

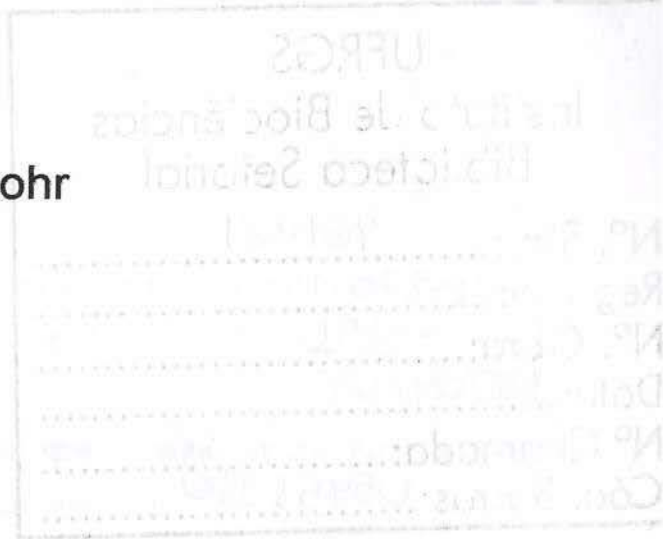
Paula Rohr

**Análise dos Polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* em  
Pacientes que Desenvolveram Leucemias**

Porto Alegre

2004

Paula Rohr



## **ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS *GSTM1* E *GSTT1* EM PACIENTES QUE DESENVOLVERAM LEUCEMIA**

Monografia apresentada para a conclusão do Curso de  
Graduação de Licenciatura em Ciências Biológicas  
pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dra. Kátia Kvitko

Porto Alegre, Julho de 2004.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Kátia Kvitko, por ter acreditado e confiado em mim para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Sídia Maria Callegari-Jacques, minha ex-orientadora, pelos ensinamentos durante o período em que orientou.

A todos os amigos do laboratório de Imunogenética e aos agregados, enfim ao Imunopovo, por tantos momentos de descontração e muitas risadas, o que fazia as horas dentro do laboratório passarem mais rápido.

Aos colegas de barra, por fazerem do curso uma festa.

Às minhas amigas de Montenegro, que apesar de termos tomado caminhos diferentes, estejam sempre presente na minha vida.

Aos meus grandes amigos da faculdade: Andréa Wieck, por me aturar quase que 24hs por dia; ao Daniel G. dos Santos, por ter tido coragem de me indicar para a nossa orientadora e por me agüentar; e ao Felipe Klein Ricachenevsky, por ser sempre um amigão.

E principalmente, à minha família por todo amor, carinho, compreensão em todos os momentos, pela força nas horas difíceis e por sempre confiarem em mim.

UFRGS - BIBLIOTECA

## RESUMO

### ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS *GSTM1* E *GSTT1* EM PACIENTES QUE DESENVOLVERAM LEUCEMIA

A leucemia é uma neoplasia que acomete a medula óssea e se caracteriza pela proliferação medular anárquica, progressiva no tempo e no espaço, sempre alterando o sangue periférico, no caso das leucemias agudas (LA), são células imaturas ou blastos que proliferam. A etiologia das LA pode ser explicada pela combinação de fatores genéticos e ambientais. Como exemplo das influências genéticas, temos as GSTs, então este trabalho tem por objetivo de analisar os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em relação à suscetibilidade de desenvolvimento de LA. O DNA genômico de pacientes foi extraído com base no protocolo de Lahiri & Nurenberg (1991) e as amostras foram amplificadas usando um protocolo de PCR multiplex desenvolvido em nosso laboratório. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. Foram genotipados 87 pacientes (24 mielóides, 35 linfóides e 28 sem classificação determinada) com idade variando entre 6 meses e 80 anos, sendo 35 femininos e 52 masculinos. Nesta amostra foi detectado o genótipo *GSTT1* nulo em uma frequência de 41,37%, diferindo significativamente da população do Rio Grande do Sul, 23% ( $P=0,005$ ). Enquanto que o genótipo nulo para *GSTM1* foi apresentado por 49,42% dos pacientes e não apresentou diferença significativamente da população gaúcha, onde a frequência é de 50%. Com isso, sugerimos que o gene *GSTT1* parece estar envolvido na suscetibilidade para o desenvolvimento de leucemias agudas.

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. ALTERÇÕES MOLECULARES EM LEUCEMIAS.....	8
1.2. CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS.....	8
1.2.1. LEUCEMIAS CRÔNICAS.....	9
1.2.1.1. LEUCEMIA LINFÓIDE CRÔNICA.....	10
1.2.1.2. LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA.....	10
1.2.2. LEUCEMIAS AGUDAS.....	11
1.2.2.1. LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA.....	11
1.2.2.2. LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA.....	12
1.3. GENES DE METABOLIZAÇÃO.....	12
1.3.1. POLIMORFISMOS EM GENES DA FAMÍLIA DO CITOCROMO P540 .....	13
1.3.2. SUPERFAMÍLIA DAS GLUTATIONA-S-TRANSFERASE..	14
1.4. OBJETIVOS.....	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1. CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA.....	17
2.2. EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM.....	17
2.3. ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	19
3. RESULTADOS.....	20
4. DISCUSSÃO.....	25
5. CONCLUSÕES.....	27
6. BIBLIOGRAFIAS.....	28

