

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Monografia de Graduação

**Polimorfismos da Glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*),
T1(*GSTT1*) e P1 (*GSTP1*) em grupos étnicos Brasileiros**

Luiz Alexandre Viana Magno

Orientador:

Prof. Dr. Giuliano Di Pietro

Co- orientadores:

Prof. Dr. Fabrício Rios-Santos

Prof. MS.c Paulo Santana de Melo

Ilhéus, 2009

Luiz Alexandre Viana Magno

**Polimorfismos da Glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*),
T1(*GSTT1*) e P1 (*GSTP1*) em grupos étnicos Brasileiros**

Monografia apresentada para a obtenção
do título de Bacharel em Biomedicina pelo
Departamento de Ciências Biológicas da
Universidade Estadual de Santa Cruz.

Data: 14 de Janeiro de 2009

Resultado: _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Giuliano Di Pietro - Universidade Estadual de Santa Cruz.

Assinatura _____

Prof. Dr. Fabrício Rios-Santos - Universidade Estadual de Santa Cruz.

Assinatura _____

Prof. MS.c Paulo Santana de Melo - Universidade Estadual de Santa Cruz.

Assinatura _____

Autores e desenvolvimento da pesquisa

Esta monografia foi desenvolvida no Centro de Hemoterapia do Hospital São José de Ilhéus e nos Laboratórios de Farmacogenômica e Epidemiologia Molecular (LAFEM) e de Genética e Biologia Molecular (LGBM) da Universidade Estadual de Santa Cruz sob a orientação dos professores Dr. Giuliano Di Pietro, Dr. Fabrício Rios-Santos e MS.c Paulo Roberto Santana de Melo.

Agências Financiadoras

FAPESB, UESC e CNPq

Autorizo a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte, sendo expressamente vedado qualquer tipo de reprodução para fins comerciais sem prévia autorização específica do autor.

Magno, Luiz Alexandre Viana

Polimorfismos da Glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*), T1(*GSTT1*) e P1 (*GSTP1*) em grupos étnicos Brasileiros. Luiz Alexandre Viana Magno; orientador: Giuliano Di Pietro – Ilhéus, Bahia

Monografia de conclusão do curso de Bacharel em Biomedicina - Universidade Estadual de Santa Cruz.

Agradecimientos

Existem muitas pessoas a quem quero agradecer por terem me ajudado tanto na minha formação pessoal, acadêmica e na elaboração dos experimentos.

Primeiramente, minha família, por proporcionar e acreditar em minha persistência, empenho e dedicação. Minha mãe, como “fé”, e meu pai como “coragem”.

Ao Pietro e ao Fabrício que me receberam no laboratório em 2006, iniciando-me na carreira científica. Sempre foram, além de orientadores, amigos que tentaram me ajudar da maneira melhor possível. Agradeço por todos ensinamentos, discussões, descobertas, liberdades e iniciativa que vocês me propiciaram.

À tio Ró, Alline e Silvinho pela convivência maravilhosa.

Ao tio Pelé, por acreditar e não estar presente hoje para viver este sonho.

Ao Jhimmy, velho companheiro de bancada, quem consegue acreditar em minhas loucuras científicas mesmo durante “madrugas” pelo Skype.

A todos os amigos do LAFEM que conviveram comigo. Especialmente ao Marcus, Jhimmy, Teddy, Fabrício e minha “afilhada mais linda do mundo”, Cinthia. Agradeço pelo esforço semanal do Journal Club, pelos dias divertidos em congressos e pelas discussões criativas sobre experimentos.

À FAPESB, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica

Mensagens e Dedicatória

“Há muitas razões para duvidar e uma só para crer”

Carlos Drummond de Andrade

“Para evitar críticas, não faça nada, não diga nada, não seja nada.”

Elbert Hubbard

“Em tamanha convulsão socio-patriótica, Lula começara a esquecer da máquina de fabricar linha. Um novo sonho crescia dentro de si.”

