

Análise dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes que desenvolveram leucemias agudas

Paula Rohr,¹ Andrés Delgado Cañedo,¹ Giorgio Paskulin,²
Ivan Schüller,¹ Nance B. Nardi¹ e Kátia Kvitko¹

Resumo: (Análise dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes que desenvolveram leucemias agudas) – A leucemia é uma neoplasia que acomete a medula óssea. No caso das Leucemias Agudas (LA), as células em proliferação são imaturas ou blastos. A etiologia das LA pode ser explicada pela combinação de fatores genéticos e ambientais. Como exemplo das influências genéticas pode-se citar polimorfismos de genes de metabolização/detoxificação. Este trabalho tem por objetivo analisar os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em relação à suscetibilidade de desenvolvimento de LA. O DNA genômico de 87 pacientes (24 mielóides, 35 linfóides e 28 sem classificação determinada) foi analisado pela técnica de PCR multiplex. A idade dos pacientes variou entre seis meses e 80 anos, sendo 35 femininos e 52 masculinos. Foi detectado aumento significativo da frequência do genótipo *GSTT1* nulo quando comparado com uma população controle (41,37% X 23%) (P=0.005). A frequência do genótipo nulo para *GSTM1* nos pacientes não apresentou diferença significativa com relação aos controles (49,42% X 50%). Com isso, sugerimos que o gene *GSTT1* parece estar envolvido na suscetibilidade para o desenvolvimento de LA.

Palavras-chave: Leucemia Aguda, polimorfismos, *GSTT1*, *GSTM1*, suscetibilidade genética.

Abstract: (Polymorphism analyses of *GSTM1* and *GSTT1* genes in Acute Leukemia patients) – Leukemia is a neoplastic disease that affects bone-marrow cells. In case of Acute Leukemia (AL) the proliferating cells are immature or blasts. The causes of AL are likely to involve an interaction between genetic susceptibility and environment. Polymorphisms in genes coding metabolizing/detoxification enzymes are responsible for this susceptibility. The aim of this study was to analyze polymorphisms of *GSTM1* and *GSTT1* genes in order to verify if they have a role in genetic susceptibility to AL. Genomic DNA from 87 patients (24 myeloblastic, 35 lymphoblastic, 28 with no specific classification) was analyzed by a multiplex PCR methodology. Patient age variation was between 6 months and 80 years old, being 35 females and 52 males. Significant increase in the prevalence of *GSTT1* null genotype was detected in the patient group comparing to controls (41,37% X 23%) (P=0.005). No difference was found in the prevalence of *GSTM1* null genotype between AL patients and controls (49,42% X 50%). Our results suggest that the *GSTT1* genotype may be involved in genetic susceptibility to LA.

Keywords: Acute Leukemia, polymorphism, *GSTT1*, *GSTM1*, genetic susceptibility.

1 Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Caixa Postal 15053, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brasil. E-mail: katia.kvitko@ufrgs.br

2 Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de P Alegre.

Apoio Financeiro: FAPERGS

Introdução

Leucemia refere-se a um grupo de neoplasias malignas que levam à proliferação clonal anárquica de células primordiais hematopoiéticas. Na medula óssea são encontradas as células-mãe ou precursoras que originam os elementos figurados do sangue, glóbulos brancos, glóbulos vermelhos (hemácias ou eritrócitos) e plaquetas. As manifestações clínicas das leucemias são secundárias à proliferação excessiva de células brancas imaturas do sangue, que se infiltram pelos vários tecidos do organismo, como amígdalas, linfonodos, baço, rins, sistema nervoso central e outros. Os sintomas mais comuns das leucemias são fadiga, fraqueza, perda de peso e anorexia (Robbins *et al.* 1996).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2000 foram registrados no Brasil 4.511 casos de mortes causados por leucemias. A expectativa para 2003 era de 7.380 novos casos; no estado do Rio Grande do Sul o número de novos casos esperados, segundo o INCA, em 2003, era de 520 pacientes. Para este mesmo ano, o INCA estimou em 430 o número de óbitos por leucemia. Dados do INCA apontam Porto Alegre como a quarta cidade do Brasil em frequência de leucemias em homens e a segunda cidade em frequência de leucemias em mulheres (INCA 2004).