## 1. INTRODUÇÃO

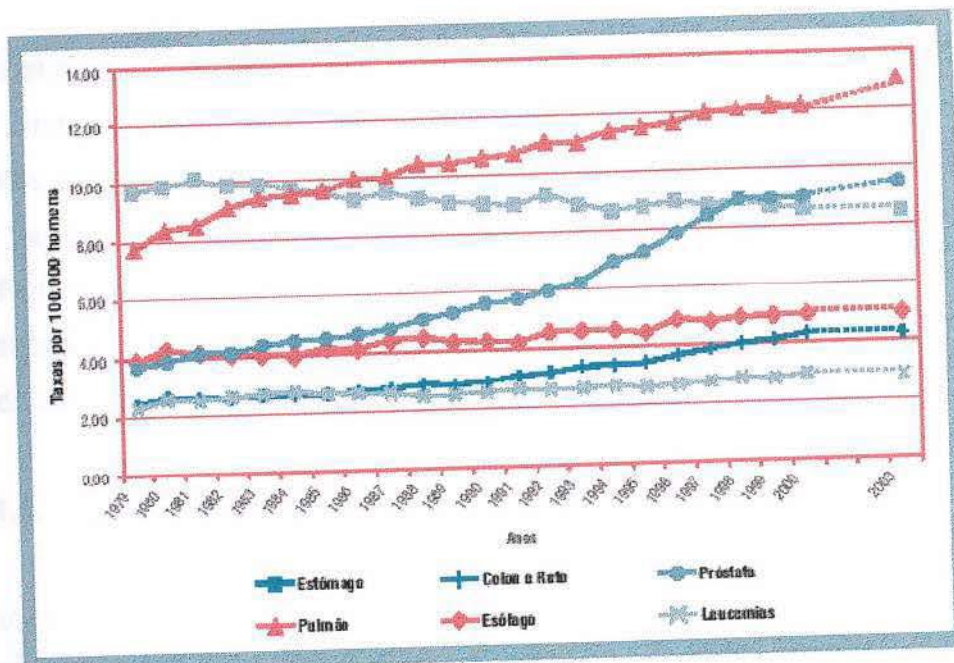
Leucemia refere-se a um grupo de neoplasias malignas que levam a proliferação clonal anárquica, progressiva no tempo e no espaço de células primordiais hematopoiéticas que têm origem na medula óssea. Nela são encontradas as células mães ou precursoras que originam os elementos figurados do sangue glóbulos brancos, glóbulos vermelhos (hemácias ou eritrócitos) e plaquetas (ROBBINS *et al.*, 1996).

As manifestações clínicas das leucemias são secundárias à proliferação excessiva de células imaturas da linhagem branca do sangue, que se infiltram pelos vários tecidos do organismo, como amígdalas, linfonodos (ínguas), 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).

Em 2000, INCA registrou, no Brasil, 4.511 casos de mortes causados por leucemias. Para o ano de 2003, segundo estudos do INCA, eram esperados 7380 novos casos; destes, 4065 em indivíduos do sexo masculino e, os 3315 restantes, do sexo feminino.

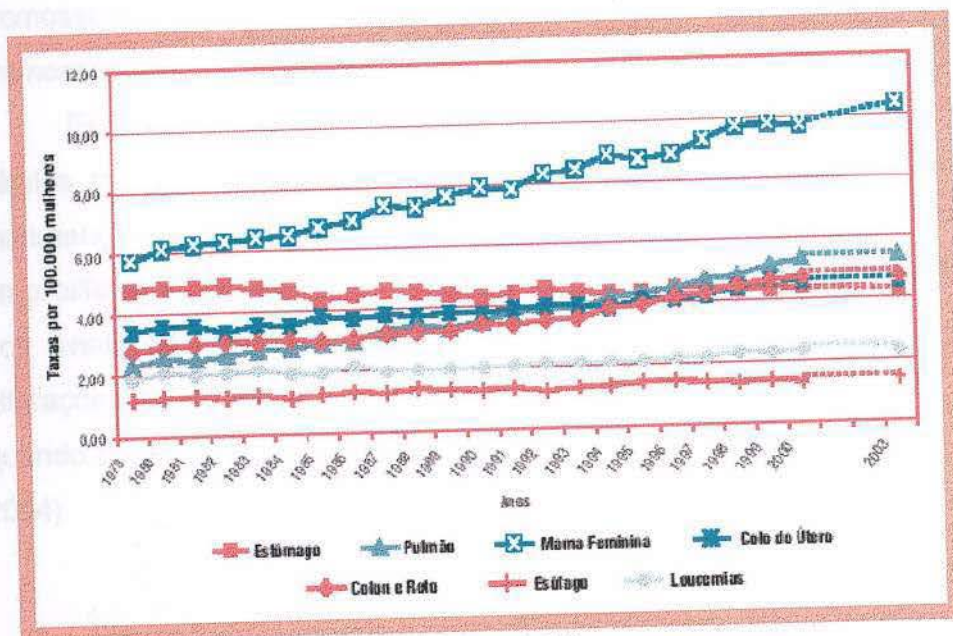
Para o estado do Rio Grande do Sul, o número de novos casos esperados, segundo o INCA, no ano de 2003 era de 520, sendo destes: 270 em pacientes masculinos e 250 em pacientes femininos. Para este mesmo ano, o INCA estimou em 430 o número de óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

A figura 1 mostra a taxa de mortalidade para leucemias e outros tipos de cânceres no Brasil, durante os anos de 1979 a 2000, além das estimativas para o ano de 2003 para homens, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA). A figura 2 mostra a taxa de mortalidade para leucemias e outros tipos de cânceres no Brasil, durante os anos de 1979 a 2000, além das estimativas para o ano de 2003 para mulheres, segundo o INCA.



Fontes: MS/FUNASA/CENEPI/Sistema de Informação sobre Mortalidade - SIM  
 MS/Instituto Nacional de Câncer - INCA  
 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/IBGE/DEPIS

Figura 01. Taxas brutas de mortalidade entre 1979 e 2000 e estimativas para o ano de 2003, em homens, para alguns tipos de cânceres.



