

FAUSTO KOGA DE OLIVEIRA

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES
GSTT1 e *GSTM1* EM AMOSTRA DA POPULAÇÃO NEGRÓIDE 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
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES
GSTT1 e ***GSTM1*** EM AMOSTRA DA POPULAÇÃO NEGRÓIDE DO
SUL DO BRASIL

Aluno: Fausto Koga de Oliveira

Registro Acadêmico: GRR20021406

Orientadora: Prof^a Dr^a Enilze Maria de S. F. Ribeiro

AGRADECIMENTOS

À orientadora Prof^ª Dr^ª Enilze M. S. F. Ribeiro e ao Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, pelo acompanhamento e orientação durante todo o desenvolvimento desta monografia e durante os dois últimos anos de minha formação acadêmica.

À Prof^ª Dr^ª Maria da Graça Bicalho e sua equipe, que disponibilizaram as amostras do Banco de Doadores de Medula Óssea, material de estudo desta monografia.

A todos os amigos do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, que contribuíram enormemente para minha formação.

A todas as pessoas que passaram por minha vida durante estes últimos quatro anos, professores e alunos que me ajudaram a crescer como pessoa e como profissional.

A todos os grandes homens e mulheres da ciência, que fizeram com que me apaixonasse pela pesquisa, ficando livre das garras das crendices e superstições, me fazendo perceber o quão fascinante é este mundo aos olhos daqueles que não temem pela própria insignificância.

E principalmente à minha mãe Shizuko Koga que sempre me deu liberdade para escolher meu caminho e me apoiou nos momentos mais difíceis, sendo para mim o melhor exemplo de caráter e perseverança.

Obrigado a todos!

Sumário

1. Resumo	02
2. Objetivos	03
3. Introdução.....	04
3.1 Biomarcadores de Susceptibilidade.....	05
3.2 Família Glutationa S-Transferase (GST).....	07
3.3 Biomarcadores de Susceptibilidade e sua Frequência na População.....	08
4. Material e Métodos.....	10
5. Resultados	13
6. Discussão.....	17
7. Conclusão.....	19
8. Referências Bibliográficas.....	20

1. Resumo

O câncer é tido como uma doença causada por mutações genéticas (um conjunto mínimo ainda não determinado, mas maior que um), principalmente nos genes que controlam o ciclo celular. As mutações normalmente são de perda, ganho ou rearranjo genético além de alterações pontuais. É provável que grande parte dos cânceres sejam provocados por fatores ambientais como o tabaco, alimentação e exposições ocupacionais. A maioria dos xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo) carcinogênicos necessitam de uma ativação antes de se tornarem capazes de interagir com macromoléculas, como o DNA, e causar o início de um câncer. A maquinaria de metabolização de xenobióticos é dividida em duas etapas. A fase 1 é onde ocorre a ativação dos xenobióticos através da ação de enzimas oxidativas da família do citocromo P450 (CYP). A fase 2 é onde ocorre a conjugação tornando então os compostos da fase 1 hidrofílicos, podendo assim serem eliminados pela célula. A principal família de genes da fase 2 é a glutathione S-transferase (GST). Diversos trabalhos sugerem uma relação entre polimorfismos específicos destes genes e um aumento na susceptibilidade ao câncer (pulmão, bexiga, cólon, pele, entre outros). Sabe-se também que existe uma diferença nas frequências destes polimorfismos nas diferentes populações humanas tornando difícil extrapolar os resultados obtidos em uma população para outra. A baixa frequência de alguns polimorfismos torna difícil o estudo de casos com número apreciável de indivíduos com os mesmos, fazendo com que possíveis relações de susceptibilidade não sejam detectadas. O estudo de indivíduos normais possibilita caracterizar a população de determinado local e etnia e assim, poder criar subsídios para campanhas de prevenção mais específicas para esta população. Neste estudo analisou-se a frequência de polimorfismos de genes de susceptibilidade ao câncer (*GSTM1* e *GSTT1*) em uma amostra de 115 indivíduos da população negra do sul do Brasil por PCR *multiplex*. O número de indivíduos e respectivas frequências de genótipos nulos foram: 25 (21,74%) para o *GSTT1* e 39 (33,91%) para o *GSTM1*, que estão de acordo com os dados disponíveis na literatura.

2. Objetivos

- Avaliar as frequências dos polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* (pertencentes à família GST) em uma amostra da população negra da região sul do Brasil.
- Comparar estes resultados com os obtidos em outras populações já disponíveis na literatura.

3. Introdução

Células aberrantes, cuja regulação da multiplicação celular esteja comprometida, podem gerar descendentes que herdaram a propensão para proliferar sem responder à regulação, resultando em uma proliferação celular clonal capaz de se expandir indefinidamente (CAVENEY e WHITE, 1996). As mutações podem fazer com que as células se tornem menos responsivas a mensagens externas, podendo sofrer divisões e acumular danos. Em geral, as mutações incluem perdas, ganhos ou rearranjos genéticos, além de alterações pontuais na sequência do DNA (SUGIMURA, 1998). As alterações necessárias para o surgimento de um tumor envolvem diversos genes, a maioria relacionada com o crescimento e proliferação celular (LEE et al., 2000), como os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (CHANG et al., 1995). Quando estas massas tumorais têm o potencial de se expandir por todo o corpo passa a ser denominada câncer.

