

MARCOS EUZÉBIO MACIEL

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS GENES *GSTM1* E *GSTT1*
EM CAUCASÓIDES DO SUL DO BRASIL.**

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Ciências
Biológicas, desenvolvida sob a
orientação da Prof^a Dr^a Enilze M.
S.F. Ribeiro, como requisito para a
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Curitiba
2004

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Enilze M. S. F. Ribeiro e ao Prof. Dr. Iglénir João Cavalli que brilhantemente me auxiliaram durante a elaboração desta monografia bem como em meu período de graduação.

À Prof^a Dr^a Maria da Graça Bicalho e sua equipe que cedeu, do Banco de Doadores de Medula Óssea, a maior parte da amostra analisada nesta monografia.

Ao Prof Elias Karam Júnior, por ter aceitado fazer parte da Banca Avaliadora desta monografia, por seu empenho como Professor e outrora Coordenador do Curso de Ciências Biológicas.”

Aos meus colegas estagiários do Laboratório de Citogenética Humana, Aline Simonetti Fonseca e Gustavo Bonfim Propst, que me auxiliaram durante a parte prática desta monografia e demais colegas do laboratório.

Aos meus pais, que sempre doaram seu incentivo incondicional sendo uma referência segura de caráter, moral e determinação em minha vida.

A todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram e, principalmente, à Deus, por que nós estudamos o DNA mas não podemos descartar a hipótese de que o segredo ainda pode estar no barro...

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Biomarcadores de Susceptibilidade	01
1.2 Família Glutathiona S-transferase (GST)	02
1.3 Biomarcadores de Susceptibilidade e sua Frequência na População Caucasiana.....	04
2. OBJETIVOS	07
3. MATERIAL E MÉTODOS	08
3.1 Caracterização da Amostra	08
3.2 Extração do DNA Genômico	08
3.3 Quantificação das Amostras de DNA	08
3.4 Amplificação do DNA – Reação em Cadeia da Polimerase	09
3.5 Análise do Polimorfismo dos Genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> por PCR Multiplex	09
3.6 Análise Estatística	12
4. RESULTADOS	13
4.1 Gene <i>GSTM1</i>	13
4.2 Gene <i>GSTT1</i>	13
4.3 Frequência Haplotípica	13
5. DISCUSSÃO	19
5.1 Aspectos Populacionais	19
5.2 Aspectos Evolutivos	21
6. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
8. ANEXO	28

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biomarcadores de Susceptibilidade

A susceptibilidade individual ao câncer provavelmente é determinada também pela capacidade de metabolizar substâncias estranhas ao organismo, chamadas xenobióticos, potencialmente carcinogênicas. Produtos de determinados genes podem interagir com carcinógenos ambientais, isto é, da dieta, do tabaco e da atmosfera devido a fontes ambientais, ocupacionais ou não, predispondo determinados indivíduos a um maior risco para um tipo particular de câncer (RAUNIO et al., 1995). Diferentes estudos sugerem que inúmeros sistemas genéticos de controle e modulação do metabolismo enzimático de xenobióticos estão envolvidos na gênese de diferentes tipos de tumores (WÜNSCH e GATTÁS, 2001). A variação interindividual para metabolizar xenobióticos, também chamada de polimorfismo metabólico, pode ser de substancial importância na determinação deste risco e, portanto, a análise da distribuição étnica destes polimorfismos é importante para identificar grupos de maior risco.

Para evitar o acúmulo de xenobióticos nocivos nas células, os organismos vivos desenvolveram diferentes vias de eliminação de compostos químicos estranhos. Embora um grande número de enzimas seja necessário para reconhecer e metabolizar todos os possíveis compostos, a biotransformação de xenobióticos foi dividida em dois estágios: Primeiramente, as drogas são metabolizadas por enzimas da fase I, muitas vezes numa reação de oxidação para a criação de centros reativos. Muitas enzimas da fase I pertencem à família citocromo P450 (CYP), uma das principais é a Aril Hidrocarbono Hidroxilase (AHH) codificada pelo gene *CYP1A1*. Esta enzima catalisa o primeiro passo no metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como aqueles encontrados na fumaça do cigarro (HATAGIMA, 2002). Na fase II, enzimas introduzem compostos hidrofílicos, semelhantes à glutathione ou um grupo acetil, dentro da molécula para permitir que ela seja eliminada. As glutathione S-transferases (GSTs) correspondem às enzimas pertencentes à fase II (GATTÁS e SOARES VIERA, 2000) e serão abordadas com maior ênfase por constituírem objeto deste estudo.

1.2 Família Glutationa S-Transferase (GST)

As glutationas S-transferases (GST) constituem um importante sistema enzimático do mecanismo celular de detoxificação que protege as células contra metabólitos oxigênio-reativos devido à conjugação da glutationa com componentes eletrófilicos. As enzimas GST estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos que incluem carcinógenos ambientais, espécies de oxigênio reativos e agentes quimioterapêuticos (GATTÁS et al., 2004). As GST formam uma família multigênica com quatro diferentes classes de isoenzimas da fase II incluindo os locos *GSTM1(mu)* e *GSTT1(theta)*. Sua função primária é detoxificar eletrólitos capazes de se ligar ao DNA; sendo que também tem um papel importante na proteção de tecidos do estresse oxidativo (GATTÁS e SOARES VIEIRA, 2000). Segundo HATAGIMA (2002), todos os genes da classe *mu* foram mapeados no braço curto do cromossomo 1, e especificamente o gene *GSTM1* está localizado em 1p13.

Diferenças interindividuais para o gene *GSTM1* são devidas à deleção do gene (genótipo nulo) ou à variação alélica que resulta na produção de uma proteína com atividade catalítica muito similar (*GSTM1A* e *GSTM1B*) (AUTRUP, 2000). Aproximadamente 50% da população caucasóide apresenta o genótipo *GSTM1-nulo* (RAUNIO et al., 1995; ARRUDA et al., 1998; GEISLER e OLSHAN., 2001; LOSI-GUEMBAROVSKI et al., 2002; ROSSINI et al., 2002; GATTÁS et al., 2004).