Fontes: MS/FUNASA/CENEPI/Sistema de Informação sobre Mortalidade - SIM  
 MS/Instituto Nacional de Câncer - INCA  
 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/IBGE/DEPIS

Figura 02. Taxas brutas de mortalidade entre 1979 e 2000 e estimativas para o ano de 2003, em mulheres, para alguns tipos de cânceres.

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

### **1.1. ALTERAÇÕES MOLECULARES EM LEUCEMIAS**

Várias alterações moleculares são encontradas em células leucêmicas de forma recorrente. Entre estas alterações podemos citar: aberrações na expressão de proto-oncogenes, translocações que levam a fusão de genes de proteínas quinases, as quais passam a ser expressas constitutivamente, alteração em fatores de transcrição, hiperploídia com células apresentando mais de 50 cromossomos e hipoploídias com células apresentando menos de 45 cromossomos (PUI *et al.*, 2004).

Estas alterações genéticas contribuem para a transformação leucêmica nas células tronco hematopoiéticas, e são chaves para o processo regulatório da manutenção ou aumento da capacidade de auto-renovação, perdendo o controle da proliferação normal, bloqueando a diferenciação, e promovendo a resistência aos sinais de apoptose. Sub-tipos diferentes de leucemias podem apresentar alterações moleculares diferentes, bem como estas diferenças podem aparecer quando comparados pacientes com idades diferentes (adulto/criança) (PUI *et al.*, 2004).

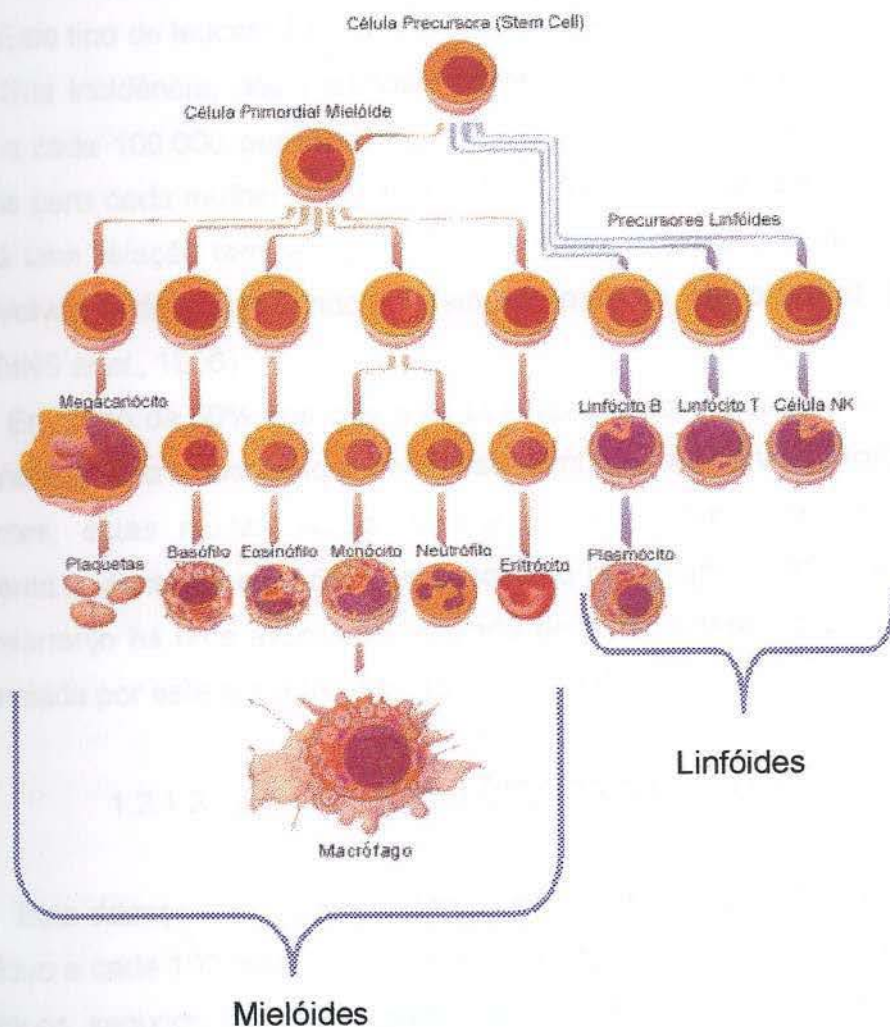
### **1.2. CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS**

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).

A figura 3 apresenta uma representação da hematopoiese e a origem das diferentes leucemias, conforme o tipo celular acometido.



**Figura 03.** Hematopoiese e origem das Leucemias Mielóides e Leucemias Linfóides  
Modificado de INCA, 2004.

### 1.2.1 LEUCEMIA CRÔNICA

Nesta doença, as células leucêmicas afetadas apresentam anomalias genéticas e grau de desenvolvimento indiferenciado. Sua progressão é lenta,

porém, seguida de uma fase mais acelerada. Conforme o tecido afetado, pode ser classificada em:

#### 1.2.1.1. LEUCEMIA LINFÓIDE CRÔNICA (LLC)

Este tipo de leucemia tem a maioria dos pacientes afetados com mais de 60 anos. Sua incidência, nos Estados Unidos, em pessoas com 80 anos é de 20 casos a cada 100.000 pessoas. Há uma ocorrência maior nos homens, sendo 2 homens para cada mulher. Apesar de não serem conhecidas as causas, sabe-se que há uma relação familiar, ocasionando aumento de 2 a 4 vezes no risco de desenvolver a doença quando se tem um parente em primeiro grau afetado. (ROBBINS *et al.*, 1996).