As principais anormalidades genéticas observadas no câncer incluem uma expressão aumentada de proto-oncogenes (FEARON e VOGELSTEIN, 1990), inativação de genes supressores de tumor (WEINBERG, 1991), instabilidades cromossômicas (LENGAUER et al., 1998), alterações nos genes de reparo do DNA (HOEIJMAKERS, 2001), reativação da telomerase (GREIDER e BLACKBURN, 1996) e alterações epigenéticas (ROUNTREE et al., 2001).

Os oncogenes representam formas alteradas dos proto-oncogenes celulares normais que controlam uma variedade de processos associados com o crescimento, proliferação e diferenciação celular (WEINBERG, 1991). A ativação dos oncogenes celulares pode-se dar através de translocações cromossômicas, ampliações gênicas e mutações de ponto (KNUDSON, 1985). Como consequência dessas alterações, a expressão dos oncogenes comanda a proliferação anormal das células e a formação do tumor (COOPER, 1994). A alteração de um único alelo destes genes é o suficiente para causar mal funcionamento celular. Os genes supressores tumorais atuam como reguladores negativos da proliferação celular (WEINBERG, 1991) e alterações que os inativam liberam a célula da inibição regulada pelos mesmos em determinadas fases do ciclo celular (pontos de checagem), levando à proliferação desordenada, característica da célula cancerosa (WEINBERG, 1991). Para a perda de função destes genes é necessária mutação em ambos os alelos, pois eles atuam de forma recessiva.

Sabe-se que a incidência de câncer em seres humanos aumenta exponencialmente com a idade, referendando a sugestão de que múltiplas alterações genéticas são necessárias para a tumorigênese (VOGELSTEIN e KINZLER, 1993).

3.1 Biomarcadores de Susceptibilidade

Xenobióticos são substâncias químicas naturais ou artificiais que são estranhas ao organismo, como drogas, produtos industriais, pesticidas, poluentes, alcalóides e toxinas produzidas por fungos, plantas e animais (PARKINSON, 1996). Estudos epidemiológicos têm mostrado que cerca de 90% de todos os cânceres são relacionados com fatores ambientais, como o tabaco e alimentação (IARC apud HANNU-RAUNIO et al., 1995). 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 tóxicos ambientais, também chamada de polimorfismo metabólico, pode ser de substancial importância na modulação do risco de câncer. A distribuição étnica destes polimorfismos pode ser interessante para se verificar uma associação com o risco de câncer ou até uma vantagem seletiva de alguns genótipos.

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, as enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos foi dividida em dois grupos: as de metabolismo oxidativo mediado, ou de fase I, e as enzimas conjugadas, ou de fase II:

- Na fase I - primeiramente, as drogas são metabolizadas, muitas vezes numa reação de oxidação para a criação de centros reativos. As principais enzimas da fase I pertencem à família do citocromo P450 (CYP), sendo que uma das principais é a Anil 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 – as enzimas participam da conjugação com um substrato endógeno, por meio das glutathione S-transferases (GSTs), UDP-glucuroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos da fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção (ROSSIT e CONFORTI-FROES, 2000) introduzindo compostos hidrofílicos, semelhantes à glutathione ou um grupo acetil, dentro da molécula (GATTÁS e SOARES VIERA, 2000).

Estudos de associação do tipo caso-controle têm gerado novas informações sobre o câncer e os mecanismos envolvidos no processo da carcinogênese (BARTSCH, 2000). Um grande número de estudos tem procurado uma associação entre genes responsáveis pela metabolização de xenobióticos e desenvolvimento de câncer (AU et al., 2001). Um tipo importante de biomarcador de susceptibilidade apóia-se na incapacidade de muitos compostos carcinogênicos provocarem efeitos prejudiciais, sendo alterados por enzimas que podem aumentar ou diminuir a interação desses com as biomoléculas (EUBANKS, 1994; GUENGERICH, 2000). Assim uma vez que muitos agentes mutagênicos requerem ativação metabólica antes de se ligarem ao DNA, ao RNA e às proteínas, diferenças individuais no processo de ativação e detoxificação destes compostos podem afetar o risco de desenvolvimento de tumores (BARTSCH, 2000). Portanto, distúrbios no equilíbrio destes processos podem explicar a variabilidade na resposta individual à exposição a tais compostos (DALY et al., 1993; HIRVONEN e PERKONEN, 1995).

Diferenças genéticas na regulação, expressão e atividade dos genes de fases I e II podem ser o fator crucial na susceptibilidade a certos tipos de doenças. Os polimorfismos metabólicos associados de forma mais consistente com o aumento do risco de câncer incluem as enzimas da superfamília CYP, as GSTs e as NATs (GATTÁS, 2001). A combinação de genótipos para ativação e detoxificação de xenobióticos, como por exemplo, *CYP1A1* MspI / *GSTM1* nulo, está fortemente associada ao aumento de risco de desenvolver câncer, especialmente aqueles ligados ao cigarro (AUTRUP, 2000), já que o impacto de um único polimorfismo genético pode ser fraco, mas é amplificado quando interações entre mais de um gene polimórfico são analisados (KADLUBAR, 2001). No entanto, diversos estudos não encontraram associação de determinados genótipos e maior risco de determinados tipos de câncer, sendo assim é necessário um maior número de estudos para que relações possam ser bem estabelecidas.