O gene *GSTT1* tem 8,1 kb, foi mapeado no cromossomo 22q11.2 e apresenta dois diferentes alelos funcionais. Indivíduos com pelo menos um alelo funcional para *GSTM1* e *GSTT1* estão agrupados nos tipos de conjugação positiva e são chamados *GSTM1*-positivos e *GSTT1*-positivos respectivamente. Por outro lado, os indivíduos que possuem deleção dos genes e, conseqüentemente, a ausência ou a forma inativa das enzimas, são denominados de portadores do genótipo "*GSTM1-nulo*" e "*GSTT1-nulo*". A variabilidade na distribuição de genótipos nulos para *GSTM1* e *GSTT1*, devido à deleção gênica total ou parcial, tem sido descrita em diferentes populações, especialmente em grupos étnicos bem definidos (GATTÁS et al., 2004).

As enzimas pertencentes à família GST estão envolvidas no metabolismo de vários xenobióticos. NORPPA (2003) enumera algumas substâncias como 1,2:3,4-diepoxibutano, um composto resultante do metabolismo do 1,3-butadieno, que depende da ação da enzima GSTT1 para seu processamento, e o 1,2-epoxi-3-buteno, outro composto resultante do 1,3-butadieno, que tem seu metabolismo relacionado com o genótipo *GSTM1*. Estes compostos são derivados do estireno e o metabolismo para sua eliminação está claramente relacionado com as enzimas da família GST em indivíduos que desenvolvem atividades em contato com este composto. Ainda neste trabalho, NORPPA (2003), cita a importância das enzimas da família GST para a metabolização dos compostos do cigarro. Alguns estudos demonstram que fumantes com genótipo nulo para *GSTM1* têm risco aumentado de desenvolver câncer de pulmão e de bexiga, mas esta relação ainda não está bem esclarecida, uma vez que outros autores também têm descrito um risco maior em indivíduos com o genótipo nulo em não fumantes (GEISLER e OLSHAN, 2001).

Como citado anteriormente, as GST são responsáveis pela segunda etapa do metabolismo de xenobióticos, a detoxificação. Uma falta da atividade dessas enzimas, como é observado em indivíduos com o genótipo nulo, pode causar o acúmulo de componentes metabólicos provenientes da primeira etapa. Estes componentes podem formar adutos e provocar mutações em genes críticos como oncogenes e/ou supressores tumorais aumentando a probabilidade do desenvolvimento de uma neoplasia. Segundo AUTRUP (2000), indivíduos classificados como *GSTM1*-nulo devem teoricamente ter um alto nível de adutos comparados com indivíduos que expressam o gene.

A incidência de vários tipos de câncer tem sido associada com a homozigose de alelos nulos para *GSTM1*. Uma forte associação tem sido descrita para os cânceres de cólon e bexiga, assim como um aumento na susceptibilidade ao câncer de pulmão, estômago e pele. Para indivíduos com homozigose de alelos nulos para *GSTT1*, uma alta incidência foi encontrada entre pacientes com síndromes mielodisplásicas e uma influência ainda pouco clara tem sido descrita em câncer de cólon de desenvolvimento precoce (ARRUDA et al., 1998).

Fumantes apresentando o genótipo *GSTT1*-nulo têm mais aberrações cromossômicas determinadas por Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) do

que fumantes que expressam o gene. Estudos epidemiológicos não mostram associação clara entre o genótipo *GSTT1*-nulo e o desenvolvimento de câncer. Ao contrário, um aumento no risco de câncer de bexiga foi observado em não fumantes com expressão aumentada do *GSTT1* (AUTRUP, 2000).

1.3 Biomarcadores de Susceptibilidade e sua Frequência na População Caucasiana

RAUNIO et al. (1995) salientam que uma das principais dificuldades para o estudo da associação dos polimorfismos metabólicos e a susceptibilidade ao câncer são as diferenças na distribuição de alelos funcionais normais e mutantes em diferentes etnias, tornando impossíveis as extrapolações de um grupo étnico para outro. Vários trabalhos têm mostrado uma diferença significativa na frequência do polimorfismo do gene *GSTM1* nas diversas populações (RAUNIO et al., 1995; ARRUDA et al., 1998; AUTRUP, 2000; GATTÁS e SOARES-VIEIRA, 2000; OLSHAN et al., 2000; GEISLER e OLSHAN., 2001; LOSI-GUEMBAROVSKI et al., 2002; ROSSINI et al., 2002; GATTÁS et al., 2004). A frequência do gene *GSTT1* nas populações não tem demonstrado uma diferença estatística significativa (ARRUDA et al., 1998; ROSSINI et al., 2002; GATTÁS et al., 2004) e em diferentes amostras da população caucasóide têm sido descritas frequências mais baixas para o genótipo nulo deste gene quando comparadas com aquelas do *GSTM1* (ARRUDA et al., 1998; VAN IERSEL et al., 1999; GEISLER e OLSHAN., 2001; GATTÁS et al., 2004).

GEISLER e OLSHAN (2001), citam uma frequência de 48 a 57% do genótipo nulo de *GSTM1* entre os Caucasóides norte-americanos e GATTÁS et al. (2004) citam uma frequência de 47 a 58% para *GSTM1* nulo e 13 a 25 % para *GSTT1* nulo na população Caucasóide européia.

Estudos em populações brasileiras de origem caucasóide têm se concentrado na região Sul e Sudeste do país, principalmente nos Estados de São Paulo, Paraná e Rio de Janeiro. As frequências do genótipo nulo de *GSTM1* descritas foram de 55% (ARRUDA et al., 1998); 60,2% (GATTÁS e SOARES-VIEIRA, 2000); 47,8% (LOSI-GUEMBAROVSKI et al., 2002); 48,9% (ROSSINI et al., 2002) e 55,4% (GATTÁS et al., 2004).

A freqüência do genótipo nulo para o gene *GSTT1* que tem sido descrita é mais baixa, com pouca variação entre os grupos étnicos, indicando que para este polimorfismo o grupo étnico pode não ser um fator de grande influência na variabilidade metabólica individual, exceto na população asiática onde se observou uma freqüência de 46 a 58% em chineses e de 42 a 46% em coreanos (GEISLER e OLSHAN., 2001). VAN IERSEL et al. (1999), descrevem uma freqüência de *GSTT1*-nulo de 15% na população australiana, enquanto GEISLER e OLSHAN (2001) citam freqüências de 15 a 31% da população européia e de 19% na população caucasóide e negra brasileira. GATTÁS et al. (2004), estudando a população brasileira, descreveram 594 indivíduos de diferentes etnias incluindo brancos, mulatos e negros de duas regiões diferentes. A freqüência do *GSTT1*-nulo nos negros foi de 26,3%, nos brancos de 22,3% e nos mulatos de 17,2%, não havendo diferença estatisticamente significativa. Neste mesmo trabalho, os autores citam estudos nos quais a freqüência para o *GSTT1*-nulo entre caucasóides europeus está entre 13 e 25% e para caucasóides norte-americanos próxima de 27,6%. Outros estudos na população caucasóide brasileira mostram freqüências de 18,5% (ARRUDA et al., 1998) e 25,1% (ROSSINI et al., 2002).