Luiz Magno, no conto *Fábrica de Linhas*

“No dia que pensarmos em mudança, este será o dia mais importante de nossas vidas, mudando ou não.”

Alexandre Magno

Aos meus pais, Luiz e Joana

Abreviações

CYP450: Citocromo P450 (proteína)

DNA: Ácido desoxirribonucléico

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

H₂O: Água

Ile: Isoleucina

GST: Glutathione S-transferase

GSTM1: Glutathione S-transferase M1 (proteína)

GSTM1- : Glutathione S-transferase M1 (gene nulo)

GSTM1+: Glutathione S-transferase M1 (gene não nulo)

GSTM2: Glutathione S-transferase M2 (gene)

GSTM3: Glutathione S-transferase M3 (gene)

GSTM4: Glutathione S-transferase M4 (gene)

GSTM5: Glutathione S-transferase M5 (gene)

GSTT1: Glutathione S-transferase T1 (proteína)

GSTT1- : Glutathione S-transferase T1 (gene nulo)

GSTT1+: Glutathione S-transferase T1 (gene não nulo)

GSTP1: Glutathione S-transferase P1 (proteína)

GSTP1: Glutathione S-transferase P1 (gene)

GSTP1*B: Variante mutada do gene *GSTP1* no códon 105 (substituição por valina)

GSH: Glutathione (-glutamil-cisteína-glicina)

GPx: Glutathione peroxidase

PAH: Hidrocarboneto Policíclico Aromático

ROS: Espécie Reativa de Oxigênio

Se: Selênio

Val: Valina

Índice

Tópicos

1. Resumo.....	13
2. Abstract.....	15
3. Introdução.....	17
3.1. As Glutathionas S-transferases.....	18
3.2. Variabilidade Genética no Metabolismo de Xenobióticos.....	20
3.3. Polimorfismos genéticos da GST.....	25
3.3.1. <i>GSTM1</i>	26
3.3.2. <i>GSTT1</i>	28
3.3.3. <i>GSTP1</i>	30
3.4. Grandes Grupos Étnicos Brasileiros.....	31
4. Objetivos.....	36
5. Justificativa e Relevância.....	38
6. Manuscrito.....	40
7. Conclusão.....	50
8. Referências bibliográficas.....	52
9. Apêndice.....	60

Figuras

Fig. 1- Esquema de catálise das GSTs.

Fig. 2- Estrutura básica tridimensional das Glutathionas S-transferases.

Fig. 3- Esquema da biotransformação de xenobióticos até a excreção.

Fig. 4- Mecanismos de inativação/ativação de xenobióticos.

Fig. 5- Representação esquemática de diferentes mecanismos moleculares de polimorfismos de enzimas metabolizadoras.

Fig. 6- Localização de genes da família GST classe *mu* e deleção completa do gene *GSTM1*.

Fig. 7- Localização de genes da família GST classe *theta* e deleção completa do gene *GSTT1*.

Fig. 8 – Principais povos Indígenas no Brasil na época do descobrimento.

Fig. 9- Principais rotas e portos de transporte de escravos Africanos para o Brasil.

1. Resumen

Variações que afetam a expressão de genes ou funções de proteínas têm despertado o interesse de estudos moleculares humanos. Dentre os sistemas enzimáticos passíveis dessas alterações, está o da Glutathione S-transferase (GST), uma família de proteínas solúveis envolvidas na modificação de vários agentes xenobióticos e compostos eletrofílicos. Recentes estudos farmacogenômicos revelaram significativas diferenças inter-étnicas na frequência alélica de polimorfismos dos genes que codificam esta família de enzimas. Nós propusemos investigar a frequência dos polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* (alelos nulos) e *GSTP1* (A1578G) em 203 indivíduos de três diferentes etnias (Ameríndios, Euro-descendentes e Afrodescendentes) na região sudeste da Bahia. A identificação destes polimorfismos foi feita através de PCR multiplex e PCR-RFLP. A frequência do polimorfismo *GSTM1*- na população de estudo foi de 33,2%, enquanto para *GSTT1*-, com 30,2%, configura o mais alto percentual de ausência desta variante no Brasil. Para estas duas variantes (*GSTM1*- e *GSTT1*-) não foi possível encontrar diferenças estatísticas significantes na distribuição de suas respectivas frequências entre os três grupos étnicos estudados. A variante A1785G do gene *GSTP1* (rs1695), apresentou a maior frequência alélica do Brasil (35,1%), sendo entre os genótipos, o heterozigoto (Ile/Val) o mais prevalente de todos (46,6%). Foi encontrada, com significância estatística, diferença na frequência alélica e genotípica desta variante entre Ameríndios com Euro-descendentes ($p = 0.016$) e Ameríndios com Afrodescendentes ($p = 0.033$). Em conclusão, considerável variação de frequências encontradas em nosso estudo, quando comparada com outros estudos do Brasil, mostra heterogeneidade filogeográfica dos genes estudados. Deste modo, estes dados sugerem que os parâmetros de inativação xenobiótica podem variar entre grupos étnicos.