Em torno de 50% dos casos de LLC apresenta a trissomia do cromossomo 12. Anomalias cromossômicas múltiplas também são encontradas em alguns pacientes, estas muitas vezes envolvem os cromossomos 11 e 14. Outra patogenia encontrada em 15% dos casos é o rearranjo do oncogene *bcl-2*. Com este rearranjo há uma expressão elevada de *bcl-2*, alterando a via de apoptose influenciada por este gene (ROBBINS *et al.*, 1996).

#### 1.2.1.2. LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC)

Esta doença tem maior incidência em adultos de 25 a 60 anos, atingindo 1 indivíduo a cada 100.000 pessoas. Em crianças, ocorre 1 caso a cada 1 milhão de indivíduos, segundo dados divulgados pelo INCA. A incidência da doença é maior em homens do que em mulheres, sendo observada a proporção de 1,7 casos masculinos para cada caso feminino (ROBBINS *et al.*, 1996).

Nos estudos da leucemia mielóide crônica foi encontrado o primeiro marcador genético relacionado com o desenvolvimento de neoplasias, o cromossomo *Philadelphia* ( $Ph^1$ ),  $t(9;22)(q34;q11)$ , envolvendo os genes *abl* e *bcr*. Esta translocação, que está presente em 90% dos casos, causa a ativação do oncogene *abl*, resultando na atividade constitutiva de uma tirosina quinase (ROBBINS *et al.*, 1996).

## 1.2.2 LEUCEMIAS AGUDAS

São doenças progressivas, agressivas onde as células afetadas não estão completamente diferenciadas, ou seja, ainda são consideradas blastos. Estas células não conseguem desempenhar corretamente sua função e suprimem as primordiais normais. Isto resulta em um baixo nível de eritrócitos, leucócitos e plaquetas normais. O tipo de leucemia mais freqüente na criança é a leucemia linfóide aguda (ou linfoblástica). A leucemia mielóide aguda é mais freqüente no adulto. Conforme a célula de origem, podem ser classificadas em:

### 1.2.2.1. 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 freqüência maior do aparecimento da doença ocorre aproximadamente aos 4 anos de idade (ROBBINS *et al.*, 1996, WIEMELS *et al.*, 2001; CANALLE *et al.*, 2004).

Aproximadamente de 60% dos casos a LLA estão associados a alterações cromossômicas como: hiperploidia (51 a 60 cromossomos); presença do cromossomo *Philadelphia*(Ph<sup>1</sup>); 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).

Atualmente, mais de 70% das crianças com este tipo de doença têm possibilidade de cura, assim como cerca de 50% dos adultos jovens. (INCA, 2004).

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 também poderia influenciar na iniciação da doença na criança. Os estágios de *Promoção* e *Progressão* para LLA devem ocorrer após o nascimento. Savitz e 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 útero" a radiação ionizante, tem sido bem descrita como fator de risco para LLA infantil. As evidências maiores vêm de trabalhos com sobreviventes da bomba atômica e com mulheres expostas a Raios-X.

As revisões de Savitz e Chen (1990) e Shu *et al.* (1999) salientam trabalhos demonstrando que exposição materna a hidrocarbonetos, solventes e outros compostos aumentam o risco de Leucemias Agudas 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).

#### 1.2.2.2. 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 a fusão dos genes do  $\alpha$ -receptor (*RAR  $\alpha$* ) 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).

### 1.3. 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, baseado 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 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 (CYP's) que são enzimas oxidativas. Os CYP's 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 glutationa-S-transferase (GSTs).

### 1.3.1 POLIMORFISMOS EM GENES DA FAMÍLIA DO CITOCROMO P540

As enzimas da superfamília dos CYPs estão envolvidas na metabolização da maioria dos xenobióticos, além de também atuarem sobre substâncias endógenas como os esteróides, ácidos graxos e vitaminas lipossolúveis (OMURA, 1999; ANZENBACHER & ANZEBACHEROVA, 2001).

Os CYPs são importantes na individualidade das espécies, visto que mesmo espécies evolutivamente bastante próximas não apresentam genes idênticos. No genoma humano já foram identificados 58 genes desta superfamília, subdivididos em 10 famílias gênicas. Entre estas, as mais estudadas são as famílias *CYP1* e *CYP2*, que participam do metabolismo de muitos procarcinógenos, promutagenos e drogas (GASPAR, 2003).

Os genes *CYPs* podem ser regulados (induzidos) por fatores ambientais e suas atividades podem variar de acordo com as condições ambientais. Um exemplo é a expressão do gene *CYP1A1*, que induzido fortemente no fígado, pulmão e outros tecidos por compostos polihalogenados, PAH, como o benzo (a) pireno e o 3-metilcloranteno (PELKONEN & RAUNIO, 1995). Outros exemplos de indutores destas enzimas são os hidrocarbonetos da fumaça do tabaco, já que os fumantes têm biotransformação maior de muitas drogas do que os não fumantes. O álcool também parece agir como indutor para *CYPs* (KALANT, 1991).

Muitos estudos mostram que polimorfismos nos genes desta família podem estar relacionados com a suscetibilidade para o desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres. Park *et al.* (1997) mostrou que polimorfismo no gene *CYP1A1* parece estar associado ao risco de câncer de boca, enquanto que Kato *et al.* (1992) demonstrou uma associação destes polimorfismos com desenvolvimento de câncer de pulmão. Já o gene *CYP2E1* já foi associado a suscetibilidade a diferentes doenças neoplásicas, como câncer de mama e de esôfago (SHIELDS *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 1998).

### 1.3.2. SUPERFAMÍLIA DAS GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GSTs)

As glutations-S-transferases 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 uma proteção tecidual na exposição a carcinogênicos, como também causa uma resistência a agentes quimioterápicos. (WILKINSON & CLAPPER, 1997).