A susceptibilidade ao risco de câncer devido à exposição química é provavelmente determinada por um fenótipo individual para um conjunto de enzimas, tanto de ativação como detoxificação, relevante para compostos individuais ou associados. Considerando o número de enzimas metabolizadoras de carcinógenos atualmente identificadas, a variabilidade na expressão e a complexidade de químicos a que os indivíduos podem estar expostos, a avaliação de uma simples enzima ou genótipo pode não ser suficiente (RAUNIO et al.,1995), sendo necessário que se avalie as combinações de genótipos de susceptibilidade ao câncer. Em japoneses, homozigotos tanto para o gene *CYP1A1 Val* como para alelos nulos de *GSTM1*, o risco para carcinomas de células escamosas e outros tipos de câncer de pulmão está aumentado. O gene *CYP1A1* codifica uma enzima da fase I do metabolismo de xenobióticos e possui polimorfismos que conferem susceptibilidade ao câncer, como uma transversão na posição 4889 no exon 7, que leva a uma substituição isoleucina/valina e é conhecida como polimorfismo Ile-Val ou do exon 7 (QUATTROCHI et al., 1985).

NAKACHI et al. (1993) analisaram indivíduos com o genótipo suscetível *CYP1A1* combinado com *GTSM1-nulo* e demonstraram um alto risco de desenvolvimento de carcinomas nestes indivíduos. Estes dados são consistentes com a hipótese de que alguns procarcinógenos do cigarro são ativados pela enzima *CYP1A1* e inativados pela *GSTM1*, provavelmente no tecido pulmonar.

Cada vez mais estes genes vêm sendo associados a doenças ambientalmente induzíveis como o câncer. Conhecer suas diferentes frequências entre as populações irá determinar que as informações obtidas possam ser utilizadas como uma ferramenta de detecção de susceptibilidade a estas doenças, por exemplo, em campanhas de prevenção baseadas no perfil genotípico da população.

2. OBJETIVOS

- Avaliar as frequências dos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, pertencentes à família GST, em uma amostra da população caucasóide do Sul do Brasil.
- Comparar os resultados obtidos com os de outras populações caucasóides brasileiras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização da Amostra

Este estudo foi realizado em amostra da população caucasóide do Sul do Brasil em 122 indivíduos saudáveis, 50 do sexo masculino e 72 do sexo feminino, com idade média de $42,17 \pm 7,66$ anos. Cerca de 10 ml de sangue periférico foram coletados na unidade do HEMEPAR de Curitiba pela equipe do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) e entre professores e alunos da UFPR no Laboratório de Citogenética Humana, no período de Janeiro a Maio de 2003, após leitura e assinatura do consentimento informado.

A parcela de indivíduos pertencente a este estudo que teve seu sangue coletado no HEMEPAR, é composta por doadores voluntários de medula óssea que estão cadastrados através de questionário anexo no Registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula Óssea – REDOME.

3.2 Extração do DNA genômico

Cerca de 10 ml de sangue periférico foram centrifugados com tampão de lise para células vermelhas RCLB 1X (obtido da solução estoque 10X concentrada: 12,1 g de Tris, 110,2g de $MgCl_2$, 5,8 g de NaCl) a 13000 rpm por 2 minutos. Este processo foi repetido até a obtenção de um botão de glóbulos brancos que foi incubado a $60^\circ C$ por 40 minutos juntamente com 80 μl de tampão proteinase K 5X, 40 μl de uma solução de proteinase K (10 mg/ml), 20 μl de SDS 20% e 240 μl de água ultra-pura. O DNA genômico foi extraído pelo método *salting out* segundo BIGNON e FERNANDEZ-VIÑA (1997), com modificações. Ao final do processo a amostra de DNA foi ressuspendida em 50 μl de água ultra-pura e armazenada a $-20^\circ C$.

3.3 Quantificação das amostras de DNA

Para a quantificação das amostras de DNA foi utilizado o espectrofotômetro Gene Quant *pro* (RNA/DNA calculator). A leitura para a quantificação e pureza

procedeu-se em comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros (nm). Para uma amostra de DNA ser considerada pura, a razão da densidade óptica OD_{260}/OD_{280} deve estar entre 1,6 e 1,8. Após a leitura, obtém-se a razão entre as absorvâncias e subseqüentemente a concentração de DNA em $\mu\text{g/ml}$.

3.4 Amplificação do DNA - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática "in vitro" de várias cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Esta reação se baseia no pareamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (moléculas de DNA fita simples), usados como iniciadores que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes iniciadores são sintetizados artificialmente, de maneira que suas seqüências de nucleotídeos são complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo. Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, pareamento e extensão. A desnaturação consiste na separação das fitas duplas de DNA, através de uma elevação da temperatura para 92° a 95° C. Na etapa de pareamento, a temperatura é rapidamente reduzida para cerca de 55° C, dependendo do tamanho e da seqüência do iniciador utilizado, o que irá permitir a hibridação DNA-DNA de cada iniciador com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida a temperatura é elevada para 72° C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão, envolvendo a adição de nucleotídeos e utilizando como molde a seqüência - alvo, de maneira que se realize uma cópia desta (FERREIRA e GUATTAPAGLIA, 1998).

Neste trabalho, a técnica de PCR foi utilizada para a detecção do polimorfismo dos genes *GSTM1* e *GSTT1*.