2. Abstract

Variants that affect gene expression or protein function have become increasingly popular markers in human molecular genetics. These include the phase II Glutathione S-transferases (GSTs), which are a family of enzymes capable of multiple reactions with endogenous and xenobiotic substrates. Recent pharmacogenomic studies have revealed significant interethnic differences in allelic frequencies of GSTs among various ethnic groups and regions. We have therefore investigated the frequencies of the *GSTM1*, *GSTT1* (*null* alleles) and *GSTP1* (rs1695) polymorphisms in three different Brazilian ethnic groups (Amerindians, Caucasians and African-Americans). To verify the frequencies between these variants in this population, 203 individuals were genotyped by PCR multiplex and PCR-RFLP methods. Frequency of *GSTM1*- polymorphism was 33.2%, while the *GSTT1 null* (*GSTT1*-) with 30.2%, sets the highest percentage of absence of this gene in Brazil. For these two variants (*GSTM1*- and *GSTT1*-) unable to find statistical differences in the distribution of their respective frequencies between the three ethnic groups studied. The *GSTP1**B (rs1695) had the highest frequency of allelic Brazil (35.1%), while the heterozygous genotype (Ile/Val), the most prevalent of all (46.6%). We found a statistically significant difference when compared to its genotype frequency between Amerindians with Caucasians ($p = 0.016$) and Afro-Americans ($p= 0.033$). In conclusion, considerable variation of frequencies found in our study, when compared to other studies, shown a considerable heterogeneity phylogeographical to the genes studied. Thus, dates suggest that normal inactivation of xenobiotics parameters should be varied within a given ethnic group.

3. Introdução

3.1 As Glutonas S-transferases

A Glutona S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) faz parte de uma superfamília de proteínas catalíticas e ligantes, distribuídas em uma grande diversidade de organismos aeróbicos, de bactérias a humanos (FROVA, 2003) e são, geralmente, reconhecidas como enzimas de detoxificação, ou de fase II, devido à capacidade de catalisar a conjugação destes compostos com a glutona (KETTER 1988, MILLER et al. 1997, WILCE & PARKER 1994). As GSTs catalisam a reação do composto antioxidante não enzimático, o tripeptídeo glutona (GSH; -glutamil-cisteína-glicina) (Figura 1A) com um eletrófilo hidrofóbico, xenobiótico ou endógeno, os quais podem ser tóxicos e/ou carcinogênicos para o organismo (Figura 1B) (AMES et al., 1990; DIXON et al., 2002; MEISTER et al., 1983; SALINAS e WONG, 1999). Além disso, essa família de enzimas contém classes de enzimas responsáveis pela remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS), mais especificamente, catalisam a reação do H_2O_2 em $2H_2O$, sem a presença do Se (Selênio). Esta mesma reação é catalisada pela Glutona peroxidase (GPx; EC. 1.11.1.9) na presença do selênio (Se) (SHEEHAN et al., 2001).



Figura 1. A - tripeptídeo glutona (GSH; -glutamil-cisteína-glicina). B - Esquema da reação de conjugação da glutona catalisada pela GST com xenobióticos.