Em humanos, já foram identificadas 5 diferentes classes de GSTs: GST $\alpha$  (GSTA1, A2, A3, A4) GST $\mu$ (GSTM1, M2, M3, M4 e M5), GST $\theta$ (GSTT1 e T2), GST $\pi$  (GSTT1) e GST $\xi$  (MILLER *et al.*, 1997; STRANGE *et al.*, 1998). Os genes GSTM1, localizado no cromossomo 1p13.1, e GSTT1, localizado 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). Na população geral são encontrados entre 10 e 60% de indivíduos com ausência destes genes (genótipo nulo), variando conforme os diferentes grupos étnicos (PEMBLE *et al.*, 1994; WARWICK *et al.*, 1994; ARRUDA *et al.*, 1998; HENGSTLER *et al.*, 1998). A tabela 01 apresenta a variação nas freqüências de GSTM1 e GSTT1 em diferentes populações. (GASPAR, 2003).

**Tabela 01.** Freqüências dos polimorfismos de GSTM1 e GSTT1 para diferentes populações, mostrando as diferenças étnicas.

Polimorfismo	Freqüência (%)	População
GSTM1 nulo	64-100	Micronésia, Melanésia
	58	China
	48	Japão
	38-62	Caucasóides (Europa, EUA)
	28-35	Afro-Americanos (EUA)
	22	Nigéria (África)
GSTT1 nulo	45	Japão
	58-62	China
	12-25	Caucasóides (Europa, EUA)
	24	Afro-Americanos (EUA)
	38	Nigéria (África)

No Rio Grande do Sul, os genótipos nulos para GSTM1 e GSTT1 apresentam freqüências diferentes quando comparamos Euro-brasileiros e Afro-brasileiros. (GASPAR *et al.*, 2004; KVITKO *et al.*, 2004). A tabela 02 apresenta estas freqüências.

**Tabela 02.** Freqüências dos genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1*, nas populações de Euro-brasileiros e Afro-brasileiros no Rio Grande do Sul, segundo dados de Gaspar *et al.*, 2004 e 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)

O único locus da classe  $GST\pi$ , *GSTP1*, está localizado no cromossomo 11q3 (SMITH *et al.*, 1995), que apresenta diferentes polimorfismos funcionais, como são os casos da transição de uma A com uma G na posição 1578, que causa substituição no códon 105 de uma Ile para uma Val e da mudança de base de C para T na posição 2293, que leva a troca aminoácido na posição 114 (Ala – Val). Tais variantes afetam a atividade catalítica e a estabilidade térmica da enzima.

Estudos mostram que as enzimas *GSTM1* e *GSTP1* são responsáveis pela detoxificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como benzeno, enquanto que *GSTT1* detoxifica pequenos hidrocarbonetos reativos, como o óxido de etileno (STRANGE *et al.*, 1999).

#### 1.4. OBJETIVOS

A exposição ambiental a diferentes agentes biológicos, como vírus; físicos, tais como as radiações ionizantes; e químicos, a exemplo dos solventes, pode estar influenciando no desenvolvimento de leucemias. As diferenças individuais quanto à capacidade de ativar e detoxificar estes agentes está relacionada aos polimorfismos nas enzimas de metabolização, como as GSTs. Este trabalho tem como objetivo analisar a freqüência dos polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes que desenvolveram LLA e LMA para verificar se estes polimorfismos estão colaborando com a suscetibilidade para o desenvolvimento da doença em nossa mostra.



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Um banco de DNA foi estabelecido em nosso laboratório com amostras de pacientes com leucemia encaminhados pelo Dr. Giorgio Paskulin, da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA).

Todos os pacientes foram classificados como Euro-Brasileiros.

A amostra consiste em 87 pacientes sendo os casos 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 quando comparados pacientes masculinos e femininos.

A idade destes pacientes variou entre 6 meses e 63 anos, para LLA, sendo a média de  $15,64 \pm 17,16$  anos, e entre 6 e 80 anos para LMA, sendo a idade média de  $34,75 \pm 20,93$  anos. Os casos sem linhagem classificada (LAS) a idade variou entre 7 meses e 71 anos, sendo a média de 27,73 anos.

Como grupo controle foram usadas as freqüências dos genótipos já descritas para população Euro-Brasileira do Rio Grande do Sul (Gaspar *et al.*, 2004).

### 2.2. 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*, *GSTP1* em um protocolo de PCR multiplex desenvolvido anteriormente, porém com modificações (GASPAR *et al.*, 2004). A tabela 03 apresenta os tamanhos de fragmentos e as seqüências dos *primers* utilizados. O gene *GSTP1* foi usado como controle de amplificação, visto

que ambos genes analisados (*GSTM1* e *GSTT1*) apresentam polimorfismos de ausência e presença.

**Tabela 03.** As seqüências do *primers* utilizados para a PCR e os tamanhos dos fragmentos amplificados

<b>Gene</b>	<b>Tamanho do fragmento</b>	<b>Primer</b>	<b>Seqüência (5'→3')</b>
<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

A reação de amplificação multiplex utilizada foi a seguinte:

- DNA: 100 ng
- Primers: 15pmol de cada
- dNTPs: 10mM
- tampão de Taq Polimerase 10X: 5 µl
- MgCl<sub>2</sub>: 4,5mM
- Taq DNA polimerase: 1 U
- Água bidestilada para o volume final de 50 µl

O programa de amplificação usado foi:

- 95°C por 5 minutos iniciais;
- 6 ciclos de:
  - 1 minuto de desnaturação a 94°C,
  - 2 minutos de anelamento, onde a temperatura varia de 59°C a 54°C, reduzindo 1°C a cada ciclo,
  - 1 minuto de polimerização a 72°C;
- 35 ciclos com:
  - 1 minuto de desnaturação a 94°C,
  - 1 minuto de anelamento a 55°C
  - 55 segundos de polimerização a 72°C
- 5 minutos a 72°C.