3.5 Análise do polimorfismo dos genes *GSTM1* e *GSTT1* por PCR Multiplex

A reação de co-amplificação em cadeia foi realizada baseada no protocolo para PCR Multiplex de ABDEL-RAHMAN et al. (1996) com modificações, nas seguintes condições:

- 2,5 μl de tampão da enzima (20mM de tris-HCl pR 8,4; 50 mM de KCl);

- 1,0 µl (2 mM) de MgCl₂;
- 0,8 µl de cada iniciador: *GSTM1*₁, *GSTM1*₂, *GSTT1*₁, *GSTT1*₂, *CYP1A1*₁, *CYP1A1*₂;
- 1,25 U de Taq DNA Polimerase;
- 0,5 µl (2 mM) de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP);
- 4,0 µl de DNA genômico total;
- 11,9 µl de água ultra-pura estéril;

Os iniciadores para o gene *CYP1A1* amplificam um fragmento constante de 312 pb, o qual foi usado como controle interno da reação, excluindo a possibilidade de uma falsa interpretação dos resultados devido à ausência da reação de amplificação. O fragmento de 215 pb foi visualizado somente nos casos de indivíduos que possuem o genótipo *GSTM1* positivo. O fragmento de 480 pb foi visualizado apenas nos casos de indivíduos que possuem o genótipo *GSTT1* positivo. A ausência da amplificação *GSTM1* (215 pb) ou *GSTT1* (480 pb), na presença de controle interno, indicou os respectivos genótipos nulos para cada gene.

A seqüência de cada iniciador e as condições de amplificação estão descritas na Tabela I.

Os fragmentos foram amplificados no termociclador Eppendorf Gradient e submetidos à eletroforese em cuba contendo tampão TBE 1X concentrado que foi diluído da solução estoque 10X concentrada (121,1 g de Tris, 61,83 g de Ácido Bórico, 40 ml de EDTA 0,5 M e água ultra-pura para completar o volume final de 1000 ml).

As reações foram visualizadas em gel de agarose 1,8% feito também com tampão TBE 1X concentrado, diluído (1:10, v:v) da solução estoque 10X concentrada e corado com brometo de etídeo (10mg/ml). Foram adicionados 5 µl de corante para visualização da corrida (15ml de ficol, 20 ml de H₂O e 0,0125 g de azul de bromofenol).

Para identificação do peso molecular de cada amostra foi utilizado um marcador de 50 pb diluído (10 µl de marcador de DNA, 10 µl de ficol e 80 µl de água ultra-pura). Os géis foram observados em transiluminador de luz ultra-violeta e documentados em sistema de captação de imagens pelo software "Digi Doc It".

A Figura 1 ilustra os resultados obtidos através desta metodologia.

Tabela I – Iniciadores e condições de amplificação para os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*

Gene e Tamanho do Fragmento	Iniciadores	Condições de Reação
<i>GSTM1</i>:		
	M1: 5'GAACTGCCACTTCAGCTGTCT3' e	
	M2: 5'CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC3'	95°C – 5 min; 35
	<i>GSTT1</i>:	
<i>GSTM1</i> (215 pb)	T1: 5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC3'e	min, 59° C min,
<i>GSTT1</i> (480 pb)	T2: 5'TCACCGGATCATGGCCAGCA3'	72°C – 1min);
	<i>CYP1A1</i>	
	(controle interno):	
	C1: 5'GAACTGCCACTTCAGCTGTCT3' e	72°C – 4 min;
	C2: 5'CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC3'	

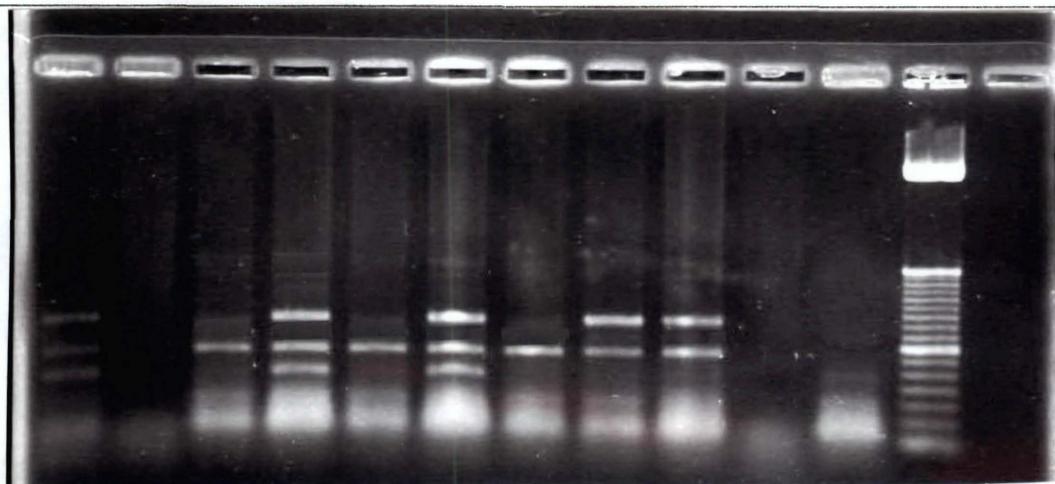


Figura I - Resultado em gel de agarose de oito indivíduos (da esquerda para a direita): a primeira, quarta e sexta colunas indicam indivíduos positivos para ambos os genes *GSTM1* (215 pb) e *GSTT1* (480 pb); a terceira, quinta e sétima, negativos para ambos os genes, apresentando apenas a banda intermediária (312 pb) referente ao controle interno, o gene *CYP1A1*; e a oitava e nona colunas indicam indivíduos positivos para *GSTT1* e negativo para o *GSTM1*. A última coluna indica o marcador de peso molecular.

3.6 Análise Estatística

Aos dados da Tabela III foram aplicados os testes de Qui-quadrado (χ^2) com o objetivo de verificar se os genótipos nulo e positivo para os genes *GSTM1* e *GSTT1* se distribuíam igualmente em diferentes amostras de populações caucasóides brasileiras, conforme as fórmulas apresentadas por BEIGUELMAN (1988).

A frequência de haplótipos nulos foi obtida por contagem direta da concomitância dos genótipos nulos para ambos os genes nos indivíduos da amostra.

A estimativa da frequência de heterozigotos para genes autossômicos dominantes, seguiu as fórmulas apresentadas por BEIGUELMAN (1994).

4. RESULTADOS

4.1 Gene *GSTM1*

Dos 122 indivíduos analisados, 65 (53,3%) foram positivos e 57 (46,7%) foram negativos, ou seja, portadores do genótipo nulo. Os resultados das análises estão descritos na Tabela II.

As frequências foram comparadas com as observadas na literatura para amostras de populações caucasóides brasileiras (Tabelas III), não mostrando diferenças estatisticamente significantes ($\chi^2_4 = 4,78$; $P > 0,30$).

A estimativa da frequência de indivíduos heterozigotos e de homozigotos dominantes indicou os seguintes resultados: 43,2% (53 indivíduos) heterozigotos e 10% (12 indivíduos) homozigotos dominantes.