A etiologia das leucemias pode ser explicada por uma combinação de fatores ambientais e de suscetibilidade genética. Como exemplo de fatores ambientais podemos citar a exposição ao benzeno, a radiações ionizantes e ao tratamento quimioterápico. Quanto à suscetibilidade genética, os polimorfismos dos genes de detoxificação que estão relacionados com enzimas de metabolização/ativação de substâncias genotóxicas, parecem estar envolvidos com o desenvolvimento da doença.

Várias alterações moleculares recorrentes são encontradas em células leucêmicas. Entre estas alterações podemos citar: aberrações na expressão de proto-oncogenes e fatores de transcrição, translocações, hiperploídia e hipoploídias. Estas alterações genéticas contribuem para a transformação leucêmica das células-tronco hematopoiéticas. Os tipos diferentes de leucemias podem apresentar alterações moleculares heterogêneas, bem como esta diversidade pode aparecer quando comparados pacientes com idades diferentes (adulto/criança) (Pui *et al.* 2004).

Classificação das leucemias

A classificação das leucemias pode ser conforme o tipo celular em: linfóide ou mielóide; ou em relação ao estado de maturidade das células em: crônica (células aparentemente com diferenciação completa) ou aguda (blastos, células pouco diferenciadas). Nas Leucemias Crônicas (LC), as células afetadas apresentam grau de desenvolvimento e diferenciação mais avançados. Sua progressão é lenta, porém, seguida de uma fase mais acelerada. As Leucemias Agudas (LA) são doenças progressivas, agressivas, nas quais as células afetadas não estão completamente diferenciadas, ou seja, ainda são consideradas blastos. Conforme a célula de origem, podem ser classificadas em: Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e Leucemia Mielóide Aguda (LMA).

Leucemia Linfóide Aguda (LLA)

A LLA é a doença maligna mais comum na infância, representando aproximadamente 30% de todos os tipos de câncer infantil. A frequência maior do aparecimento da doença ocorre aproximadamente aos quatro anos de idade (Robbins *et al.* 1996, Canalle *et al.* 2004). Aproximadamente 60% dos casos de LLA estão associados a alterações cromossômicas como: hiperploídia (51 a 60 cromossomos); presença do cromossomo *Philadelphia* (Ph¹); outros tipos de translocações, como a t(1;19), e a t(8;14), estão presentes em cerca de 20 a 25% dos casos (Robbins *et al.* 1996).

O estágio da carcinogênese caracterizado como a *iniciação* da LLA, em crianças, parece ocorrer ainda na fase embrionária. Além disso, existem evidências sugerindo que a exposição pré-concepção dos pais poderia influenciar na iniciação da doença na criança. Os estágios de *Promoção* e *Progressão* para LLA devem ocorrer após o nascimento. Savitz & Chen (1990) e Shu *et al.* (1999) descreveram estudos demonstrando o envolvimento da exposição parental pré-concepção a hidrocarbonetos, compostos derivados de petróleo e solventes como fatores de risco para a LLA infantil. A exposição "in utero" a radiação ionizante tem sido bem descrita como fator de risco para a LLA infantil. As evidências maiores vêm de trabalhos com sobreviventes da bomba atômica e com mulheres expostas a Raios-X.

As revisões de Savitz & Chen (1990) e Shu *et al.* (1999) salientam trabalhos demonstrando que exposição materna a hidrocarbonetos, solventes e outros compostos aumentam o risco de LA em crianças. Outra associação também tem sido encontrada quando analisada a exposição ocupacional materna a pesticidas na gravidez. O mecanismo aqui envolvido parece ser a carcinogênese transplacentar. Outros estudos epidemiológicos associam o risco para LLA e poluição, o que ressalta a associação com hidrocarbonetos e derivados de petróleo (Pearson *et al.* 2000, Raaschou-Nielson *et al.* 2001, Reynolds *et al.* 2001).

Leucemia Mielóide Aguda (LMA)

É um tipo de leucemia que tem risco aumentando com a idade, sendo que em crianças e adolescentes apresenta uma incidência de 1/150.000, enquanto que em idosos com mais de 70 anos passa a ser 1/10.000 pessoas. São detectadas anormalidades cromossômicas em aproximadamente 90% dos casos. Entre as anormalidades de maior ocorrência está a translocação t(15;17), que leva à fusão dos genes do α -receptor (*RAR* α) e de uma unidade de transcrição. Esta fusão causa a expressão de um receptor anormal e isto implica no bloqueio da diferenciação celular (Robbins *et al.* 1996).