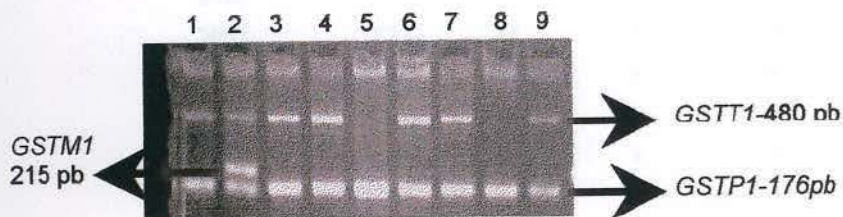
Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo.

### **2.3. 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).

### 3. RESULTADOS

A figura 04 apresenta um gel de agarose 3% com os produtos amplificados referentes aos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*.



**Figura 04.** Gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo

Pacientes 1,3,4,6,7,9 : *GSTT* +/ *GSTM* -

Paciente 2: *GSTT* +/*GSTM*+

Pacientes 5 e 8: *GSTT* -/*GSTM*-

A tabela 04 apresenta os resultados por paciente, com LLA quanto aos genótipos *GSTM1* e *GSTT1*; a tabela 05 apresenta os resultados para os pacientes com LMA e a tabela 06 apresenta os resultados para os pacientes com LAS.

**Tabela 04.** Idade, sexo e genótipos (*GSTM1* e *GSTT1*) dos pacientes com LLA.

REGISTRO	IDADE	SEXO	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>
3474	25	M	+	+
3490	1	M	+	-
3496	46	M	-	+
3498	63	M	+	+
3501	13	M	-	+
3536	5	M	-	+
3537	12	M	+	-
3595	ND	F	+	-
3660	1a3m	M	-	+
3663	ND	M	+	+
3678	19	M	+	+
3689	48	F	+	-
3690	16	M	+	-
3699	2	M	+	-
3724	6	M	+	-
3762	29	M	+	+
3770	ND	F	+	+
3782	62	M	+	+
3810	1a3m	M	-	+
3815	7	F	+	-
3829	11	F	-	+
3830	10m	F	+	-
3834	19	M	+	-
3842	10	M	-	-
3863	10	M	-	-
3906	3	M	-	-
3915	13	M	-	+
3957	1a8m	F	-	-
3960	4	M	+	-
3974	8	M	-	-
3981	24	M	-	+
3994	9	F	-	+
3997	6m	M	+	+
4005	6		-	+
4009	24	F	+	-

ND. Não disponível; + genótipo com presença; - genótipo nulo.

**Tabela 05.** Idade, sexo e genótipos (*GSTM1* e *GSTT1*) dos pacientes com LMA.

REGISTRO	IDADE	SEXO	GSTM1	GSTT1
3478	13	M	-	+
3511	8	F	-	+
3532	14	F	-	+
3604	20	F	+	-
3639	56	M	+	-
3652	53	F	-	-
3685	67	F	-	+
3686	18	M	-	+
3691	24	F	+	+
3701	27	F	-	+
3744	80	M	+	+
3746	41	F	-	+
3753	7	F	-	+
3766	55	M	-	-
3767	33	F	-	+
3784	53	F	-	+
3794	19	F	-	-
3805	49	M	+	+
3818	60	M	+	-
3828	44	M	-	+
3849	42	F	+	+
3876	21	M	+	+
3903	24	M	-	+
3941	6	F	-	-

ND. Não disponível; + genótipo com presença; - genótipo nulo.

**Tabela 06.** Idade, sexo e genótipos (*GSTM1* e *GSTT1*) dos pacientes com LAS.

REGISTRO	IDADE	SEXO	GSTM1	GSTT1
3344	35	M	+	-
3358	52	M	-	-
3491	6	F	-	-
3495	6	F	-	+
3528	1	M	+	+
3575	ND	M	+	-
3641	14	M	+	+
3644	3	M	+	+
3665	7m	M	-	+
3683	10	M	-	+
3692	8	M	-	+
3747	ND	M	-	+
3749	45	F	+	+
3752	ND	F	-	+
3764	9m	M	+	-
3795	12	M	-	-
3797	ND	M	+	+
3799	21	F	-	+
3816	49	F	+	+
3820	71	M	-	-
3822	70	F	+	+
3831	4	M	+	-
3832	64	M	+	-
3854	ND	F	+	+
3942	ND	F	+	+
3967	ND	F	-	-
3971	49	M	-	-
3989	61	F	+	+

ND. Não disponível; + genótipo com presença; - genótipo nulo.

A tabela 07 apresenta os resultados das freqüências dos genótipos nulos relacionados aos genes *GSTM1* e *GSTT1*, na amostra dos 87 pacientes que desenvolveram Leucemia Aguda, sem considerar a linhagem celular, comparadas com a população de Euro-brasileiros do Rio Grande do Sul.

**Tabela 07.** Freqüências dos polimorfismos nulos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, para a população controle de Euro-brasileiros e a amostra de pacientes com Leucemia Aguda.

<b>Genótipo</b>	<b>Euro- brasileiros</b>	<b>Pacientes</b>
<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

A tabela 08 apresenta os resultados quanto às freqüências dos genótipos nulos dos genes estudados nos pacientes por classificação quanto a linhagem celular. O valor de P refere-se à comparação com as freqüências das amostras controles.

**Tabela 08.** Freqüências dos genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1*, nas amostras de LLA, LMA e LAS (sem classificação especificada) e do grupo controle.

<b>Pacientes/Controle</b>	<b><i>GSTM1</i> nulo</b>	<b><i>GSTT1</i> nulo</b>
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.