Indivíduos deficientes em muitos passos enzimáticos possuem risco aumentado para o desenvolvimento de tumores, sugerindo uma maior susceptibilidade para aqueles

indivíduos que possuem alterações tanto da Fase I da metabolização, como aquelas conferidas por alterações no gene *CYP1A1*, concomitantes com deleção do gene *GSTM1* (fase II). A identificação de grupos de pessoas que possuam uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço (tabagistas), como aqueles de cavidade bucal, baseada na capacidade de metabolizar os carcinógenos presentes no cigarro, é de grande importância. Devido à complexidade dos componentes do tabaco, e da presença de múltiplos passos em sua metabolização, a análise da susceptibilidade genética do indivíduo em ambas as fases da metabolização, I e II, deve ser considerada (GEISLER e OLSHAN, 2001).

A identificação precoce de mudanças no material genético e de indivíduos mais propensos a acumular mutações durante suas vidas pode conduzir a novas perspectivas para a prevenção e o diagnóstico precoce de certos tumores (GATTÁS, 2001).

3.2 Família Glutathiona S-Transferase (GST)

A família de enzimas Glutathionas S-transferases está envolvida no metabolismo de vários xenobióticos. Sendo um importante sistema enzimático do mecanismo celular de detoxificação que protege as células contra metabólitos oxigênio-reativos devido à conjugação da glutathiona com componentes eletrofílicos. Compostos eletrofílicos reativos podem ser resultantes de processos endógenos, por exemplo, da respiração e em processos inflamatórios ou por radiação ionizante com a produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo radicais superóxido e hidroxila (LANG e PELKONEN, 1999).

Acredita-se que exista em torno de 20 GSTs na espécie humana, estando tais enzimas presentes na maioria dos organismos vivos (Mannervik et al., 1985; Buetler e Eaton, 1992). As enzimas GST estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos (GATTÁS et al., 2004). As GSTs formam uma família multigênica com quatro diferentes classes de isoenzimas da fase II incluindo os locos *GSTM1(mu)* e *GSTT1(theta)*. Uma de suas funções 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).

Em estudos por hibridização *in situ*, o gene *GSTT1* foi mapeado na posição 22q11.2, mesma banda onde o *GSTT2* está localizado, possuindo 8,1 kb (Webb et al. 1996). PEMBLE et al. (1994) demonstrou que a presença ou ausência do gene foi

coincidente com os fenótipos conjugadores (*GSTT1+*) e não-conjugadores (*GSTT1-*) respectivamente.

Os genes da classe *mu* foram mapeados no braço curto do cromossomo 1, e o gene *GSTM1* está mais especificamente localizado em 1p13 (HATAGIMA 2002). Os alelos conhecidos do gene *GSTM1* inclui duas variantes que produzem enzimas com atividade similar (*GSTM1A* e *GSTM1B*) e a deleção do gene (genótipo nulo) (AUTRUP, 2000). Aproximadamente 50% da população caucasóide apresenta o genótipo nulo para o *GSTM1* (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).

Indivíduos com deleção dos genes e, conseqüentemente, a ausência ou a forma inativa das enzimas, são denominados de portadores dos genótipos "*GSTT1-nulo*" e "*GSTM1-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).

Substâncias como 1,2:3,4-diepoxiбутano, 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, possui seu metabolismo relacionado com o genótipo *GSTM1*. As enzimas da família GST também estão envolvidas com a metabolização dos compostos do cigarro NORPPA (2003). 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 maior risco em indivíduos com o genótipo nulo em não fumantes (GEISLER e OLSHAN, 2001).

3.3 Biomarcadores de Susceptibilidade e sua Frequência na População

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 (RAUNIO et al. 1995).

Diversos trabalhos têm demonstrado existir diferenças nas frequências dos alelos dos genes *GSTT1* e *GTM1* em diferentes grupos étnicos, mas não encontram diferenças significativas quanto à idade e ao sexo dentro de cada população.

PEMBLE et al. (1994) mostrou que o gene *GSTT1* está ausente em 38% da população.

Estudos realizados com populações do Brasil mostram que o genótipo nulo para *GSTM1* está presente em 55% dos caucasianos, 33% dos negróides e 20% dos índios da Amazônia. Já o genótipo nulo para *GSTT1* foi encontrado em 18,5% dos caucasianos, 19% dos negros e 11% dos índios da Amazônia (ARRUDA et al., 1998). Em uma pesquisa realizada por GATTÁS et al., (2004) verificou-se o genótipo nulo do *GSTM1* em 55,4% dos brancos, 41,4% dos mulatos e 32,8% dos negros de uma amostra proveniente de São Paulo. Nesta mesma amostra a frequência do genótipo nulo para o gene *GSTT1* foi a seguinte: 22,3% dos brancos, 17,2% dos mulatos e 26,3% dos negros.