Genes de metabolização

Muitos estudos mostram que a detoxificação celular feita por enzimas está relacionada com a proteção celular. A inativação de xenobióticos e de toxinas endógenas possibilita a preservação da integridade celular, além da inibição dos eventos de citotoxicidade provocados por estas substâncias e que podem ser a causa de algumas doenças, como as leucemias (Wilkinson & Clapper 1997).

As enzimas de detoxificação são classificadas em 2 grupos, baseados em suas propriedades funcionais. As enzimas de fase I ativam o xenobiótico, tornando-o mais eletrofílico e desta forma mais reativo. Já as enzimas de fase II competem com a ativação feita pelas enzimas de fase I, inibindo a formação de produtos eletrofílicos, além de catalisarem a conversão de eletrofílicos em conjugados inativos, tornando-os mais hidrossolúveis e facilitando sua excreção da célula (Wilkinson & Clapper 1997).

O exemplo mais conhecido entre as enzimas de fase I, ou enzimas de ativação, são as enzimas da superfamília do Citocromo P450 (CYPs) que são enzimas oxidativas. As CYPs inserem um átomo de oxigênio no xenobiótico para torná-lo altamente eletrofílico. Enquanto que entre as enzimas de fase II temos como mais estudados os genes da superfamília das glutatona-S-transferase (*GSTs*).

As *GSTs* compõem uma superfamília de enzimas com funções diversas, que estão envolvidas na detoxificação de muitas substâncias químicas, incluindo algumas carcinogênicas, como o benzeno e outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, através da conjugação destas substâncias com uma molécula de glutatona endógena.

A reação enzimática catalisada por *GSTs* inibe a reatividade das substâncias eletrofílicas com componentes celulares e resulta na produção do conjugado com glutatona, o que reduz a citotoxicidade. Altos níveis de atividade de *GSTs* levam a uma proteção tecidual na exposição a carcinogênicos, como também causam uma resistência a agentes quimioterápicos (Wilkinson & Clapper 1997).

Em humanos, já foram identificadas 5 diferentes classes de *GSTs*: *GST* α (*GSTA1*, *A2*, *A3*, *A4*), *GST* μ (*GSTM1*, *M2*, *M3*, *M4* e *M5*), *GST* θ (*GSTT1* e *T2*), *GST* π (*GSTT1*) e *GST* ξ (Miller *et al.* 1997, Strange *et al.* 1998). Os genes *GSTM1*, localizados no cromossomo 1p13.1, e *GSTT1*, localizados no cromossomo 22q11.2, apresentam polimorfismos de ausência, o que resulta na falta das proteínas ativas (Pemble *et al.* 1994, Tan *et al.* 1995, Xu *et al.* 1998, Sprenger *et al.* 2000). Estes polimorfismos apresentam variação de frequências conforme a população e grupo étnico estudado (Pemble *et al.* 1994, Warwick *et al.* 1994, Arruda *et al.* 1998).

No Rio Grande do Sul, os genótipos nulos para *GSTM1* e *GSTT1* apresentam frequências diferentes quando comparados euro-brasileiros e afro-brasileiros (Gaspar *et al.* 2004, Kvitko *et al.* 2004). A Tabela 1 apresenta as frequências para o Rio Grande do Sul.

Estudos mostram que a enzima *GSTM1* ativa é responsável pela detoxificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, solventes como o benzeno, enquanto que a *GSTT1* detoxifica pequenos hidrocarbonetos reativos, como o óxido de etileno (Strange *et al.* 1999).

Este trabalho tem como objetivo analisar a frequência dos polimorfismos dos genes *GSTT1* e

Tabela 1. Frequências dos genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* nas populações de euro-brasileiros e afro-brasileiros no Rio Grande do Sul (Gaspar *et al.* 2004, Kvitko *et al.* 2004)

| Polimorfismo | Euro-brasileiros(n) | Afro-brasileiros(n) |
|-------------------|---------------------|---------------------|
| <i>GSTM1</i> nulo | 0,500 (90) | 0,340 (102) |
| <i>GSTT1</i> nulo | 0,211 (90) | 0,280 (149) |

