

Usategui-Martín R^{1,2}, Corral E¹, Alonso M¹, Calero-Paniagua I^{2,3}, Carranco-Medina TE^{2,3}, Quesada-Moreno A^{2,3}, Sánchez-González MD^{2,3}, Hidalgo-Calleja C^{2,3}, Pérez-Garrido L^{2,3}, Montilla Morales C^{2,3,4}, Mirón-Canelo JA⁵, González-Sarmiento R^{1,2,4}, del Pino-Montes J^{2,3,4}

1 Unidad de Medicina Molecular - Departamento de Medicina - Universidad de Salamanca

2 Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL)

3 Servicio de Reumatología - Hospital Universitario de Salamanca

4 Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF)

5 Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología Médica - Universidad de Salamanca

Estudio de las deleciones de los genes GSTM1 y GSTT1 y del polimorfismo *Ile105Val* del gen GSTP1 en pacientes con enfermedad ósea de Paget

Correspondencia: Javier del Pino Montes - Servicio de Reumatología - Hospital Universitario de Salamanca - Pº San Vicente, 182 - 37007 Salamanca (España)

Correo electrónico: jpino@usal.es

Fecha de recepción: 29/08/2014

Fecha de aceptación: 23/11/2014

Resumen

Fundamento: La enfermedad ósea de Paget (EOP) es un trastorno focal del hueso con aumento el número, tamaño y actividad de los osteoclastos. Algunos datos epidemiológicos apoyan la teoría de su relación con agentes ambientales tóxicos o infecciosos. Su interacción con algunas alteraciones genéticas predisponentes conducirían a la EOP. Las glutatión-S-transferasas (GST) intervienen en la metabolización de toxinas, al catalizar el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico, glutatión reducido o GSH (g-Glu-Cys-Gly) sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas. Estudiamos si la variabilidad de los genes GSTM1, GSTP1 y GSTT1 se relaciona con el riesgo a desarrollar EOP.

Pacientes y métodos: Analizamos a 148 pacientes diagnosticados de EOP y a 207 individuos controles pareados en sexo y edad sin antecedentes de alteraciones óseas. Con DNA genómico obtenido de sangre periférica se estudió la presencia-ausencia de deleción en los genes GSTM1 y GSTT1, mediante PCR multiplex. El estudio del polimorfismo *Ile105Val* del gen GSTP1 se llevó a cabo mediante PCR y posterior digestión con la enzima de restricción BsmI. Se analizó la distribución de genotipos mediante el test chi-cuadrado de Pearson. Cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas, realizamos una regresión logística multivariante para conocer el riesgo que puede generar la presencia de un determinado genotipo. Utilizamos el programa SPSS 21.0. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquéllas con valores de $p < 0,05$.

Resultados: Encontramos diferencias en la distribución de la presencia-ausencia de deleción en el gen GSTM1; no ser portador de la deleción o serlo en heterocigosis en el gen GSTM1 confiere un menor riesgo a desarrollar EOP (OR=0,56, IC 95%: 0,36-0,87; $p=0,011$). En el estudio de los genes GSTT1 y GSTP1 no hubo diferencias significativas.

Conclusión: La actividad detoxificadora disminuye cuando se heredan las dos copias delecionadas del gen GSTM1 al disminuir la actividad enzimática; se ha asociado con una mayor susceptibilidad para algunos tumores, hepatopatía alcohólica y otros problemas inflamatorios. No conocemos descripción de su asociación con la EOP. En los individuos portadores del gen GSTM1 delecionado en homocigosis se observa con más frecuencia EOP. Este hecho podría explicar los hallazgos epidemiológicos que asocian la EOP a la exposición a determinados agentes ambientales.

Palabras clave: enfermedad ósea de Paget, glutatión-S-transferasa, genética, polimorfismo.