4.2 Gene *GSTT1*

Dos 122 indivíduos analisados, 100 (82%) foram positivos e 22 (18%) foram negativos, ou seja, portadores do genótipo nulo. Os resultados das análises estão descritos na Tabela II.

As frequências foram comparadas com as observadas na literatura para amostras de populações caucasóides brasileiras (Tabela IV), não mostrando diferenças estatisticamente significantes ($\chi^2_3 = 3,81$; $P > 0,20$).

A estimativa da frequência de indivíduos heterozigotos e de homozigotos dominantes indicou os seguintes resultados: 49% (60 indivíduos) heterozigotos e 33% (40 indivíduos) homozigotos dominantes.

4.3. Frequência haplotípica

A frequência do haplótipo nulo (genótipo nulo concomitante para ambos os genes) foi obtida por contagem direta, resultando em oito indivíduos (6,5%) portadores deste haplótipo.

Tabela II – Sexo e idade dos indivíduos que compõe a amostra e tipagem dos genes *GSTM1* e *GSTT1*

Amostra	Sexo	Idade	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>
CA0001	Feminino	25	Positivo	Negativo
CA0002	Feminino	61	Positivo	Negativo
CA0003	Feminino	62	Negativo	Positivo
CA0004	Feminino	43	Negativo	Positivo
CA0005	Feminino	45	Negativo	Negativo
CA0006	Masculino	22	Negativo	Positivo
CA0007	Masculino	23	Positivo	Positivo
CA0008	Feminino	31	Negativo	Positivo
CA0009	Feminino	59	Positivo	Positivo
CA0010	Feminino	24	Positivo	Negativo
CA0011	Feminino	42	Positivo	Positivo
CA0012	Feminino	46	Negativo	Positivo
CA0013	Masculino	24	Negativo	Positivo
CA0014	Masculino	28	Positivo	Positivo
CA0015	Masculino	58	Negativo	Positivo
CA0016	Feminino	52	Positivo	Positivo
CA0017	Feminino	22	Positivo	Positivo
CA0018	Feminino	21	Negativo	Negativo
CA0019	Feminino	23	Negativo	Positivo
CA0020	Masculino	20	Positivo	Positivo
CA0021	Feminino	49	Negativo	Positivo
CA0022	Feminino	26	Negativo	Positivo
CA6208	Feminino	50	Negativo	Positivo
CA6226	Masculino	52	Positivo	Positivo
CA6227	Feminino	45	Positivo	Positivo
CA6231	Masculino	51	Negativo	Positivo
CA6249	Masculino	45	Negativo	Negativo
CA6256	Masculino	45	Positivo	Positivo
CA6260	Feminino	40	Positivo	Positivo
CA6262	Masculino	43	Positivo	Positivo
CA6270	Masculino	43	Negativo	Positivo
CA6282	Masculino	43	Negativo	Positivo
CA6283	Feminino	46	Positivo	Negativo
CA6288	Masculino	44	Negativo	Negativo
CA6291	Masculino	48	Positivo	Positivo

CA6293	Feminino	44	Negativo	Positivo
CA6296	Masculino	45	Positivo	Negativo
CA6298	Masculino	40	Positivo	Positivo
CA6305	Feminino	41	Negativo	Positivo
CA6314	Feminino	48	Positivo	Positivo
CA6331	Feminino	43	Positivo	Negativo
CA6332	Feminino	41	Negativo	Positivo
CA6339	Feminino	41	Negativo	Positivo
CA6354	Masculino	43	Negativo	Positivo
CA6361	Masculino	48	Positivo	Positivo
CA6382	Masculino	41	Negativo	Positivo
CA6385	Masculino	43	Positivo	Positivo
CA6398	Feminino	41	Positivo	Positivo
CA6401	Masculino	42	Positivo	Positivo
CA6404	Feminino	41	Negativo	Positivo
CA6405	Feminino	42	Positivo	Negativo
CA6408	Feminino	40	Positivo	Positivo
CA6409	Masculino	40	Positivo	Positivo
CA6418	Feminino	40	Negativo	Positivo
CA6424	Feminino	52	Negativo	Positivo
CA6427	Feminino	42	Negativo	Positivo
CA6429	Feminino	43	Positivo	Positivo
CA6436	Feminino	50	Negativo	Positivo
CA6448	Feminino	40	Negativo	Positivo
CA6451	Feminino	46	Negativo	Positivo
CA6456	Feminino	45	Negativo	Positivo
CA6458	Feminino	41	Negativo	Positivo
CA6466	Feminino	41	Positivo	Positivo
CA6467	Masculino	48	Positivo	Positivo
CA6468	Feminino	40	Negativo	Negativo
CA6481	Feminino	41	Positivo	Positivo
CA6485	Feminino	49	Positivo	Positivo
CA6494	Masculino	51	Positivo	Negativo
CA6495	Masculino	43	Negativo	Positivo
CA6519	Feminino	45	Negativo	Positivo
CA6520	Masculino	46	Positivo	Positivo
CA6527	Masculino	42	Positivo	Positivo
CA6534	Masculino	44	Negativo	Positivo
CA6543	Feminino	52	Positivo	Negativo

CA6553	Feminino	40	Positivo	Positivo
CA6568	Masculino	47	Negativo	Positivo
CA6571	Feminino	54	Positivo	Positivo
CA6577	Feminino	42	Positivo	Positivo
CA6592	Feminino	41	Negativo	Positivo
CA6595	Feminino	44	Negativo	Positivo
CA6605	Masculino	43	Negativo	Negativo
CA6606	Feminino	55	Negativo	Positivo
CA6610	Feminino	41	Positivo	Positivo
CA6614	Masculino	40	Negativo	Positivo
CA6618	Feminino	42	Positivo	Negativo
CA6619	Feminino	44	Positivo	Negativo
CA6620	Masculino	42	Negativo	Positivo
CA6621	Masculino	48	Negativo	Negativo
CA6622	Feminino	44	Positivo	Positivo
CA6625	Feminino	40	Positivo	Positivo
CA6626	Masculino	41	Positivo	Positivo
CA6634	Feminino	43	Negativo	Positivo
CA6637	Feminino	41	Positivo	Positivo
CA6643	Feminino	40	Positivo	Negativo
CA6644	Feminino	48	Positivo	Positivo
CA6646	Feminino	43	Negativo	Negativo
CA6647	Masculino	40	Positivo	Positivo
CA6648	Feminino	43	Positivo	Positivo
CA6649	Feminino	42	Positivo	Positivo
CA6650	Feminino	44	Positivo	Positivo
CA6657	Masculino	40	Negativo	Positivo
CA6660	Feminino	53	Positivo	Positivo
CA6664	Masculino	40	Positivo	Positivo
CA6666	Feminino	44	Positivo	Negativo
CA6731	Masculino	41	Negativo	Positivo
CA6732	Masculino	40	Negativo	Positivo
CA6748	Masculino	51	Positivo	Positivo
CA6757	Feminino	42	Positivo	Positivo
CA6762	Masculino	51	Negativo	Positivo
CA6785	Masculino	53	Negativo	Positivo
CA6790	Masculino	40	Negativo	Positivo
CA6791	Feminino	41	Positivo	Positivo
CA6795	Masculino	42	Negativo	Positivo