Tabela 2. Seqüências dos *primers* utilizados para análise de PCR e os tamanhos dos fragmentos amplificados

| Gene | Tamanho do fragmento | Primer | Seqüência (5' → 3') |
|--------------|----------------------|--------|--------------------------------|
| <i>GSTM1</i> | 216pb | P105F | ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA |
| | | P105R | TGA GGG CAC AAG AAG CCC TT |
| <i>GSTT1</i> | 480pb | F1144 | TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA |
| | | F1143 | TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC |
| <i>GSTP1</i> | 176pb | G6 | GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G |
| | | G5 | GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C |

GSTM1 em pacientes que desenvolveram LLA e LMA para verificar se estes polimorfismos estão colaborando com a suscetibilidade para o desenvolvimento da doença.

Material e métodos

Caracterização da amostra

Um banco de DNA foi estabelecido em nosso laboratório com amostras de pacientes com Leucemia Aguda. Todos os pacientes foram classificados como euro-brasileiros.

A amostra consiste em 87 pacientes classificados em: 35 LLA, 24 LMA e 28 casos de LAS (sem linhagem celular afetada determinada). Destes pacientes, 52 eram masculinos e 35 femininos.

Não houve diferença em relação à idade ao diagnóstico quando comparados pacientes masculinos e femininos. A idade destes pacientes variou entre seis meses e 63 anos, para LLA, sendo a média de $15,64 \pm 17,16$ anos, e entre seis e 80 anos para LMA, sendo a idade média de $34,75 \pm 20,93$ anos. Nos casos sem linhagem classificada (LAS) a idade variou entre sete meses e 71 anos, sendo a média de $27,73 \pm 25,89$ anos.

Como grupo controle foram usadas as frequências dos genótipos já descritas para população euro-brasileira do Rio Grande do Sul (Gaspar *et al.* 2004).

Extração de DNA e genotipagem

O DNA genômico destes pacientes foi extraído utilizando o protocolo de Lahiri & Nurnberger (1991). Os fragmentos gênicos das amostras foram amplificados utilizando-se *primers* específicos para os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* em um protocolo de PCR multiplex (Gaspar *et al.* 2004). O gene *GSTP1* foi usado como controle de amplificação visto que ambos genes analisados (*GSTM1* e *GSTT1*) apresentam polimorfismos de ausência e presença – A Tabela 2 apresenta os tamanhos de fragmentos e as seqüências dos *primers* utilizados. Em cada reação foram utilizados 100ng de DNA genômico, 15pmol de cada *primer*, 10mM Tris-HCl, 4,5mM MgCl₂, 50mM KCl, 100 mM de dNTPs e 1,0U Taq DNA polimerase em um volume total de 50µL. O protocolo de amplificação consiste de 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 6 ciclos em *touchdown* com 94°C por 1 minuto seguido de 2 minutos a 59°C (decrecendo a 54°C em uma taxa de 1°C por ciclo) e 1 minuto a 72°C, e 30 ciclos com 1 minuto a 94°C seguido de 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C. Os produtos da amplificação foram

analisados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo.

Análise estatística

A frequência genotípica foi determinada por contagem nos dois sistemas. Tabelas de contingências, Teste Exato de Fisher e Teste T foram utilizados com o programa INSTAT para comparação das médias de idade e frequência dos genótipos nas duas amostras (pacientes e controles).

Resultados

A Figura 1 apresenta um gel de agarose 3% com os produtos amplificados referentes aos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP*.

A Tabela 3 apresenta os resultados das frequências dos genótipos nulos relacionados aos genes *GSTM1* e *GSTT1*. Foi verificada diferença estatística entre as frequências do genótipo nulo para *GSTT1* comparando pacientes com LA e controles ($P=0.005$).

A Tabela 4 apresenta os resultados quanto às frequências dos genótipos nulos dos genes estudados nos pacientes por classificação quanto à linhagem celular. O valor de P refere-se à comparação com as frequências da amostras controles. Diferenças esta-

tísticas significantes foram verificadas para os pacientes com LLA ($P=0.003$) e com LAS ($P=0.02$).

Discussão

Muitos mecanismos estão envolvidos na proteção aos danos celulares causados por xenobióticos. Entre estes mecanismos podemos citar a variabilidade populacional quanto às frequências dos polimorfismos nos genes de detoxificação/metabolização. A família das enzimas GSTs está envolvida no metabolismo de muitos xenobióticos, tendo seus níveis induzidos pela exposição a substâncias externas; esta indução sugere que estas enzimas fazem parte de um sistema adaptativo ao estresse químico (Rollinson *et al.* 2000).