Study of the deletions in the GSTM1 and GSTT1 genes and of the *Ile105Val* polymorphism of the GSTP1 gene in patients with Paget's disease of bone

Summary

Background: Paget's disease of bone (PDB) is a disorder focussed on the bone with an increase in the number, size and activity of the osteoclasts. Some epidemiological data support the theory of its relationship with toxic or infectious environmental agents, whose interaction with some predisposing genetic alterations may lead to PDB. The glutathione S-transferases (GST) are involved in the metabolism of toxins, by catalysing the nucleophilic attack of the physiological substrate, reduced glutathione or GSH (g-Glu-Cys-Gly) on the electrophilic centre of a great number of toxic structures. We studied whether the variability of the GSTM1, GSTP1 and GSTT1 genes is related to the risk of developing PDB.

Patients and methods: We analysed 148 patients diagnosed with PDB, and 207 control individuals matched in sex and age with no history of bone alterations. Using genomic DNA obtained from peripheral blood the presence-absence of the GSTM1 and GSTT1 genes was studied by means of multiplex PCR. The study of the *Ile105Val* GSTP1 gene was carried out using PCR and subsequent digestion with the restriction enzyme BsmAI. The distribution of genotypes was analysed by means of the Pearson chi-square test. When statistically significant differences were found we carried out a multivariate logistical regression to determine the risk which the presence of a particular genotype could generate. We used the CSPSS 21.0 program. Differences were considered to be statistically significant when the value of $p < 0.05$.

Results: We found differences in the distribution of the presence-absence of the deletion in the GSTM1 gene; not being a carrier for the deletion or being a heterozygous carrier in the GSTM1 gene confers a lower risk of developing PDB (OR=0.56, 95% CI: 0.36-0.87; $p=0.011$). In the study of the GSTT1 and GSTP1 genes there were no significant differences.

Conclusion: The detoxifying activity diminishes when two copies of the GSTM1 gene with deletions are inherited by reducing in enzyme activity, which has been associated with a greater susceptibility to some cancers, alcoholic hepatopathy and other inflammatory problems. We are not aware of any description of its association with PDB. PDB is observed more frequently in carriers of the homozygous deletion in the GSTM1 gene. This fact could explain the epidemiological findings which link PDB to exposure to certain environmental agents.

Key words: *Paget's disease of bone, glutathione S-transferase, genetics, polymorphism.*

Introducción

La enfermedad ósea de Paget (EOP) es la enfermedad metabólica ósea más frecuente después de la osteoporosis¹. Es un trastorno focal del hueso que se caracteriza por un aumento del recambio óseo de forma desorganizada, un gran incremento de la resorción ósea seguida de una formación ósea de la misma proporción. El resultado es un hueso con una estructura abigarrada y anárquica que altera su morfología y propiedades mecánicas. Algunos pacientes son asintomáticos, mientras que otros presentan dolor, artropatía degenerativa, fracturas, deformidad ósea, sordera u otros síndromes de compresión nerviosa. La alteración principal reside en los osteoclastos, que aumentan en número, tamaño y actividad^{2,3}.

Actualmente son dos las hipótesis etiopatogénicas que tratan de explicar el origen de la EOP: la influencia de factores ambientales y la existencia de condicionantes genéticos¹.

Hay evidencias de que alteraciones genéticas juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Hay una fuerte tendencia a la agregación familiar (15-40%), con un riesgo relativo de padecer la enfermedad siete veces superior entre

los familiares de pacientes con EOP^{3,6}. En la mayor parte de las familias, la herencia tiene un patrón autosómico dominante con una alta penetrancia en la sexta década³. Recientemente se ha relacionado con un mayor riesgo a desarrollar EOP alteraciones en los genes SQSTM1, CSF1, OPTN, TNFRSF y TM7SF4^{7,8}.

Algunos datos epidemiológicos, como su distribución heterogénea o los cambios más recientes de su incidencia y gravedad apoyan la participación de factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad. Se ha descrito su asociación con dietas pobres en calcio y vitamina D durante la infancia^{9,10}, exposición a toxinas ambientales¹¹, contacto con animales durante la infancia¹²⁻¹⁴, consumo de carne no controlada¹⁵, consumo de agua no tratada¹⁶ y con agentes infecciosos como los virus (*paramixoviridae*)^{14,17,18}.