As GSTs foram primeiramente descobertas em animais em 1961 (BOOTH et al., 1961; COMBES e STAKELUM, 1961) como responsáveis pelo metabolismo de

desintoxicação de drogas (WILCE e PARKER, 1994). Nos diferentes organismos, outras funções da enzima GST já foram descritas, como a tolerância ao estresse oxidativo (KAMPRANIS et al., 2000); aos inseticidas (RANSON et al. 1997; TANG; TU, 1994) e antibióticos microbianos (ARCA et al.,1997); transporte de produtos secundários tóxicos (MUELLER et al., 2000); sinalização da célula durante as respostas ao estresse (LOYALL et al., 2000) e fenômenos de resistência envolvendo agentes de quimioterapia contra o câncer (McLELLAN e WOLF, 1999; TEW, 1994).

A GST é uma proteína solúvel, predominantemente citossólica, constituída de homodímeros ou heterodímeros de 50 KDa, com subunidades de 23 a 29 KDa (DIXON et al., 2002) (Figura 2). Cada subunidade da estrutura dimérica apresenta um sítio ativo com cinéticas independentes (DANIELSON e MANNERVIK, 1985). A enzima possui dois sítios de ligação: o sítio G, ou sítio ligante do tripeptídeo GSH, localizado no domínio N-terminal da proteína e o sítio H, ou o sítio ligante de um substrato eletrofílico hidrofóbico, localizado no C-terminal. O sítio G apresenta alta especificidade, sendo que apenas a GSH e moléculas estruturalmente relacionadas servem como substrato. O sítio H, ou sítio de ligação do substrato eletrofílico hidrofóbico é mais flexível que a observada no sítio G. Particularmente, nessa região ligam-se diferentes substratos, como xenobióticos (p.e. herbicidas) ou compostos tóxicos endógenos (p.e.H₂O₂) (NEUEFEIND et al., 1997; REINEMER et al., 1996). Apesar das subunidades serem, na estrutura geral da enzima, independentes cataliticamente, elas existem na sua maioria na forma dimérica (DIXON et al., 2002). A razão para este evento permanece ainda desconhecida. Aparentemente, a importância da forma dimérica consiste na manutenção da estabilidade dos dois domínios para cada subunidade da proteína (ARMSTRONG, 1997). Embora haja pouca similaridade nas seqüências de GSTs entre as diferentes classes, há uma conservação muito alta.

As GSTs são divididas em doze principais classes: Alpha, Mu, Pi, Omega (presentes em metazoários), Phi, Tau e Lambda (presentes nas plantas), Theta e Zeta (encontradas em plantas e metazoários), Sigma (Mollusca e mamíferos), Delta (insetos) e Beta (bactérias) (SHEEHAN et al., 2001). As estruturas tridimensionais destas classes foram determinadas excetuando-se a classe Lambda. De modo geral, todas as estruturas de GSTs são compostas por dois domínios, o N-terminal formado por três alfa-hélices e quatro folhas beta-pregueadas e o C-terminal formado somente por alfa-hélices (geralmente de quatro a cinco hélices) (Figura 2).

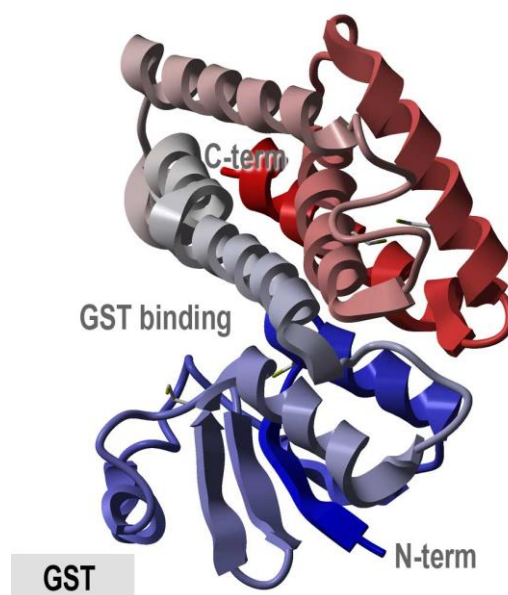


Figura 2. Estrutura básica tridimensional das Glutathione S-transferase. Esquema mostra extremidades C-terminais (C-term) N-terminal (N-term) e o sítio de ligação (GST binding).(disponível em <http://genomebiology.com>).