As frequências do genótipo nulo para caucasóides brasileiros para o *GSTM1* 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 baixa frequência de alguns polimorfismos torna difícil o estudo de casos com número apreciável de indivíduos com os mesmos, fazendo com que possíveis relações de susceptibilidade não sejam detectadas. O estudo de indivíduos normais possibilita caracterizar a população de determinado local e etnia e assim, poder criar subsídios para campanhas de prevenção mais específicas para esta população.

4. Material e métodos

O presente estudo foi realizado utilizando-se uma amostra de 115 indivíduos da população negra provenientes da região metropolitana de Curitiba – PR. Esta amostra foi obtida do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH), onde compõem o banco de dados de doadores voluntários de medula óssea e estão cadastrados no Registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula Óssea (REDOME).

A coleta do sangue foi realizada pela equipe do LIGH nas dependências do HEMEPAR. A extração do DNA seguiu estes procedimentos: Centrifugou-se 5 ml de sangue de cada indivíduo a 2000 rpm por 20 minutos, conseguindo assim separar o sangue em três partes. No nível mais alto está o plasma, na intermediária estão os glóbulos brancos, chamado de “buffy-coat” e na camada mais inferior estão os eritrócitos. Apenas o “buffy-coat” é retirado e colocado em um eppendorf onde é adicionado 700 µl de RCLB e centrifugado a 13000 rpm por 2 minutos. Este processo é repetido de 3 a 4 vezes sempre descartando o sobrenadante e utilizando 1ml de RCLB.

Após o último descarte do sobrenadante adiciona-se 1000 µl de água ultra-pura e mistura-se utilizando uma pipeta.

Centrifuga-se então a 13000 rpm por 2 minutos e descarta novamente o sobrenadante. Adiciona-se então 80µl de tampão proteinase K 5x, 40 µl de proteinase K, 20 µl de SDS 20% e 240 µl de água ultra-pura. O DNA genômico foi extraído utilizando o método *salting out* segundo BIGMON e FERNANDEZ-VINA (1997), com modificações. Ao final do procedimento a amostra foi ressuspensa em 50 µl de água ultra-pura e armazenada a -20 °C.

Para se conhecer a concentração de DNA em cada amostra 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). Uma amostra é considerada pura quando o valor da razão de sua densidade óptica OD_{260}/OD_{280} está entre 1,6 e 1,8. Assim após a leitura obtêm-se a razão entre a absorvância e concentração de DNA em µg/ml.

A análise do polimorfismo nos genes *GSTM1* e *GSTT1* por PCR Multiplex foi realizada baseada no protocolo de ABDEL-RAHMAN et al. (1996):

- 2,5 µl de tampão da enzima (20mM de tris-HCl pR 8,4; 50mM de KCl);
- 1 µl(2mM) de $MgCl_2$;

- 2,0 µl de cada iniciador: *GSTM1*₁, *GSTM1*₂, *GSTT1*₁, *GSTT1*₂, *CYP1A1*₁ e *CYP1A1*₂;
- 0,25 U de Taq DNA Polimerase;
- 5,0 µl (2 mM) de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP);
- 2,0 µl de DNA genômico total;
- 3,25 µl de água ultra-pura estéril;

Os iniciadores para o *CYP1A1* amplificam um fragmento constante de 312 pb, usado como controle interno da reação, impedindo uma falsa interpretação dos resultados devido à uma ausência de amplificação. O fragmento de 215 pb foi visualizado somente em pessoas que possuem o gene *GSTM1* positivo. O fragmento de 480pb foi visualizado somente em pessoas que possuem o gene *GSTT1* positivo. A ausência da amplificação destes fragmentos indica os respectivos genótipos *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo (Tabela 1).

Os fragmentos foram amplificados no termociclador Eppendorf Gradient e submetidos à eletroforese em cuba contendo tampão TBE 1x retirado da solução concentrada de 10x (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 de 1000 ml).

Para a visualização foi utilizado um gel de agarose 1,8% feito com tampão TBE 1x e corado com brometo de etídeo (10 mg/ml). Também é adicionado 5 ml de corante para visualização da corrida (15 ml de ficol, 20 ml de H₂O e 0,0125 g de azul de bromofenol).

A identificação do peso molecular foi feito utilizando 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 visualizados em um trasnsiluminador de luz ultra-violeta e gravados no sistema de captação de imagens pelo software "Digi Doc It".

Tabela 1 – Iniciadores e condições de amplificação para análise dos 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	
	C2:5'CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC3'	72°C – 4 min;

Para a análise estatística, as frequências alélicas foram obtidas por contagem direta.

As frequências genóticas observadas foram comparadas com as esperadas de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg, conforme fórmulas descritas em BEIGUELMAN (1988).

O teste de Qui-quadrado (χ^2) foi aplicado com o objetivo de verificar se os genótipos encontrados se distribuíam igualmente em diferentes amostras de populações negróides, incluindo nossos dados e os descritos na literatura, conforme as fórmulas apresentadas por BEIGUELMAN (1988).

5. Resultados

Para o gene *GSTT1*, dos 115 indivíduos analisados neste estudo, 90 (78,26%) foram positivos e 25 (21,74%) foram negativos (genótipo nulo).