Ni los factores ambientales ni los genéticos explican por separado su etiopatogenia. El modelo más aceptado considera a la EOP como el resultado de la actuación sinérgica de factores ambientales y genéticos. El condicionamiento genético explicaría la susceptibilidad individual a desarrollar la enfermedad tras la participación del factor ambiental participante².

En la metabolización de toxinas intervienen las glutatión-S-transferasas (GST); las GST constituyen una familia de enzimas que intervienen en la detoxificación celular. Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico, glutatión reducido o GSH (g-Glu-Cys-Gly) sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas, permitiendo su degradación. Se clasifican en siete familias (*alpha*, *kappa*, *mu*, *pi*, *sigma*, *theta* y *zeta*) que se diferencian tanto en su secuencia, como en sus propiedades inmunológicas y papel fisiológico^{19,20}. GSTM1, GSTP1 y GSTT1 son las GST más estudiadas y las que con mayor frecuencia se han relacionado con patologías humanas²¹.

Parece ser importante en el desarrollo de la enfermedad el papel de los factores ambientales, entre ellos algunos tóxicos. Puesto que la respuesta individual a los factores tóxicos está condicionada genéticamente, hemos diseñado este estudio con el objetivo de intentar caracterizar si la variabilidad de los genes GSTM1, GSTP1 y GSTT1 (implicados en la metabolización de toxinas exógenas) se relaciona con el riesgo a desarrollar EOP.

Material y métodos

Pacientes y controles

Hemos estudiado a 148 pacientes diagnosticados de EOP. En el caso de pacientes con antecedentes familiares, sólo hemos seleccionado un paciente por familia para evitar el sesgo genotípico familiar. Los pacientes fueron diagnosticados en el Servicio de Reumatología del Hospital Universitario de Salamanca. Como grupo control, hemos analizado a 207 individuos pareados en sexo y edad con el grupo de pacientes, sin antecedentes de alteraciones óseas, y procedentes de la misma área geográfica. De cada uno de los pacientes se recogieron características clínicas como sexo, edad de diagnóstico, historia familiar, número de huesos afectados, presencia de fracturas, afectación del cráneo y afectación del par craneal. Todos los sujetos estudiados, tanto del grupo de pacientes como del grupo control, firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio, que fue aprobado por el comité ético del hospital.

Extracción de DNA y análisis de polimorfismos

Tanto en el grupo de pacientes como en el de controles, la extracción de DNA genómico de sangre periférica se llevó a cabo mediante el procedimiento estándar de fenol-cloroformo.

El estudio de la presencia-ausencia de delección en los genes GSTM1 y GSTT1 se hizo mediante PCR multiplex utilizando las condiciones que se recogen en la tabla 1. El estudio del polimorfismo *Ile105Val* del gen GSTP1 se llevó a cabo mediante PCR y posterior digestión con la enzima de restricción BsmI. Las condiciones utilizadas se recogen en la tabla 1.

Análisis estadístico

Se analizó la distribución de genotipos entre pacientes y controles mediante el test chi-cuadrado de Pearson. En aquellos polimorfismos en los que se

encontraron diferencias estadísticamente significativas, realizamos una regresión logística multivariante para conocer el riesgo que puede generar la presencia de un determinado genotipo. El análisis estadístico se ha llevado a cabo con el programa SPSS 21.0. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquéllas cuyo valor de p fue <0,05.

Resultados

Hemos estudiado un total de 148 pacientes y 207 controles. Las características clínicas de los pacientes están recogidas en la tabla 2. La distribución de la presencia-ausencia de la delección en los genes GSTM1 y GSTT1 y la distribución de los genotipos para el polimorfismo *Ile105Val* del gen GSTP1; y su relación con el riesgo a desarrollar EOP se muestran en la tabla 3.

Hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de la presencia-ausencia de delección en el gen GSTM1; no ser portador de la delección en homocigosis en el gen GSTM1 confiere un menor riesgo a desarrollar EOP (OR=0,56, IC 95%: 0,36-0,87; p=0,011). En el estudio de los genes GSTT1 y GSTP1 no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de las características clínicas de los pacientes frente a la variabilidad de los genes GSTM1, GSTT1 Y GSTP1.

Discusión

Las lesiones de la EOP se producen como resultado de un aumento de la resorción ósea seguido de un aumento de la formación de hueso. La principal alteración se localiza en los osteoclastos que aumentan en número, tamaño y actividad. Hay varias evidencias que nos indican que la etiopatogenia de la enfermedad es la sinergia entre una serie de factores ambientales y la existencia de determinados condicionantes genéticos². Mediante el estudio de la variabilidad de los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1 (implicados en el metabolismo de toxinas exógenas) pretendimos evaluar la relación de estas variables génicas con el riesgo a desarrollar EOP. En lo conocido por nosotros, este es el primer trabajo que examina la influencia de la alteración de estos genes en el desarrollo de la enfermedad.

El gen GSTM se localiza en el cromosoma 1p13 y hasta el momento se conocen 5 variantes alélicas: GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 y GSTM5. Se produce una disminución de la actividad detoxificadora cuando se hereda delecionado del gen GSTM1; es decir, ser portador en homocigosis de una delección en el gen GSTM1 causa una disminución de la actividad enzimática. La clase *theta* de las GST comprende dos genes que codifican dos proteínas GSTT1 y GSTT2. De igual modo que con el gen GSTM1, si se hereda en homocigosis una delección del gen GSTT1 se produce una disminución de la actividad detoxificadora. En cuanto a la subfamilia de GSTP comprende un único gen GSTP1 en el que se han descrito dos varian-

Tabla 1. Condiciones de amplificación y digestión para los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1

Condiciones de amplificación para los genes GSTM1 y GSTT1	
Cebadores	
<i>C(+)</i> :	
Sentido: 5'-CGCCATCTTGTGCTACATTGCCCG-3'	
<i>GSTM1</i> :	
Sentido: 5'-ATCTTCTCCTCTTCTGTCTC-3'	
Anti sentido: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	
<i>GSTT1</i> :	
Sentido: 5'-TTCCCTTACTGGTCCTACATCTC-3'	
Anti sentido: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	
Programa de PCR	
95°C 5 minutos	
30 ciclos (94°C 30 segundos/58°C 30 segundos/72°C 45 segundos)	
72°C 8 minutos	
Fragmentos resultantes de PCR y correspondencia con el genotipo	
231, 450 y 158 pb: GSTM1(+)/GSTT1(+)	
231 y 158 pb: GSTM1(+)/GSTT1(-)	
450 y 158 pb: GSTM1(-)/GSTT1(+)	
158 pb: GSTM1(-)/GSTT1(-)	
Condiciones de amplificación y digestión para el gen GSTP1	
Cebadores	
Sentido: 5'-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3'	
Anti sentido: 5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3'	
Programa de PCR	
95°C 5 minutos	
30 ciclos (94°C 30 segundos/55°C 30 segundos/72°C 30 segundos)	
72°C 5 minutos	
Amplicón: 176pb	
Enzima: BsmI Digestión: 37°C / 4 horas	
Fragmentos resultantes de la digestión y correspondencia con el genotipo	
176 pb: AA	
176, 91 y 85 pb: AG	
91 y 85 pb: GG	

tes alélicas que difieren en la base 313 del cDNA, una adenina (A) por una guanina (G); esta diferencia produce un cambio de una valina (Val) por una isoleucina (Ile) en el codón 105 de la secuencia aminoacídica provocando una unión defectuosa de la enzima al sustrato, y con ello una disminución de la actividad detoxificadora^{19,20,22,23}.

