contrastando con lo descrito por Ventriglia et al. en población italiana<sup>13</sup>. Además, al evaluar el efecto combinado del gen *MnSOD* y *APOE*, las frecuencias de las combinaciones *AlaAla/ε3ε4* (OR = 3,4;  $p = 0,03$ ) y *AlaVal/ε4ε4* (OR = 7,9;  $p = 0,01$ ) estaban significativamente incrementadas en pacientes con respecto a sanos, sugiriendo que la presencia de las mismas pudieran conferir susceptibilidad al desarrollo de EA. Por lo tanto, la presencia del alelo *Ala*, asociado con una mayor actividad de la enzima MnSOD humana, y la presencia del alelo  $\epsilon 4$  favorece el desarrollo de la EA. Cabe destacar que el riesgo que confieren los genotipos  $\epsilon 3\epsilon 4$  y  $\epsilon 4\epsilon 4$  (OR = 1,93 y OR = 4,29 respectivamente) se incrementa  $\sim 2$  veces al estar en combinación con los genotipos *AlaAla* y *AlaVal* del gen *MnSOD* (OR = 3,4 y OR = 7,9 respectivamente). Por el contrario, las combinaciones genotípicas *AlaVal/ε2ε3*, *AlaVal/ε3ε3* y *ValVal/ε2ε3* presentes únicamente en los individuos sanos, sugieren que la presencia de las mismas podrían conferir protección contra el desarrollo de la EA. Por lo tanto, la presencia del alelo  $\epsilon 3$ , en forma homocigota o con el alelo  $\epsilon 2$ , con una o 2 dosis del alelo *Val*, asociado con una actividad anormal de la enzima MnSOD<sup>40,41</sup>, protege a los individuos de desarrollar la EA. Fundamentados en que el transporte hacia la mitocondria de la forma *Ala* de la MnSOD es entre un 30-40% más eficiente que la forma *Val*<sup>14</sup> y que esta enzima cataliza la dismutación del anión superóxido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que luego es eliminado de la mitocondria por la acción de la catalasa y glutatión peroxidasa, se sugiere que la mayor actividad de la enzima MnSOD generaría una mayor producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, causando un desbalance entre la generación y el metabolismo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, favoreciendo el estrés y daño oxidativo de la célula, posiblemente debido a que la actividad de las enzimas involucradas con la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como la catalasa y glutatión peroxidasa, se encuentran disminuidas<sup>35,42</sup>. Los resultados apoyan la hipótesis de que el deterioro de la función mitocondrial y el aumento de daño oxidativo están involucrados en la patogénesis de la EA. Sin embargo, es importante destacar que existen otros genes relacionados con estrés oxidativo y vías antioxidantes, que podrían estar involucrados en la susceptibilidad a desarrollar la EA, por lo tanto, sería relevante estudiar la variabilidad genética de dichos genes.