CA6808	Feminino	46	Negativo	Positivo
CA6811	Masculino	40	Positivo	Positivo
CA6815	Masculino	43	Positivo	Positivo
CA6820	Masculino	41	Positivo	Positivo
CA6830	Masculino	40	Negativo	Positivo
CA6832	Masculino	43	Positivo	Positivo
CA6833	Feminino	43	Negativo	Positivo
CA6841	Feminino	47	Positivo	Negativo
CA6863	Feminino	21	Positivo	Positivo

Tabela III – Frequência dos genótipos negativos e positivos para o gene *GSTM1* descritos em diferentes amostras da população caucasóide brasileira (A, B, C e D) e na nossa amostra (M).

Genótipos	Populações									
	A		B		C		D		M	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Negativos	72	55,4	68	47,9	156	48,9	129	55,4	57	46,7
Positivos	58	44,6	74	52,1	163	51,1	104	44,6	65	53,3

A (ARRUDA et al. 1998); B (LOSI-GUEMBAROVSKI et al. 2002); C (ROSSINI et al. 2002); D (GATTÁS et al. 2004) e M (presente estudo).

Tabela IV – Frequência dos genótipos negativos e positivos para o gene *GSTT1* descritos em diferentes amostras da população caucasiana brasileira (A, B, e C) e na nossa amostra (M).

Genótipos	Populações							
	A		B		C		M	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Negativos	24	18,5	80	25,1	52	22,3	22	18
Positivos	106	81,5	239	74,9	181	77,7	100	82

A (ARRUDA et al. 1998); B (ROSSINI et al. 2002); C (GATTÁS et al. 2004) e M (presente estudo).

5. DISCUSSÃO

5.1 Aspectos Populacionais

A variabilidade interindividual no metabolismo de xenobióticos tem sido associada com a maior ou menor susceptibilidade ao risco de desenvolvimento de neoplasias ou outras doenças. O conhecimento desta variabilidade na susceptibilidade e a identificação de fatores de risco são de grande importância para o desenvolvimento de medidas de prevenção. Para uma avaliação mais consistente da participação de fatores genéticos em populações especiais é de fundamental importância o conhecimento da distribuição dos mesmos nas populações das quais as amostras são obtidas.

Analisamos a frequência dos genótipos nulos de dois genes da família das Glutathione S-transferases (GST) – *GSTM1* e *GSTT1*, ambos envolvidos na detoxificação de agentes carcinogênicos, em uma população de origem caucasóide. Para o gene *GSTM1*, dos 122 indivíduos analisados, 65 (53,3%) foram positivos e 57 (46,7%) eram portadores do genótipo nulo (Tabela II).

Nos Estados Unidos, estudos tipo caso-controle mostram frequências entre 23 e 41% nos afro-descendentes; de 55 a 69% nos descendentes de asiáticos; 35 a 62% nos descendentes de europeus (REBBECK et al., 1999; COTTON et al., 2000). Já no continente europeu, STUCKER et al. (1999) descreveram uma frequência de 46% de portadores do genótipo nulo entre os franceses; PALLI et al. (2000) de 53% em italianos; KISS et al. (2000) de 44% em húngaros e SALAGOVIC et al. (1999) de 50% na República Tcheca.

Análises em amostras populacionais realizadas no Brasil mostram frequências similares do genótipo nulo: 55% (ARRUDA et al., 1998); 47,8% (LOSI-GUEMBAROVSKI et al., 2002); 48,9% (ROSSINI et al., 2002) e 55,4% (GATTÁS et al., 2004). A maior frequência foi descrita por GATTÁS e SOARES-VIEIRA (2000) – 60,2% em amostra coletada no Estado de São Paulo.

Para o gene *GSTT1*, dos 122 indivíduos analisados, 100 (82%) foram positivos e 22 (18%) eram portadores de genótipo nulo (Tabela II).

As frequências descritas para o genótipo nulo de *GSTT1* são baixas na maioria das populações estudadas em comparação com as frequências do gene

GSTM1-nulo. Estudos nos Estados Unidos mostram freqüências de 15 a 31% nos descendentes de europeus; de 22 a 29% nos afro-americanos e de 10 a 12% nos descendentes hispânicos (PEMBLE et al., 1994; NELSON et al., 1995; ABDEL-RAHMAN et al., 1996; CHEN et al., 1996; GERTIG et al., 1998; REBBECK et al., 1999; COTTON et al., 2000; CRUMP et al., 2000). Na Europa, as freqüências estimadas foram 21% nos italianos e 28% nos eslovacos (SALAGOVIC et al., 1999; PALLI et al., 2000). As populações asiáticas apresentam as freqüências mais elevadas de *GSTT1-nulo*. LEE et al. (1995) encontraram as freqüências de 58% nos chineses e de 38% nos malasianos, enquanto SETIWAN et al. (2000) encontraram a freqüência de 46% num estudo com a população chinesa. Outros dois estudos do tipo caso-controle encontraram as freqüências de 42% (KIM et al., 2000) e 46% em coreanos (PARK et al., 2000). As mais altas freqüências em asiáticos foram descritas por NELSON et al. (1995), que encontrou o genótipo nulo em 64,4% dos chineses e 60,2% dos coreanos.

Nos estudos com a população brasileira as freqüências são similares às encontradas nas populações norte-americanas e europeias. ARRUDA et al. (1998) descreveram freqüências de 19% entre indivíduos de origem caucasóide e negra e 11% numa população indígena da Amazônia. Outras freqüências encontradas na população brasileira são de 25,4% (ROSSINI et al., 2002) e 22,3% (GATTÁS et al., 2004).