Ser portador en homocigosis de delección en el gen GSTM1 y/o GSTT1 se ha asociado con una mayor susceptibilidad a desarrollar distintos tipos de cáncer^{21,22,24}, enfermedad hepática por alcoholismo²⁵ y otras enfermedades de carácter inflamatorio^{25,26}, debido a que se produce una peor metabolización de agentes tóxicos, sintetizándose radicales libres que dañan el DNA²⁰. Nuestros resultados muestran que no ser portador en homocigosis de delección en el gen GSTM1 confiere un menor riesgo de desarrollar EOP. En el estudio del gen GSTT1 y GSTP1 no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes y el de controles. No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la clínica, extensión y actividad de la enfermedad frente a la variabilidad de los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1 en el grupo de pacientes con EOP.

Una de las causas que se postulan como origen de la EOP es la exposición a toxinas ambientales procedentes de la industria del algodón, carnes o agua sin los adecuados controles sanitarios; que podrían alterar la maduración y actividad de los osteoclastos y así favorecer el desarrollo de EOP por un aumento de la actividad osteoclástica^{11,15,16}. Nuestra hipótesis es que tener el gen GSTM1 deletado en homocigosis, supone una metabolización deficiente de las toxinas ambientales que, por un mecanismo aún desconocido, podría aumentar la función de los osteoclastos y precursores osteoclásticos, lo cual, junto con otras alteraciones genéticas aún no bien descritas, podrían desembocar en el desarrollo de EOP.

En conclusión, en los individuos portadores del gen GSTM1 deletado en homocigosis se observa con más frecuencia EOP. Este hecho podría explicar los hallazgos epidemiológicos que asocian la EOP a la exposición a determinados agentes ambientales. Aún así, son necesarios estudios funcionales de estos polimorfismos para validar nuestra hipótesis.

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes con EOP

		Pacientes (N)
Sexo	Hombre Mujer	79 69
Edad de diagnóstico	Más de 60 años Menos de 60 años	115 33
Historia familiar	Esporádico Familiar	129 19
Nº de huesos afectados	Menos de tres Más de tres	103 45
Presencia de fracturas	Sí No	9 139
Afectación de cráneo	Sí No	61 87
Afectación de par craneal	Sí No	25 123

Tabla 3. Distribución de los genotipos de los polimorfismos estudiados en los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1 y su asociación con el riesgo a desarrollar EOP

SNP	Genotipo	Pacientes EOP N (%)	Controles N (%)	Valor de p	OR (IC 95%)
GSTM1	-/-	98 (66,2%)	109 (52,7%)	0,011	1,00
	+/+ ; +/-	50 (33,8%)	98 (47,3%)		0,56 (0,36-0,87)
GSTT1	-/-	28 (18,9%)	49 (23,7%)	0,299	----
	+/+ ; +/-	120 (81,1%)	158 (76,3%)		
GSTP1	AA	70 (47,3%)	76 (39,0%)	0,280	----
	AG	65 (43,9)	97 (49,7%)		
	GG	13 (8,8%)	22 (11,3%)		
	AA+AG	135 (91,2%)	173 (88,7%)	0,477	----
	GG	13 (8,8%)	22 (11,3%)		
	AA	70 (47,3%)	76 (39,0%)	0,125	----
	AG+GG	78 (52,7%)	119 (61,0%)		