Para o gene *GSTM1*, dos 115 indivíduos analisados, 76 (66,09%) foram positivos e 39 (33,91%) foram negativos (genótipo nulo).

Analisando os dois genes em conjunto verificou-se a ocorrência de 9 (7,83%) indivíduos duplos nulos. A idade média foi de $30,0 \pm 8,1$ anos ($30,59 \pm 8,3$ para os homens e $31,14 \pm 7,6$ para as mulheres. $t=0,35$; $P>0,70$). Os resultados estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2- Número de indentificação, sexo e genótipo dos indivíduos.

Amostra	Sexo	Idade	<i>GSTT1</i>	<i>GSTM1</i>
1	Masculino	34	-	+
2	Masculino	44	+	-
3	Feminino	38	+	+
4	Masculino	43	+	+
5	Masculino	25	+	+
6	Feminino	36	-	-
7	Masculino	32	+	+
8	Masculino	36	+	+
9	Masculino	34	+	-
10	Masculino	34	+	-
11	Feminino	41	-	+
12	Masculino	31	+	+
13	Masculino	23	-	+
14	Masculino	23	+	+
15	Feminino	48	+	-
16	Masculino	24	+	+
17	Masculino	39	-	-
18	Feminino	39	+	+
19	Feminino	40	+	+
20	Feminino	23	+	+
21	Feminino	28	+	+
22	Feminino	23	+	+
23	Feminino	24	-	-
24	Feminino	39	+	+
25	Feminino	35	-	-
26	Masculino	35	+	+
27	Masculino	27	+	-
28	Masculino	30	-	+
29	Masculino	26	+	+

30	Masculino	22	+	+
31	Masculino	23	+	+
32	Feminino	33	+	+
33	Masculino	38	+	+
34	Masculino	21	+	+
35	Feminino	28	+	-
36	Masculino	38	+	+
37	Feminino	23	+	+
38	Feminino	30	+	+
39	Masculino	48	+	-
40	Feminino	32	-	+
41	Masculino	21	+	+
42	Masculino	23	+	+
43	Masculino	24	-	-
44	Feminino	45	+	+
45	Masculino	40	+	-
46	Feminino	26	+	-
47	Masculino	48	+	+
48	Masculino	25	+	+
49	Masculino	21	+	+
50	Masculino	23	+	+
51	Masculino	54	+	-
52	Feminino	31	+	-
53	Masculino	47	+	+
54	Feminino	25	+	+
55	Feminino	23	+	+
56	Feminino	25	+	+
57	Feminino	31	+	+
58	Feminino	45	+	+
59	Masculino	33	+	-
60	Feminino	21	+	+
61	Feminino	49	+	+
62	Masculino	27	+	-
63	Feminino	21	+	+
64	Feminino	34	+	-
65	Masculino	26	+	+
66	Masculino	22	-	+
67	Masculino	35	+	-
68	Feminino	25	+	-
69	Masculino	45	+	-
70	Feminino	33	-	-
71	Masculino	37	+	-
72	Masculino	23	-	+
73	Masculino	29	+	-
74	Masculino	21	+	-
75	Masculino	21	+	+

76	Masculino	31	+	+
77	Masculino	29	-	-
78	Masculino	22	+	+
79	Feminino	22	+	+
80	Masculino	31	+	-
81	Masculino	26	+	+
82	Masculino	30	+	+
83	Masculino	40	+	+
84	Feminino	34	+	-
85	Masculino	29	+	+
86	Feminino	23	+	-
87	Masculino	26	+	-
88	Masculino	41	+	+
89	Masculino	31	+	-
90	Feminino	35	+	-
91	Masculino	27	-	+
92	Feminino	24	+	-
93	Feminino	22	+	+
94	Feminino	32	-	+
95	Masculino	22	+	+
96	Masculino	21	-	+
97	Masculino	20	-	+
98	Masculino	36	-	-
99	Feminino	26	+	-
100	Masculino	29	+	+
101	Masculino	20	+	+
102	Masculino	33	-	+
103	Feminino	23	-	+
104	Feminino	36	-	+
105	Feminino	32	+	+
106	Masculino	35	+	+
107	Masculino	37	+	+
108	Masculino	36	+	+
109	Masculino	38	-	+
110	Feminino	33	-	+
111	Masculino	42	+	+
112	Feminino	34	+	+
113	Masculino	21	+	-
114	Masculino	21	+	-
115	Masculino	23	-	-

Legenda: += genótipo positivo, - = genótipo nulo

Tabela 3- Números absolutos e freqüências obtidas para os genótipos dos genes *GSTT1* e *GSTM1*

	Positivos (+)	Negativos (-)	Total
<i>GSTT1</i>	90 (78,26%)	25 (21,74%)	115
<i>GSTM1</i>	76 (66,09%)	39 (33,91%)	115

A tabela 4 mostra a freqüência dos haplótipos (*GSTT1/GSTM1*) nos homens e nas mulheres. Os referidos haplótipos se apresentaram igualmente distribuídos nos dois sexos ($\chi^2_3 = 0,184$, $P > 0,95$).