3.2 Variabilidade Genética no Metabolismo de Xenobióticos

Diariamente os organismos entram em contato com grande quantidade de substâncias químicas de diversas fontes ambientais – os xenobióticos (HASLER et al., 1999; LANG & PELKONEN, 1999). Muitos destes compostos são lipofílicos e podem se acumular no organismo atingindo concentrações tóxicas ou mesmo letais (LANG &

PELKONEN, 1999). O acúmulo e a toxicidade são evitados através de enzimas que os reconhecem e que os metabolizam a formas hidrofílicas que são facilmente eliminadas do organismo (HASLER et al., 1999, WILKINSON & CLAPPER, 1997).

Muitas enzimas evoluíram para detoxificação de compostos xenobióticos e a expressão gênica das mesmas é induzida em resposta à presença de determinado composto. Duas classes de enzimas participam deste processo, as de fase I (as enzimas de ativação) e as de fase II (as enzimas de detoxificação) (Figura 3).

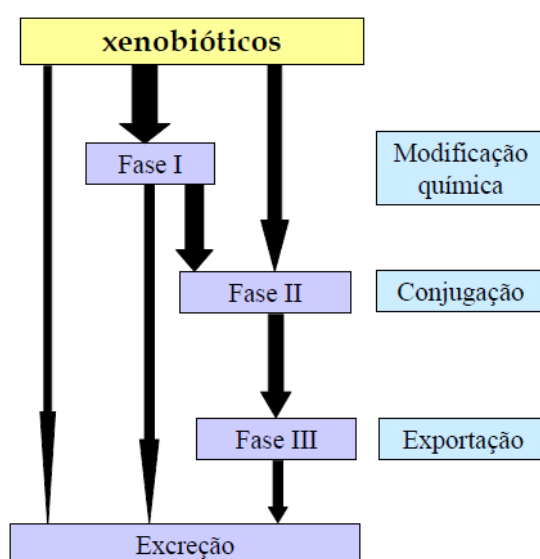


Figura 3. Esquema da biotransformação de xenobióticos até a excreção.

Grande parte dos pró-carcinógenos presentes no meio ambiente estão quimicamente inertes. Para tornarem-se metabólitos altamente reativos capazes de ligarem-se ao DNA e exibirem atividade carcinogênica, necessitam da ativação metabólica pelas enzimas oxidativas (de ativação) da fase I, que são principalmente enzimas da superfamília Citocromo P450 (CYP450). As CYP450 são as principais enzimas na ativação metabólica dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs), que são alguns dos principais carcinógenos encontrados no meio ambiente como poluentes, em intermediários epóxidos, os quais são convertidos com o auxílio da enzima epóxido-

hidrolase a carcinógenos propriamente ditos, os diol-epóxidos (SHIMADA e FUJII-KURIYAMA, 2004). Dessa forma, através da introdução de um ou mais grupamentos hidroxila no substrato, um pró-carcinógeno pode tornar-se carcinógeno, como o benzo[a]pireno que é convertido em epóxido de benzo[a]pireno (NEBERT, 1991; PERERA, 1996; SHIMADA e FUJIKURIYAMA, 2004). Dentre as enzimas denominadas da Fase II envolvidas no processo de detoxificação, as GSTs desempenham um papel predominante no metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofílicos reativos, tanto pela conjugação com as glutationas, como também por ligação não covalente com vários agentes xenobióticos, incluindo carcinógenos e drogas citotóxicas, como os PAHs presentes na dieta alimentar e na fumaça dos cigarros, impedindo a ligação destes ao DNA (VAN POPPEL et al., 1992; BROCKMÖLLER et al., 1993; STRANGE e FRYER, 1999). Tais compostos eletrofílicos reativos podem ser resultantes também, de processos endógenos, iniciados, por exemplo, na respiração e em processos inflamatórios, ou ainda, por radiação ionizante com a produção de ROS, incluindo radicais superóxido e hidroxila (LANG e PELKONEN, 1999). Desse modo, é possível concluir que tais enzimas desempenham uma função protetora contra os radicais livres. Vários quimioterápicos são também substratos para as GSTs e, neste caso, a conjugação destes pode levar a uma diminuição do efeito e à ocorrência de resistência celular (WORMHOUDT et al., 1999).