As GSTs podem regular os níveis de dano ao DNA das células-tronco hematopoiéticas. *In vitro*, o genótipo nulo de *GSTT1* foi associado a um aumento da frequência de troca de cromátides irmãs induzidas por diepoxibutano em cultura de linfócitos (Norppa *et al.* 1995). Enquanto que a presença do gene *GSTM1* mostrou um papel de proteção de danos de DNA induzidos quimicamente e aductos de DNA (Liu *et al.* 1991, Van Poppel *et al.* 1992, Shields *et al.* 1993, Scarpato *et al.* 1997, Emmel 2003). Já foram detectadas as presenças das proteínas GSTT1 e GSTM1 na medula óssea de pacientes com neuroblastoma. Estas observações podem ser consideradas como indicando um mecanismo biológico de ligação entre o aumento no risco de desenvolvimento de leucemia e falta de atividade das enzimas GSTT1 e GSTM1 neste tecido (Hall *et al.* 1994, Rollinson *et al.* 2000).

Nossos resultados sugerem uma associação entre a perda de atividade da enzima GSTT1 e o desenvolvimento de LA, enquanto que a falta da enzima GSTM1 não parece estar envolvida com o desenvolvimento da doença em nossa amostra. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Rollinson *et al.* (2000) em uma amostra de indivíduos adultos do Reino Unido que desenvolveram LA. Entretanto, o estudo de Canalle *et al.* (2004) não encontrou associação entre o genótipo nulo *GSTT1* e outros genes de metabolização em LLA. Neste trabalho foi estudada uma amostra de pacientes leucê-

Tabela 3. Frequências dos polimorfismos nulos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* na população controle de Euro-brasileiros e na amostra de pacientes com Leucemia Aguda.

| Genótipo | Euro-brasileiros | Pacientes |
|-------------------|------------------|---------------|
| <i>GSTM1</i> nulo | 0,500 (n=90) | 0,494 (n=87) |
| <i>GSTT1</i> nulo | 0,211 (n=90)* | 0,414 (n=87)* |

* $P=0.005$

Tabela 4. Frequências dos genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* nas amostras de LLA, LMA e LAS (sem classificação especificada).

| Pacientes/Controle | <i>GSTM1</i> nulo | <i>GSTT1</i> nulo |
|--------------------|-------------------|-------------------|
| LLA (n=35) | 0,400 | 0,486* |
| LMA (n=24) | 0,667 | 0,292 |
| LAS (n=28) | 0,464 | 0,429** |
| Controle (n=90) | 0,500 | 0,211 |

* $P=0.003$

** $P=0.02$

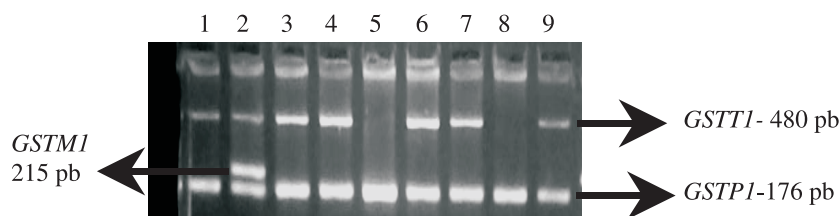


Figura 1. Gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo.

Pacientes 1, 3, 4, 6, 7, e 9: *GSTT*+/*GSTM*-
 Paciente 2: *GSTT* +/*GSTM*+
 Paciente 5 e 8: *GSTT*-/*GSTM*-

micos com até 18 anos de idade, provenientes do estado de São Paulo. Contudo, os mesmos autores acharam associação quando estudaram genótipos combinados dos sistemas *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTP1*.

Yuille *et al.* (2002), estudando uma amostra de pacientes com LLC, não encontraram diferenças nas frequências dos genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1*, porém, avaliando as frequências genótípicas para *GSTP1*, observaram que as frequências dos genótipos que conferem uma redução da atividade enzimática estavam aumentadas, apesar de não ser uma diferença significativa.