## 4. DISCUSSÃO

Muitos mecanismos estão envolvidos na proteção aos danos celulares causados por xenobióticos. Entre estes mecanismos podemos citar a variabilidade populacional quanto às freqüências dos polimorfismos nos genes de detoxificação/metabolizações. A família das enzimas GSTs está envolvida no metabolismo de muitos xenobióticos tendo seus níveis induzidos pela exposição à substâncias externas; esta indução sugere que estas enzimas fazem parte de um sistema adaptativo ao *stress* 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 freqüência 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 em danos de DNA induzidos quimicamente e a aductos de DNA (LIU *et al.*, 1991; VAN POPPEL *et al.*, 1992; SHIELDS *et al.*, 1993; SCARPATO, 1997; EMMEL, 2003). Já foram detectadas as presenças das proteínas *GSTT1* e *GSTM1* na medula óssea de pacientes de neuroblastoma. Estas observações podem ser consideradas 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 Leucemias Agudas 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 que desenvolveram LA, do Reino Unido. Entretanto, o estudo de Canalle *et al.* (2004), não encontrou associação entre o genótipo nulo *GSTT1* e outros genes de metabolização em Leucemia Linfoblástica aguda. Neste trabalho, foi estudada uma amostra de pacientes leucêmicos 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.* (2000) estudando uma amostra de pacientes com LLC, não encontraram diferenças nas freqüências dos genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1*, porém, avaliando as freqüências genótípicas para *GSTP1*, observaram que as freqüências 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) onde é demonstrado que alterações genéticas são diferentes quando comparadas 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.

## 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSCHER, P. O. *et al.* (2003). *Journal of Clinical Investigation*, 111, 111-118.

APRILIO, V. R.; GRIGI, P. *et al.* (2004). *Journal of Clinical Investigation*, 114, 111-118.

MERZES, R. *et al.* (2005). *Journal of Clinical Investigation*, 115, 111-118.

## 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram analisadas as prevalências dos genótipos nulos *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes que desenvolveram Leucemias Agudas. Os resultados do nosso trabalho sugerem que o gene *GSTT1* parece estar envolvido com a suscetibilidade para desenvolvimento de LA em nossa amostra.

aplicações de biotecnologia em medicina e saúde pública, especialmente em áreas relacionadas à genética e farmacogenética.

GRIGI, P. *et al.* (2004). *Journal of Clinical Investigation*, 114, 111-118.

ANDERSCHER, P. O. *et al.* (2003). *Journal of Clinical Investigation*, 111, 111-118.

APRILIO, V. R.; GRIGI, P. *et al.* (2004). *Journal of Clinical Investigation*, 114, 111-118.

MERZES, R. *et al.* (2005). *Journal of Clinical Investigation*, 115, 111-118.

ANDERSCHER, P. O. *et al.* (2003). *Journal of Clinical Investigation*, 111, 111-118.

APRILIO, V. R.; GRIGI, P. *et al.* (2004). *Journal of Clinical Investigation*, 114, 111-118.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANZENBACHER, P.; ANZEBACHEROVA, E. Cytocromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 58:737-747, 2001.
- 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 Genetic* 54: 210-214, 1998.
- EMMEL, V. Fatores genéticos na resposta a exposição ocupacional de agricultores a agrotóxicos. 2003. 64p. Monografia (Conclusão do curso de graduação em Farmácia). Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- GASPAR, P A. Genes de suscetibilidade. In: Silva, J; Erdtmann, B; Henriques, J P A (organizadores) *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Ed. Alcance, 2003.
- GASPAR, P; MOREIRA, J; KVIKTO, K; TORRES, M; MOREIRA, A; WEIMER. *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, 2004.
- HALL, A. G.; MCGUCHIN, A. G.; PEARSON, A. D. J.; CATTAN, A. R.; MALCOLM, A. J.; REID, M. M. Glutathione S-transferase in bone marrow metastasis of disseminated neuroblastoma. *J Clin Pathol* 47: 468-469, 1994.
- HENGSTLER, J. G.; ARAND, M.; HERRERO, M. E.; OESCH, F. Polymorphism of N-acetyltransferases, glutathione S-transferase, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. *Recent Results Cancer Res*, 1998.