A comparação dos nossos resultados com os de amostras de outras populações caucasóides brasileiras, através do teste do χ^2 , não demonstrou diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos nulos e positivos para os genes *GSTM1* e *GSTT1*. Considerando que estas amostras foram obtidas nas regiões sudeste e sul do Brasil, estes dados informam que nestas regiões há um comportamento homogêneo da distribuição das freqüências genotípicas dos genes sob estudo.

Considerando que existe uma relação de dominância entre os alelos objeto deste estudo, obviamente não podemos determinar de forma direta a freqüência de indivíduos heterozigotos e de homozigotos dominantes que constituem esta amostra populacional. Considerando que esta informação é de importância para a avaliação mais efetiva da dinâmica gênica nas populações, a freqüência de heterozigotos foi estimada considerando como pressuposto básico que o caráter

sob estudo esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população analisada. Desta forma, obtivemos a seguinte distribuição genotípica: para o gene *GSTM1*, $p^2 = 0,10$ (n=12); $2pq = 0,43$ (n=53); e $q^2 = 0,47$ (n=57). Para o gene *GSTT1*: $p^2 = 0,33$ (n=40); $2pq = 0,49$ (n=59); e $q^2 = 0,18$ (n=22).

5.2 Aspectos Evolutivos

Segundo MORTON et al. (1966), o termo polimorfismo genético refere-se à ocorrência de dois ou mais alelos, em uma mesma espécie e população, desde que a frequência do alelo mais comum não seja superior a 99%. O sistema é monomórfico se houver um alelo cuja frequência seja superior a 99%, independente do número de alelos com frequência inferior a 1% (polialelismo).

Estudos populacionais fornecem dados de frequências alélicas que permitem uma melhor compreensão da evolução do polimorfismo genético e das relações biológicas entre as populações humanas. Por exemplo, a ancestralidade comum pode ser sugerida quando se detecta diversos alelos distribuídos em diferentes populações. Estudos em grandes populações urbanas são pouco informativos quando se pretende verificar efeitos de fatores evolutivos que não a miscigenação (LIENERT e PARHAM, 1996), sendo que as populações isoladas são ideais para se verificar o efeito desses fatores, como a deriva genética.

Existem duas hipóteses clássicas que se propõem a explicar a existência e manutenção do polimorfismo em uma população. A primeira é baseada na Teoria da Seleção Natural (FISHER, 1930), admitindo-se que o polimorfismo conferiria vantagens à população em relação a aspectos reprodutivos e de sobrevivência (FORD, 1940). A segunda baseia-se na Teoria Neutralista, em que mutantes seletivamente neutros ou quase neutros seriam mantidos na população sem pressão seletiva (KIMURA, 1968).

Considerando a alta frequência em diversas populações do genótipo nulo dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, podemos sugerir que, isoladamente, a ausência de uma das enzimas não geraria uma condição desfavorável ao indivíduo e, portanto, não estaria sob a ação da seleção natural. O possível envolvimento desses genótipos na predisposição ao câncer esporádico, sugere que o efeito

uma das enzimas não geraria uma condição desfavorável ao indivíduo e, portanto, não estaria sob a ação da seleção natural. O possível envolvimento desses genótipos na predisposição ao câncer esporádico, sugere que o efeito deletério se manifeste mais tardiamente, após o período reprodutivo e, sendo assim, não sofreria pressão seletiva, mantendo a alta frequência nas populações.

Entretanto, a frequência de indivíduos com haplótipos nulos (ausência de vários alelos) é baixa, sugerindo que a concomitância destes genótipos possa sofrer ação seletiva.

Estes aspectos demonstram a importância e a necessidade tanto da análise individual como, e principalmente, em conjunto de vários genes do biometabolismo, tanto em populações normais como em estudos de associação a doenças, para que se possa compreender melhor a dinâmica populacional destes polimorfismos e seu significado biológico.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo foram determinadas as frequências de genótipos nulos para os genes *GSTM1* e *GSTT1* em uma amostra da população caucasóide do Sul do Brasil composta por 122 indivíduos. As frequências encontradas foram: 46,7% de *GSTM1-nulos* e 18% de *GSTT1-nulos*. Os resultados encontrados estão em conformidade com os dados da literatura em estudos realizados em amostras do mesmo grupo étnico em populações brasileiras, como indicou o teste estatístico do χ^2 .

As altas frequências encontradas neste trabalho podem indicar que, isoladamente, estes polimorfismos não estão sob ação seletiva neste grupo étnico, porém na análise da combinação dos genótipos nulos observa-se uma baixa frequência, isto é, indivíduos com mais de um gene deletado podem ter desvantagem seletiva.

Devido ao possível envolvimento desses polimorfismos com doenças nas quais os fatores ambientais são relevantes, como o câncer, é necessário o conhecimento da sua dinâmica populacional, afim de utilizá-los como ferramenta para uma caracterização da susceptibilidade a essas doenças, por exemplo, em campanhas de prevenção baseadas no perfil genotípico da população.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, S.Z.; EL-ZEIN, R.A.; ANWAR, W.A.; AU, W.W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. **Cancer Lett.** No. 107, pp. 229-233, 1996.

ARRUDA, V. R.; GRIGNOLLI, C. E.; GONÇALVES, M. S.; SOARES, M. C.; MENEZES, R.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (*GSTM1*) and theta (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? **Clin. Genet.** No. 54, pp. 210-214. 1998.

AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mut. Res.** No. 464, pp. 65-76. 2000.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística.** Ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP. 1988.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações.** Ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP. 1994.

BIGNON, J. D.; FERNANDEZ-VIÑA, M. A. Protocols of the 12th Internacional Histocompatibility Workshop for Typing of HLA class II alleles by DNA amplification by the polimerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP). In CHARRON, D. **HLA – Genetic diversity of HLA: functional and medical implication.** Paris; EDK, 1997.

CHEN, C.L.; LIU, Q.; RELLING, M.V. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. **Pharmacogenetics.** No. 6, pp. 187-191. 1996.

COTTON, S. C.; SHARP, L.; LITTLE, J.; BROCKTON, N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer. **Am. J. Epidemiol.** No. 27: pp. 150-151. 1999.

CRUMP, C.; CHEN, C.; APPELBAUM, F.; et al. Glutathione S-transferase theta 1 gene deletion and risk of acute myeloid leukemia. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** No. 9: pp. 457-60. 2000.