Esta diferença entre os estudos pode indicar que a influência dos genótipos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* na suscetibilidade genética para leucemias varia entre as populações, ou que podem estar havendo diferenças na exposição envolvendo o desenvolvimento de leucemia devido a interações específicas gene-gene ou gene-ambiente. Este último ponto poderia ser reforçado pelos resultados apresentados no trabalho de revisão de Pui *et al.* (2004), é demonstrado que alterações genéticas são diferentes quando são comparadas as leucemias agudas que se desenvolvem em crianças e adultos. Assim, acredita-se que a exposição e a metabolização dos xenobióticos no período pré-concepção e no período embrionário/fetal seria fator de risco importante para o desenvolvimento da doença em idade mais precoce.

Outros genes de metabolização também parecem estar envolvidos na suscetibilidade de desenvolvimento de leucemias, como os genes *CYP1A1*, *CYP2E1* e *GSTP1*, porém estes não foram analisados em nossa amostra até o presente momento.

Conclusão

Neste trabalho foram analisadas as prevalências dos genótipos nulos *GSTM1* e *GSTT1* em paci-

entes que desenvolveram LA. Os resultados do nosso trabalho sugerem que o gene *GSTT1* parece estar envolvido com a suscetibilidade para o desenvolvimento de LA em nossa amostra.

Referências

- ARRUDA, V. R., GRIGNOLLI, C. E., GONÇALVES, M. S., SOARES, M. C., MENEZES, R., SAAD, S. T. O. & COSTA F. F. 1998. 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? *Clinical Genetics*, 54: 210-214.
- CANALLE, R., BURIM, R. V., TONE, L. G. & TAKAHASHI, C. S. 2004. Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 43: 100-109.
- EMMEL, V. 2003. *Fatores genéticos na resposta a exposição ocupacional de agricultores a agrotóxicos*. 64p. Monografia (Conclusão do curso de graduação em Farmácia). Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- GASPAR, P., MOREIRA, J., KVITKO, K., TORRES, M., MOREIRA, A. & WEIMER, T. 2004. *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *TP53* polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics and Molecular Biology*, 27: 133-138.
- HALL, A. G., MCGUCHIN, A. G., PEARSON, A. D. J., CATTAN, A. R., MALCOLM, A. J. & REID, M. M. 1994. Glutathione S-transferase in bone marrow metastasis of disseminated neuroblastoma. *Journal of Clinical Pathology* 47: 468-469.
- INCA. Seção de oncologia pediátrica. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=161> Acesso em 10 jul.2004.
- KVITKO, K., GASPAR, P. A., TORRES, M.R., WEIMER, T.A. & HUTZ, M. H. 2004. *CYP1A1*, *GSTM1*,