Bibliografía

- Ralston SH, Layfield R. Pathogenesis of Paget Disease of Bone. *Calcif Tissue Int* 2012;91:97-113.
- Singer FR, Mills BG, Gruber HE, Windle JJ, Roodman GD. Ultrastructure of bone cells in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 2006;21(Suppl 2):P51-4.
- Morales-Piga AA, Rey-Rey JS, Corres-González J, García-Sagredo JM, López-Abente G. Frequency and characteristics of familial aggregation of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 1995;10:663-70.
- Morissette J, Laurin N, Brown JP. Sequestosome 1: mutation frequencies, haplotypes, and phenotypes in familial Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 2006;21(Suppl 2):P38-44.
- Siris ES, Ottman R, Flaster E, Kelsey JL. Familial aggregation of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 1991;6:495-500.
- Hocking LJ, Herbert CA, Nicholls RK, Williams F, Bennett ST, Cundy T, et al. Genomewide search in familial Paget disease of bone shows evidence of genetic heterogeneity with candidate loci on chromosomes 2q36, 10p13, and 5q35. *Am J Hum Genet* 2001;69:1055-61.
- Albarga OM, Visconti MR, Alonso N, Langston AL, Cundy T, Dargie R, et al. Genome wide association

- study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nat Genet* 2010;42:520-4.
8. Albagha OME, Wani SE, Visconti MR, Alonso N, Goodman K, Brandi ML, et al. Genome-wide association identifies three new susceptibility loci for Paget's disease of bone. *Nat Genet* 2011;43:685-9.
 9. Barker DJ, Gardner MJ. Distribution of Paget's disease in England, Wales and Scotland and a possible relationship with vitamin D deficiency in childhood. *Br J Prev Soc Med* 1974;28:226-32.
 10. Siris ES. Epidemiological aspects of Paget's disease: family history and relationship to other medical conditions. *Semin Arthritis Rheum* 1994;23:222-5.
 11. Lever JH. Paget's disease of bone in Lancashire and arsenic pesticide in cotton mill wastewater: a speculative hypothesis. *Bone* 2002;31:434-6.
 12. Merlotti D, Gennari L, Galli B, Martini G, Calabrò A, De Paola V, et al. Characteristics and familial aggregation of Paget's disease of bone in Italy. *J Bone Miner Res* 2005;20:1356-64.
 13. López-Abente G, Morales-Piga A, Elena-Ibáñez A, Rey-Rey JS, Corres-González J. Cattle, pets, and Paget's disease of bone. *Epidemiology* 1997;8:247-51.
 14. O'Driscoll JB, Anderson DC. Past pets and Paget's disease. *Lancet* 1985;2:919-21.
 15. Mills BG, Singer FR. Nuclear inclusions in Paget's disease of bone. *Science* 1976;194:201-2.
 16. Mirón-Canelo JA, Del Pino-Montes J, Vicente-Arroyo M, Sáenz-González MC. Epidemiological study of Paget's disease of bone in a zone of the Province of Salamanca (Spain). The Paget's disease of the bone study group of Salamanca. *Eur J Epidemiol* 1997;13:801-5.
 17. Rebel A, Malkani K, Basle M, Bregeon C, Patezour A, Filmon R. Ultrastructural characteristics of osteoclasts in Paget's disease. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1974;41:767-71.
 18. Mills BG, Singer FR, Weiner LP, Suffin SC, Stabile E, Holst P. Evidence for both respiratory syncytial virus and measles virus antigens in the osteoclasts of patients with Paget's disease of bone. *Clin Orthop Relat Res* 1984;303-11.
 19. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 2001;482:21-6.
 20. Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett* 2000;112-113:357-63.
 21. Parl FF. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett* 2005;221:123-9.
 22. Ye Z, Song H. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2005;41:980-9.
 23. Frova C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomol Eng* 2006;23:149-69.
 24. White DL, Li D, Nurgalieva Z, El-Serag HB. Genetic variants of glutathione S-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: a HuGE systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008;167:377-89.
 25. Brind AM, Hurlstone A, Edrington D, Gilmore I, Fisher N, Pirmohamed M, et al. The role of polymorphisms of glutathione S-transferases GSTM1, M3, P1, T1 and A1 in susceptibility to alcoholic liver disease. *Alcohol* 2004;39:478-83.
 26. Miller EA, Pankow JS, Millikan RC, Bray MS, Ballantyne CM, Bell DA, et al. Glutathione-S-transferase genotypes, smoking, and their association with markers of inflammation, hemostasis, and endothelial function: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 2003;171:265-72.