As freqüências obtidas na nossa amostra, foram comparadas com as descritas por GATTÁS et al. (2004) em populações negróides provenientes dos estados de São Paulo e Bahia, conforme apresentadas na tabela 5. Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes, indicando que as mesmas estão homogeneamente distribuídas nos estudos realizados em diferentes regiões do país ($\chi^2_4 = 0,13$; $P > 0,95$).

A estimativa da freqüência de heterozigotos e homozigotos dominantes, supondo que esta população esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg, mostrou que para o gene *GSTT1* admite-se que existam 33 indivíduos (28,48%) homozigotos dominantes e 57 (49,77%) heterozigotos. Para o gene *GSTM1*, as estimativas indicaram 20 indivíduos (17,44%) homozigotos dominantes e 56 (48,64%) heterozigotos.

Tabela 4- Distribuição dos genótipos de acordo com o sexo dos indivíduos.

GSTT1/GSTM1

	+/+	+/-	-/+	-/-	Total
Homens	37 (52,11%)	19 (26,76%)	10 (14,08%)	5 (07,04%)	71
Mulheres	23 (52,27%)	11 (25,00%)	6 (13,64%)	4 (09,09%)	44
Total	60 (52,17%)	30 (26,09%)	16 (13,91%)	9 (07,83%)	115

+= positivo, -= negativo

Tabela 5- Comparação das freqüências dos genótipos nulos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* e para ambos os genes deste estudo e de GATTÁS et al., (2004)

Amostra	<i>GSTT1</i>	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1/GSTM1</i>	Total
Presente estudo (Paraná)	25	39	9	73
São Paulo	51	81	18	150
Bahia	34	51	13	98
Total	110	171	40	321

6. Discussão

Os genes que codificam enzimas envolvidas no biometabolismo de xenobióticos (CYPs, GSTs, NATs, entre outros) têm extrema importância na manutenção celular e conhecer os efeitos de seus variantes alélicos se mostra crucial para melhor entender como cada indivíduo reage aos xenobióticos. É possível que o conhecimento dos efeitos da combinação de diversos genes possa abrir um novo caminho no tratamento e prevenção de doenças com causas ambientais. Sabendo-se que estes polimorfismos possuem diferentes frequências nas diversas populações é necessário estudar cada uma delas independentemente.

Neste estudo foi analisada a frequência dos genótipos nulos dos genes *GSTT1* e *GSTM1*, pertencentes à família das glutatona S-transferases (GSTs), ambos envolvidos na detoxificação celular. Na análise de 115 indivíduos negros do sul do Brasil verificou-se que 25 (21,74%) e 39 (33,915%) indivíduos possuíam o genótipo nulo para o gene *GSTT1* e *GSTM1* respectivamente.

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 frequências 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 frequências estimadas foram 21% nos italianos e 28% nos eslovacos (SALAGOVIC et al., 1999; PALLI et al., 2000). As populações asiáticas apresentam as frequências mais elevadas de *GSTT1-nulo*. LEE et al. (1995) encontraram as frequências de 58% nos chineses e de 38% nos malasianos, enquanto SETIWAN et al. (2000) encontraram a frequência de 46% num estudo com a população chinesa. Outros dois estudos do tipo caso-controle encontraram as frequências de 42% (KIM et al., 2000) e 46% em coreanos (PARK et al., 2000). As mais altas frequências 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 frequências são similares às encontradas nas populações norte-americanas e européias. ARRUDA et al. (1998) descreveram frequências de 19% entre indivíduos de origem caucasóide e negra e 11% numa população indígena da Amazônia. Outras frequências encontradas na população brasileira são de 25,4% (ROSSINI et al., 2002) e 22,3% (GATTÁS et al., 2004).

Para o gene *GSTM1*, dos 115 indivíduos analisados, 76 (66,09%) foram positivos e 39 (33,91%) eram portadores de genótipo nulo (Tabela II).

Nos Estados Unidos, estudos tipo caso-controle mostram freqüências 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 freqüência 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 freqüências 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 freqüência foi descrita por GATTÁS e SOARES-VIEIRA (2000) – 60,2% em amostra coletada no Estado de São Paulo.

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 *GSTT1*: $p^2 = 0,28$ (n=33); $2pq = 0,50$ (n=57); e $q^2 = 0,22$ (n=25). Para o gene *GSTM1*, $p^2 = 0,17$ (n=20); $2pq = 0,49$ (n=56); e $q^2 = 0,34$ (n=39).

7. Conclusão

Este estudo determinou as frequências de genótipos nulos para os genes *GSTT1* e *GSTM1* em uma amostra de 115 indivíduos da região sul do Brasil. Foram encontradas 25 (21,74%) indivíduos com genótipo nulo para o *GSTT1* e 39 (33,91%) indivíduos com o genótipo nulo para o gene *GSTM1*. Estes resultados se mostraram de acordo com a literatura para amostras de mesmo grupo étnico na população brasileira, indicado pelo teste do χ^2 .

Os resultados obtidos neste trabalho junto com dados já publicados mostram existir uma frequência particular destes genótipos para diferentes populações. Os genótipos nulos tendo se mostrado relativamente frequentes provavelmente indicam que não estejam sofrendo ação seletiva. Porém, a baixa frequência de duplos nulos pode indicar que esta combinação esteja em desvantagem seletiva. Devido ao fato destes polimorfismos estarem envolvidos com a predisposição ao câncer, um melhor entendimento da distribuição destes genótipos nas populações pode vir a se tornar um importante aliado para novos meios de prevenir doenças com influência de fatores ambientais como o câncer.