- INCA. Seção de oncologia pediátrica. Disponível em [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=161](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=161) Acesso em 10 jul.2004.
- KALANT, H. Biotransformação de drogas. In: *Princípios de Farmacologia Médica*, 30-40, 1991.
- KATO, S.; SHIELDS, P. G.; CAPOROSO, N. E.; HOOVER, R. N.; TRUMP, B. F.; SUGIMURA, H.; WESTON, A.; HARRIS, C. C. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res* 52: 6712-6715, 1992.
- KVITKO, K; GASPARG, P. A.; TORRES, M.R.; WEIMER, T.A.; HUTZ, M. H. *CYP1A1, GSTM1, GSTP1* and *GSTT1* polymorphisms in an Afro-brazilian group. *Ann of Human Biology*, submetido, 2004.
- LAHIRI, D. K.; NURNBERG Jr., J.I. A rapid non-enzimatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 19: 5444, 1991.
- LIN, D. X.; TANG, Y. M.; PENG, Q.; LU, S. X.; AMBROSONE, C. B.; KADLUBAR, F. F. Susceptibility to esophageal cancer and genetic polymorphisms in glutathione S-transferase T1, P1 and M1 and cytochrome P4502E1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 1013-1018, 1998.
- LIU, Y. H.; TAYLOR, J.; LINKO, P.; LUCIER, G. W.; THOMPSON, C. L. Glutathione S-transferase  $\mu$  in human lymphocyte and liver: role in modulating formation of carcinogen-derived DNA adducts. *Carcinogenesis* 12: 2269-2275, 1991.
- MILLER, M. S.; McCARVER., D. G.; BELL, D. A.; EATON, D. L.; GOLDSTEIN, J. A. Genetic polymorphism in human drug metabolic enzymes. *Fundam Appl Toxicol* 40: 1-14, 1997.
- 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. 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, 1995.
- OMURA, T. Forty years of cytochromes P450. *Biochem Biophys Res Commun* 266:690-698, 1999.
- PARK, J. Y.; MUSCAT, J. E.; REN, Q.; SCHANTZ, S. P.; HARWICK, R. D.; STERN, J. C.; PIKE, V.; RICHIE, J. P.; LAZARUS, P. *CYP1A1* and *GSTM1* polymorphisms and oral cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6: 791-797, 1997.
- PEARSON, R. L.; WACHTEL, H.; EBI, K. L. 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, 2000.
- PELKONEN, O.; RAUNIO, H. Individual expression of carcinogen-metabolizing enzymes: cytochrome P4502A. *Journal of Occupational and Environ Med* 37(1): 19-23, 1995.
- PEMBLE, S.; SCHROEDER, K. R.; SPENCE, S. R.; MEYER, D. J.; HALLIER, E.; BOLT, H. M.; KETTERER, B.; TAYLOR, J. B. Human glutathione S-transferase theta(*GSTT1*): cDNA cloning and characterization of genetic polymorphism. *Biochem J* 300:271-276, 1994.
- PUI, C-H.; RELING, M. V.; DOWNING, J. R. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J of Med* 350: 1535-1548, 2004.
- RAASCHOU-NIELSON, O.; HERTEL, O.; THOMSEN, B. L.; OLSEN, J. H. Air pollution from traffic at the residence of children with cancer. *American Journal of Epidemiology*, 153(5), 433-443, 2001.
- REYNOLDS, P.; ELKIN, E.; SCALF, R.; VON BEHREN, J.; NEUTRA, R. R. A case-control pilot study of traffic exposures and early childhood

- leukemia using a geographic information system. *Bioelectromagnetics*, Supplement 5, S58-S68, 2001.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. Fundamentos de Patologia: Estrutural e funcional. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996. 780p.
- ROLLINSON, S.; RODDAM, P.; KANE, E.; ROMAN, E.; CARTWRIGHT, R.; JACK, A.; MORGAN, G. J. Polymorphism variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukemia. *Carcinogenesis* 21, 43-47, 2000.
- SAVITZ, D. A.; CHEN, J. Parental occupation and childhood cancer: review of epidemiologic Studies. *Environmental Health Perspectives*, 88, 325-337, 1990.
- SCARPATO, R.; HIRVONEN, A.; MIGLIORE, L.; FALCK, G; NORPPA, H. Influence of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms on the frequency of chromosome aberrations in smokers and pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat Res* 389: 227-235, 1997.
- SHIELDS, P. G.; BOWMAN, E. D.; HARRINGTON, A. M.; DOAN, V. T.; WESTON, A. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes. *Cancer Res* 53: 3486-3492, 1993.
- SHIELDS, P. G.; AMBROSONE, C. B.; GRAHAM, S.; BOWMAN, E. D.; HARRINGTON, A. M.; GILLENWATER, K. A.; MARSHALL, J. R.; VENA, J. E.; LAUGHLIN, R.; NEMOTO, T.; FREUDENHEIM, J. L. A cytochrome P450E1 genetic polymorphisms and tabaacco smoking in breast cancer. *Mol Carninog* 17: 144-150, 1996.
- SHU, X. O.; STEWART, P.; WEN, W-Q.; HAN, D.; POTTER, J. D.; BUCKLEY, J. D.; HEINEMAN, E.; ROBISON L. L. Parental occupational exposure to hydrocarbons and risk of acute lymphocytic leukaemia in offspring. *Cancer Epidemiology, Biomarkers; Prevention*, 8: 783-791, 1999.
- SPRENGER, R.; SCHLAGENHAUFER, R.; KERB, R.; BRUHN, C.; BROCKMOLLER, J.; ROOTS, I.; BRINKMANN, U. 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, 2000.
- STRANGE, R. C.; LEAR, J. T.; FRYER, A. A. Glutathione S-transferase polymorphisms: influence on susceptibility to cancer. *Chem Biol Interact* 111-112: 351-364, 1998.
- STRANGE, R. C.; FRYER, A. A. The glutathione S-transferase: influence of polymorphisms on cancer susceptibility. In: Vineis, P., Malatus, N; Lang, M.; *et al.* 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. 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, 1995.
- VAN POPPEL, G.; VOGEL, N.; VAN BALDEREN; KOK, FJ Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme  $\mu$ . *Carcinogenesis* 13: 303-305, 1992.
- WARWICK, A.; SARHANIS, P.; REDMAN, C.; PEMBLE, S.; TAYLOR, J. B.; KETTERER, B.; JONES, P.; ALLDERSEA, J.; GILFORD, J.; YENGI, L. Theta class glutathione S-transferase *GSTT1* genotypes and susceptibility to cervical neoplasia: interactions with *GSTM1*, *CYP2E1* and smoking. *Carcinogenesis* 16: 1243-1245, 1994.
- XU, S.; WANG, Y.; ROE, B.; PEARSON, W. R. Characterization of human class mu glutathione S-transferase gene cluster and the *GSTM1* deletion. *J Biol Chem* 273: 3517-3527, 1998.
- YUILLE, M.; CONDIE, A.; HUDSON, C.; KOTE-JARAI, Z.; STONE, E.; EELES, R.; MATUTES, E.; CATOVSKY, D.; HOUSLTON, R. Relationship between glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99: 4216-4218, 2002.