FERREIRA, M. E.; GUATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa-Cenargem,** Brasília, 1998.

FISHER, R. A.; **The genetical theory of natural selection.** Oxford: The Clarendon Press, 1930.

FORD, E. B. **Polymorphism and systematics.** J. S. Huxley (ed.) Oxford: Clarendon Press, 1940.

STUCKER, I.; DE WAZIERS, I.; CENEE, S.; et al. *GSTM1*, smoking and lung cancer: a case-control study. **Int. j. Epidemiol.** No. 35: pp. 150-829. 1999.

VAN IERSEL, M. L. P. S.; VERHAGEN, H.; VAN BLADEREN, P. J. The role of biotransformation in dietary (anti)carcinogenesis. **Mut. Res.** No. 443, pp. 259-270. 1999.

WÜNSCH, V. F.; GATTÁS, G. J. F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cad. Saúde Pública.** No. 17(3), pp. 467-480. 2001.

8. Anexo



REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA - REDOME

FAVOR PREENCHER PREFERENCIALMENTE EM LETRAS DE FORMA, OU LEGÍVEL

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____
R.G: _____ Idade: _____ Data de Nascimento: ____/____/____
Estado Civil: _____ Sexo: F () M () Peso: _____ Altura: _____ ABO: _____ Rh: _____
Fumante: SIM () NÃO ()

ENDEREÇO RESIDENCIAL

Rua/Av. : _____ N°. _____ Ap. : _____
Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____
CEP: _____ Fone: _____

ENDEREÇO COMERCIAL

Rua/Av. : _____ N°. _____ Ap. : _____
Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____
Profissão: _____ Fone: _____

Nome e telefone de duas pessoas para contato, caso haja dificuldades para encontrá-lo:

Nome: _____ Fone: _____
Nome: _____ Fone: _____

Qual o grupo racial que você se colocaria? (Há tipos de antígenos HLA mais comuns em alguns grupos que outros).

() Caucasiano/Branco () Mulato () Cafuso () Negro () Oriental () Outros _____

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, abaixo assinado(a) e acima qualificado(a), pelo presente instrumento CONSENTO que os meus dados cadastrais, o resultado de minha tipagem HLA e os outros resultados de exames de Histocompatibilidade Imunogenética sejam incluídos no **REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA - REDOME**, coordenado pelo Laboratório de Imunogenética do Instituto Nacional de Câncer - INCA, do Ministério da Saúde. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis testes genéticos futuros, desde que de maneira sigilosa.

Nesta data, recebi as orientações sobre o que é o transplante de medula óssea e o transplante de células precursoras e estou ciente de que:

O candidato a doador de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos deve encontrar-se em bom estado de saúde.

Na oportunidade de ser selecionado, o doador deverá passar por exames clínicos e laboratoriais que atestem a inexistência de doenças, especialmente as infectocontagiosas.

Na oportunidade de ser selecionado para doação de medula óssea, o doador passará por internação hospitalar (hospital/dia) sendo necessário submeter-se a procedimento sob anestesia geral para retirada de não mais que 10% de sua medula óssea. O procedimento consiste em punção óssea pela região glútea (4 a 8 punções). A medula do doador é espontaneamente restaurada em poucas semanas.

Na oportunidade de ser selecionado para doação de precursores hematopoéticos, após utilizar por via subcutânea uma medicação estimulante de células hematopoéticas. O doador será submetido a procedimento semelhante a doação de sangue sendo este realizado em caráter ambulatorial, não sendo para isso necessários os procedimentos mencionados no segundo item deste Termo.

Os riscos para os doadores de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos é praticamente inexistente. Nos casos de doação de medula óssea, devido ao procedimento de punção é comum haver queixa de dor discreta no local da punção.

Tenho também ciência do propósito a que se destina o referido Registro e meu cadastramento nele.

Proponho-me assim a ser um eventual doador de medula óssea ou de células precursoras, sabendo que me é reservado o direito da decisão final para a doação, mantendo-se a condição de sigilo acima especificada.

CURITIBA, _____ de _____ de 2.004

Nome legível : _____ Assinatura : _____

TESTEMUNHAS:

Nome legível : _____ Assinatura : _____

Nome legível : _____ Assinatura : _____



AUTORIZAÇÃO DE REALIZAÇÃO DE EXAMES DE HISTOCOMPATIBILIDADE

Hemocentro : HEMEPAR – CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO PARANÁ

Endereço : TRAVESSA JOÃO PROSDÓCIMO, 145 – ALTO DA XV – CURITIBA – PR. - CEP: 80060-220

Telefone : (0xx41) 362-20-30 - Fax : (0xx41) 264-70-29 - email : hemepar@pr.gov.br

Responsável Técnico :

 Dr. Luiz Maurício Guimarães
 Chefe de Divisão de Hematologia e Hemoterapia

 Dr. Wilmar M. Guimarães
 Diretor Geral do Hemepar

CURITIBA, _____ de _____ de 2.004

O Hemocentro acima identificado autoriza o laboratório de histocompatibilidade abaixo identificado a realizar os exames de histocompatibilidade relativos a 1ª fase de identificação de doador, do voluntário nominado, para fins de cadastro no REDOME, em conformidade com o estabelecido no Artigo 5º da Portaria GM/MS N 1;314 de 30 de Novembro de 2.000 – procedimento código : 30.011.04-3.

Laboratório : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CENTRO POLITÉCNICO

LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA (Aos cuidados do Dra. MARIA DAGRAÇA BICALHO

CGC: 78.350.188/0001-95

Endereço: CENTRO POLITÉCNICO – SETOR DE CIENCIAS BIOLÓGICAS – DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
 JARDIM DAS AMÉRICAS - CEP: 81531-990 - CURITIBA - PR

Fone: (0xx41) 361-1729 - Fax: (0xx41) 266-2042 - Email: ligh@bio.ufpr.br

RESULTADO DOS EXAMES

AMOSTRA Nº

Tip =: _____ Data : ____/____/____

A : _____ B : _____ CW : _____

DR : _____ DR : _____ DQ : _____

Tip DNA = : _____ Data : ____/____/____

DRB1 _____ RB3/B4/B5 _____ DQB1 _____ DPB1 _____

Laboratório : _____

CGC: _____

Endereço: _____

_____ de _____ de _____

Assinatura do responsável técnico pelo Laboratório