## Conflicto de intereses

Las autoras declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Dorado C, Rugerio C, Rivas S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM*. 2003;46:229–35.
- Huang X, Cuajungco M, Atwood C, Hartshorn MA, Tyndall J, Hanson GR, et al. Cu(II) potentiation of Alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J Biol Chem*. 1999;274:37111–6.
- Hong WK, Han EH, Kim DG, Ahn JY, Park JS, Han BG. Amyloid-beta-peptide reduces the expression level of mitochondrial cytochrome oxidase subunits. *Neurochem Res*. 2007;32:1483–8.
- Yan SD, Chen X, Schmidt A, Brett J, Godman G, Zou Y, et al. Glycated tau protein in Alzheimer disease: A mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:7787–91.
- Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2007;85:3036–40.
- Ansari MA, Scheff SW. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69:155–67.
- Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*. 2000;61:154–66.
- Cooper DN. Human gene evolution. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 1999.
- Pinhel MA, Nakazone MA, Cação JC, Piteri R, Dantas RT, Godoy MF, et al. Glutathione S-transferase variants increase susceptibility for late-onset Alzheimer's disease: Association study and relationship with apolipoprotein ε4 allele. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46:439–45.
- Uzunoglu S, Acar H, Okudan N, Gokbel H, Mevlitoğlu I, Sari F. Evaluation of the association between null genotypes of glutathione-S-transferases and Behcet's disease. *Arch Dermatol Res*. 2006;297:289–93.
- Marcus DL, Strafiac JA, Freedman ML. Differential neuronal expression of manganese superoxide dismutase in Alzheimer's disease. *Med Sci Monit*. 2006;12:8–14.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Bio Med*. 2002;33:337–49.
- Ventriglia M, Bocchio L, Scassellat C, Squitti R, Binetti G, Ghidoni R, et al. Lack of association between MnSOD gene polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Aging Clin Exp Res*. 2005;17:445–8.
- Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*. 2003;13:145–57.
- Li YB, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson TL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide-dismutase. *Nat Genet*. 1995;11:376–81.
- Lebovitz RM, Zhang HJ, Vogel H, Cartwright J, Dionne L, Lu NF, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:9782–7.
- Bunce M. Histocompatibility testing. London: Ed: Lidwell and Navarrette C. Imperial College Press; 2000. p. 149–86.
- Lin D, Tang Y, Peng Q, Lu S, Ambrosone CB, Kadublar FF. Susceptibility to esophageal cancer and genetic polymorphisms in glutathione-S-transferase T1, P1 and M1 and cytochrome p450. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998;7:1013–8.
- Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, et al. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet*. 1996;347:295–7.
- Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman E, Vena JE, Marshall JR, et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res*. 1999;59:602–6.
- Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, et al. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics*. 1988;3:373–9.
- Hixson J, Vernier D. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*. 1990;31:545–8.
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative disease and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 2004;58:39–46.
- Castellani R, Hirai K, Aliev G, Drew KL, Nunomura A, Takeda A, et al. Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2002;70:357–60.
- Sultana R, Butterfield DA. Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010;19:341–53.
- Hayes JD, Strange RC. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Rad Res*. 1995;22:193–207.
- Green VJ, Pirmohamed M, Kitteringham NR, Knapp MJ, Park BK. Glutathione S-transferase mu genotype (GSTM1\*0) in Alzheimer's patients with tacrine transaminitis. *Br J Clin Pharmacol*. 1995;39:411–5.
- Stroombergen M, Waring R. Determination of glutathione S-transferase (and polymorphisms in neurological disease. *Hum Exp Toxicol*. 1999;18:141–5.
- Bernardini S, Bellincampi L, Ballerini S, Federici G, Iori R, Trequatrini A, et al. Glutathione S-transferase P1 \*C allelic variant increases susceptibility for late-onset Alzheimer disease: Association study and relationship with apolipoprotein E epsilon 4 allele. *Clin Chem*. 2005;51:944–51.
- Ghosh T, Mustafa M, Kumar V, Datta SK, Bhatia MS, Sircar S, et al. A preliminary study on the influence of glutathione S transferase T1 (GSTT1) as a risk factor for late onset Alzheimer's disease in North Indian population. *Asian J Psychiatr*. 2012;5:160–3.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: High-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:1977–81.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993;43:1467–72.
- Molero AE, Pino-Ramirez G, Maestre G. Modulation by age and gender of risk for Alzheimer's disease and vascular dementia associated with the apolipoprotein E-ε4 allele in Latin Americans: Findings from the Maracaibo Aging Study. *Neurosci Lett*. 2001;307:5–8.
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2009;63:287–303.
- Kaminsky Y, Kosenko E. Effects of amyloid-beta peptides on hydrogen peroxide-metabolizing enzymes in rat brain *in vivo*. *Free Radical Res*. 2008;42:564–73.
- Sompol P, Ittarat W, Tangpong J, Chen Y, Doubinskaia I, Batinic-Haberle I, et al. A neuronal model of Alzheimer's disease: An insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience*. 2008;153:120–30.
- Gonzalez-Zulueta M, Ensz LM, Mukhina G, Lebovitz RM, Zwacka RM, Engelhardt JF, et al. Manganese superoxide dismutase protects nNOS neurons from NMDA and nitric oxide-mediated neurotoxicity. *J Neurosci*. 1998;18:2040–55.
- Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St Clair DK, Yen HC, Germeyer A, et al. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: Suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*. 1998;18:687–97.

39. Klivenyi P, St. Clair D, Wermer M, Yen HC, Oberley T, Yang LC, et al. Manganese superoxide dismutase overexpression attenuates MPTP toxicity. *Neurobiol Dis.* 1998;5:253–8.
40. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;226:561–5.
41. Hori H, Ohmori O, Shinkai T, Kojima H, Okano C, Suzuki T, et al. Manganese superoxide dismutase gene polymorphism and schizophrenia: relation to tardive dyskinesia. *Neuropsychopharmacology.* 2000;23:170–7.
42. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:718–44.