- GSTP1* and *GSTT1* polymorphisms in an Afro-brazilian group. *Ann of Human Biology*, submetido.
- LAHIRI, D. K. & NURNBERG Jr., J. I. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 19: 5444.
- LIU, Y. H., TAYLOR, J., LINKO, P., LUCIER, G. W., THOMPSON, C. L. & 1991. Glutathione S-transferase μ in human lymphocyte and liver: role in modulating formation of carcinogen-derived DNA adducts. *Carcinogenesis* 12: 2269-2275.
- MILLER, M. S., McCARVER., D. G., BELL, D. A., EATON, D. L. & GOLDSTEIN, J. A. 1997. Genetic polymorphism in human drug metabolic enzymes. *Fundamental and Applied Toxicology* 40: 1-14.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE-BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA. *Estimativas da incidência e mortalidade por câncer*. Rio de Janeiro: INCA, 2003.
- NORPPA, H., HIRVONEN, A., JARVENTAUS, H., UUSKULA, M., TASA, G., OJAJARVI, A. & SORSA, M. 1995. Role of *GSTT1* and *GSTM1* genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxibutano in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis* 16:1261-1264.
- PEARSON, R. L., WACHTEL, H. & EBI, K. L. 2000. Distance-weighted traffic density in proximity to a home is a risk factor for leukemia and other childhood cancers. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 50: 175-180.
- PEMBLE, S., SCHROEDER, K. R., SPENCE, S. R., MEYER, D. J., HALLIER, E., BOLT, H. M., KETTERER, B. & TAYLOR, J. B. 1994. Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and characterization of genetic polymorphism. *Biochemical Journal* 300: 271-276.
- PUI, C.-H., RELING, M. V. & DOWNING, J. R. 2004. Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine* 350: 1535-1548
- RAASCHOU-NIELSON, O., HERTEL, O., THOMSEN, B. L. & OLSEN, J. H. 2001. Air pollution from traffic at the residence of children with cancer. *American Journal of Epidemiology*, 153(5), 433-443.
- REYNOLDS, P., ELKIN, E., SCALF, R., VON BEHREN, J. & NEUTRA, R. R. 2001. A case-control pilot study of traffic exposures and early childhood leukemia using a geographic information system. *Bioelectromagnetics*, Supplement 5, S58-S68.
- ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S. & KUMAR, V. 1996. Fundamentos de Patologia: Estrutural e funcional. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 780p.
- ROLLINSON, S., RODDAM, P., KANE, E., ROMAN, E., CARTWRIGHT, R., JACK, A. & MORGAN, G. J. 2000. Polymorphism variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukemia. *Carcinogenesis* 21: 43-47.
- SAVITZ, D. A. & CHEN, J. 1990. Parental occupation and childhood cancer: review of epidemiologic Studies. *Environmental Health Perspectives*, 88: 325-337.
- SCARPATO, R., HIRVONEN, A., MIGLIORE, L., FALCK, G & NORPPA, H. 1997. Influence of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms on the frequency of chromosome aberrations in smokers and pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutation Research* 389: 227-235.
- SHIELDS, P. G., BOWMAN, E. D., HARRINGTON, A. M., DOAN, V. T. & WESTON, A. 1993. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes. *Cancer Research* 53: 3486-3492.
- SHU, X. O., STEWART, P., WEN, W.-Q., HAN, D., POTTER, J. D., BUCKLEY, J. D., HEINEMAN, E. & ROBINSON L. L. 1999. Parental occupational exposure to hydrocarbons and risk of acute lymphocytic leukaemia in offspring. *Cancer Epidemiology, Biomarkers Prevention*, 8: 783-791.
- SPRENGER, R., SCHLAGENHAUFER, R., KERB, R., BRUHN, C., BROCKMOLLER, J., ROOTS, I. & BRINKMANN, U. 2000. Characterization of glutathione S-transferase *GSTT1* deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics*, 10: 557-565.
- STRANGE, R. C., LEAR, J. T. & FRYER, A. A. 1998. Glutathione S-transferase polymorphisms: influence on susceptibility to cancer. *Chemical Biological Interaction*, 111-112: 351-364.
- STRANGE, R. C. & FRYER, A. A. 1999. The glutathione S-transferase: influence of polymorphisms on cancer susceptibility. In: VINEIS, P., MALATUS, N & LANG, M. Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer. IARC Scientific Publications N 148. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1999: 231-249.
- TAN, K. L., WEBB, G. C., BAKER, R. T. & BOARD, P. G. 1995. Molecular cloning of a cDNA and chromosomal localization of a human theta-class glutathione S-transferase gene (*GSTT2*) to chromosome 22. *Genomics*, 25: 381-387.
- VAN POPPEL, G.; VOGEL, N.; VAN BALDEREN & KOK, F. J. 1992. Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme μ . *Carcinogenesis*, 13: 303-305.
- WARWICK, A., SARHANIS, P., REDMAN, C., PEMBLE, S., TAYLOR, J. B., KETTERER, B., JONES, P., ALLDERSEA, J., GILFORD, J. & YENGI, L. 1994. Theta class glutathione S-transferase *GSTT1* genotypes and susceptibility to cervical neoplasia: interactions with

- GSTM1*, *CYP2E1* and smoking. *Carcinogenesis*, 16: 1243-1245.
- WILKINSON, J. & CLAPPER, M. L. 1997. Detoxification enzymes and chemoprevention. *Proceeding Society Experimental Biological Medicine*, 216: 192-200.
- XU, S., WANG, Y., ROE, B. & PEARSON, W. R. 1998. Characterization of human class mu glutathione S-transferase gene cluster and the *GSTM1* deletion. *Journal Biological Chemistry*, 273: 3517-3527.
- YUILLE, M., CONDIE, A., HUDSON, C., KOTE-JARAI, Z., STONE, E., EELES, R., MATUTES, E., CATOVSKY, D. & HOUSLTON, R. 2002. Relationship between glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99: 4216-4218.