8. 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.
- ALEXANDRIE, A.K.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; SEIDEGARD, J.; TORNLING, G.; RANNUG, A. genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis*, 15: 1785-1790, 1994.
- ARRUDA VR; GRIGNOLLI CE; GONÇALVES MS; SOARES MC; MENEZES R; SAAD STO; COSTA FF. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase um (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *CLINICAL GENETICS* 54: 210-214, 1998.
- ARVANITIS, D.A.; GOUMENOU, A.G., MATALLIOTAKIS, I.M.; KOUMANTAKIS, E.E.; SPANDIDOS, D.A. Low penetrance genes are associated with increased susceptibility to endometriosis. *Fertil. Steril.*, 76: 1202-6, 2001.
- AU, W.W; OH, H.Y.; GRADY, J.; SALAMA, S.A.; HEO, M.Y. Usefulness of genetic susceptibility and biomarkers for evaluation of environmental health risk. *Environ. and Mol. Mutagenesis*, 37: 215-225, 2001.
- AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mut. Res.* No. 464, pp. 65-76. 2000.
- BARANOVA, H.; PERRIOT, J.; ALBUISSON, E. Peculiarities of the GSTM1 0/0 genotype in French heavy smokers with various type of chronic bronchitis. *Hum. Genet.*, 99: 822-6, 1997
- BARTSCH, H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. *Mutat. Res.*, 462: 255-279, 2000.
- BEIGUELMAN, B. *Curso Prático de Bioestatística*. Ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP. 1988.
- 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: funcional and medical implication*. Paris; EDK, 1997.

- BUETLER, T.M.; EATON, D.L. Glutathione S-transferase: aminoacid sequence comparison, classification and phylogenetic relationship. **Environ. Carcinogen. Ecotoxicol. Ver.**, 10: 181-203, 1992.
- CAVENEY, W.K E WHITE, R.L. The genetic basis of cancer. **Sci. Am.**, 272: 72-79, 1996.
- CHANG, F.; SYRJANEN, S.; SYRJANEN, K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. **J. Clin. Oncol.**, 13: 1009-1022, 1995.
- 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.
- DALY, A.K.; CHOLERTON, S.; GREGORY, W.; IDLE, J.R. Metabolic polymorphisms. **Pharmac. Ther.**, 57: 129-160, 1993.
- DRAKOULIS, N.; CASCORBI, I.; BROCKMOLLER, J.; GROSS, C.R.; ROOTS, I. Polymorphisms in the human CYP1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer: exon 7 mutation (4889 A to G), and a C mutation in the 3' flanking region. **Clin. Investig.**, 72: 240-248, 1994.
- EUBANKS, M. Biomarkers: the clues to genetic susceptibility. **Environ. Health Perspect.**, 102: 50-56, 1994.
- FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, 61: 759-767, 1990.
- GARTE, S.; GASPARI, L.; ALEXANDRIE, A.K.; AMBROSONE, C.; et al. Metabolic Gene Polymorphism Frequencies in Control Populations. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Preven.** 10: 1239-1248, 2001.
- GATTÁS, G. J. F.; SOARES-VIEIRA, J. A. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. **Occup. Med.** Vol. 50, No. 7, pp. 508-511, 2000.
- GATTÁS, G. J. F.; KATO, M.; SOARES-VIEIRA, J. A.; SIRAQUE, M. S.; KOHLER, P.; GOMES, L.; REGO, M. A. V.; BYDLOWSKI, S. P. Ethnicity and glutathione S-transferase (*GSTM1/GSTT1*) polymorphisms in a Brazilian population. **Braz. J. Med. Biol. Res.** No 34. pp. 451-458. 2004.

- GEISLER, S.A.; OLSHAN, A.F. *GSTM1*, *GSTT1* and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Am. J. Epidemiol.**, 154:95-105, 2001.
- GATTÁS, G. J. F.; SOARES-VIEIRA, J. A. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. **Occup. Med.** Vol. 50, No. 7, pp. 508-511, 2000.
- GEISLER, S. A.; OLSHAN, A. F. *GSTM1*, *GSTT1*, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-huge review. **Am. J. Epidemiol.** Vol. 154, No. 2, pp. 95-103, 2001.
- GERTIG, D.; STAMPFER, M., HAIMAN, C. et al. Glutathione S-transferase *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** No 7: pp. 1001-150. 1998.
- GREIDER, C.W.; BLACKBURN, E.H. Telomeres, telomerase and cancer. **Sci. Am.**, 274: 92-97, 1996.
- GUENGERICH, F.P. Metabolism of chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, 21: 345-351, 2000.
- HATAGIMA, A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.** 18: 357-377, 2002.
- HAYASHI, S.I.; WATANABE, J.; NAKACHI, K.; KAWAJIRI, K. PCR detection of an A/G polymorphism within exon 7 of the CYP1A1 gene. **Nucleic Acids Res.**, 11: 4797, 1991.
- HILDEBRAND, C. E.; GONZALEZ, F. J.; MCBRIDE, O. W.; NEBERT, D. W. Assignment of the human 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible cytochrome P1-450 gene to chromosome 15. **Nucleic Acids Res.** 13: 2009-2016, 1985.
- HIRVONEN, A.; PELKONEN, O.; Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility – a review. **Gene.** 159: 113-121, 1995.
- HOEIJMAKERS, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, 411: 366-374, 2001.
- KIM, W. J.; LEE, H. L.; LEE, S. C.; et al. Polymorphisms of N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferase mu and theta genes as risk factors of bladder cancer in relation to asthma and tuberculosis. **J. Urol.** No. 164: pp. 209-13. 2000.
- KNUDSON, A.G. Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes. **Cancer Res.**, 45: 1437-1443, 1985.

LANG, M.; PELKONEN, O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. Em: **Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer**. IARC Scientific publications. Lyons, 148: 13-22, 1999.

LEE, E. J.; WONG, J. Y.; YEOH, P. N.; et al. Glutathione S-transferase theta (*GSTT1*) genetic polymorphism among Chinese, Malays and Indians in Singapore. **Pharmacogenetics**. No. 5: pp. 332-334. 1995.

LEE, J.J.; HONG, W.K.; HITTELMAN, W.N. Predicting cancer development in oral leucoplakia: ten years of translational research. **Clin. Cancer Res.**, 6: 1702-1710, 2000.

LOSI-GUEMBAROVSKI, R.; D'ARCE, L. P. G.; CÓLLUS, I. M. S.; Glutathione S-transferase Um (*GSTM1*) null genotype in relation to gender, age and smoking status in a healthy Brazilian population. **Genet. Mol. Biol.** No. 25: pp. 357-360. 2002.

KADLUBAR, F.F. Concluding remarks: symposium on Genetic Susceptibility to Environmental Toxicants. **Mutat. Res.**, 482: 111-113, 2001.

KIM, W. J.; LEE, H. L.; LEE, S. C.; et al. Polymorphisms of N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferase mu and theta genes as risk factors of bladder cancer in relation to asthma and tuberculosis. **J. Urol.** No. 164: pp. 209-13. 2000.

LEE, J.J.; HONG, W.K.; HITTELMAN, W.N. Predicting cancer development in oral leucoplakia: ten years of translational research. **Clin. Cancer Res.**, 6: 1702-1710, 2000.

LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, 396: 643-649, 1998.

MANNERVIK, B.; ALIN, P.; GUTHENBERG, C.; JENSSON, H.; TAHIR, M.K.; WARHOLM, M.; JORNVALL, H. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82: 7202-7206, 1985.

NELSON, S.A.; WIENCKE, J.K.; CHRISTIANI, D.C. et al. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. **Carcinogenesis**, No. 16 pp.1243-1245. 1995.

PALLI, D.; VINEIS, P.; RUSSO, A.; et al. Diet, metabolic polymorphisms and DNA adducts: the EPIC-Italy cross-sectional study. **Int. J. Cancer**. No 51: pp. 150-444. 2000.

PARK, S. K.; YOO, K. Y.; LEE, S. J.; et al. Alcohol consumption, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Pharmacogenetics**. No. 10: pp. 301-9. 2000.

PEMBLE, S.; SCHROEDER, K.; SPENCER, S.; et al. Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*). cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.* No. 300: pp. 271-006. 1994.

RAUNIO H.; HUSGAFVEL-PURSIAINEN K.; ANTTILA S.; HIETANEN E.; HIRVONEN A. PELKONEN O. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility. 159: 113-121, 1995.

REBBECK, T.; WALKER, A.; JAFFE, J.; et al. Glutathione S-transferase-mu (*GSTM1*) and -theta (*GSTT1*) genotypes in the etiology of prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* No. 58: pp. 58-283. 1999.

ROSSINI, A.; RAPOZO, D. C.; AMORIM, L. M.; MACEDO, J. M.; MEDINA, R.; NETO, J. F.; GALLO, C. V.; PINTO, L. F. Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms in Brazilian population. *Genet. Mol. Res.* No. 30: pp. 40-233. 2002.

ROSSIT, A.; CONFORTI-FROES, N.D.T. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Rev. Soc. Bras. Cancerol.*, 3: 26-30, 2000.

ROUNTREE, M.R.; BACHMAN, K.E.; HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*, 20: 3156-3165, 2001.

SALAGOVIC, J.; KALINA, I.; HABALOVA, V.; et al. The role of human glutathione S-transferases M1 and T1 in individual susceptibility to bladder cancer. *Physiol Res.* No. 48: pp. 465-71. 1999.

SETIWAN, V.; ZHANG, Z.; YU, G.; et al. *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes and risk of gastric cancer. A case-control study in Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* No. 9: pp. 73-80. 2000.

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.

SUGIMURA, T. Cancer prevention: past, present, future. *Mut. Res.*, 402: 7-14, 1998.

WEBB, G.; VASKA V.; COOGAN M. & BOARD P. Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (*GSTT1*). *Genomics.* 33: 121-123.

WEINBERG, R.A. Tumor suppressor genes. *Science*, 254: 1138-1146, 1991.

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.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9:138-41, 1993.