As ações das enzimas de fase I e II tornam os compostos mais solúveis e mais rapidamente excretados, impedindo o seu acúmulo e hipotetizando que devido a este processo, devem diminuir o risco de câncer. Entretanto, os produtos mais solúveis de alguns compostos são ainda mais carcinógenos do que a forma original. Portanto, uma mutação que aumente a expressão gênica ou a atividade da proteína produzida, pode aumentar a quantidade de carcinógenos reativos formados e, então, aumentar o risco de câncer (DUNNING et al., 1999). Dependendo da estrutura do composto inicial, a reação

de fase I pode ser suficiente para torná-lo solúvel em água e eliminá-lo do organismo sem a necessidade da reação de fase II (GUENGERICH & SHIMADA, 1998; NEBERT, 1991; NEBERT & ROE, 2001; PUGA et al., 1997; VENITT, 1994).

O estudo de variações interindividuais na capacidade de metabolização de xenobióticos já permitiu identificar inúmeros polimorfismos genéticos que afetam os níveis de expressão ou a atividade catalítica das enzimas envolvidas através de diferentes mecanismos moleculares (MACLEOD et al., 1997; MEYER e ZANGER, 1997). Muitos xenobióticos que desempenham papel importante na etiologia de doenças podem ser ativados ou inativados por enzimas polimórficas e, dependendo do tipo de reação mediada por esta enzima, sua deficiência pode conferir vantagem ou desvantagem na susceptibilidade a certa patologia (Figura 4) (DALY et al., 1993). Em algumas situações a toxicidade da molécula é reduzida durante a fase I, em outras são gerados metabólitos secundários capazes de induzir dano ao DNA (VENITT, 1994). Estas substâncias apresentam a capacidade de formar ligações com o DNA, produzindo produtos quimicamente estáveis conhecidos como adutos (*adducts*). A formação de adutos é característica de substâncias carcinogênicas, podendo levar a deleções, adições e substituições de bases (NEBERT, 1991; VENITT, 1994). Estas alterações genéticas são, no entanto, evitadas por proteínas codificadas pelos genes supressores de tumor, entre estes o TP53, cuja função é manter a estabilidade genômica através da interrupção do ciclo celular permitindo que o DNA seja reparado por enzimas específicas, além de induzir a transcrição de genes que regulam a apoptose quando não for possível corrigir o erro genético (AGARWAL et al., 1998; MÜLLAUER et al., 2001).

Segundo GEISLER e OLSHAN (2001), indivíduos deficientes em múltiplos passos enzimáticos possuem risco aumentado para o desenvolvimento de tumores. O impacto de um único polimorfismo genético pode ser fraco, mas é amplificado quando interações entre mais de um gene polimórfico são analisadas (KADLUBAR, 2001), sendo sugerida

uma maior susceptibilidade para aqueles indivíduos que possuem alterações simultâneas nas fases I e II da metabolização.

A interação entre a constituição genética do indivíduo e os fatores ambientais é de grande importância na determinação do fenótipo. Sendo o metabolismo um processo bastante complexo, um grande número de enzimas deve estar envolvido, de modo que se torna necessário elucidar o papel de genes relacionados com surgimento de determinadas doenças na população humana (AU et al., 2001), bem como sua distribuição em diferentes populações, sendo um ponto de partida alvo para o estabelecimento de terapêutica farmacológica personalizada.

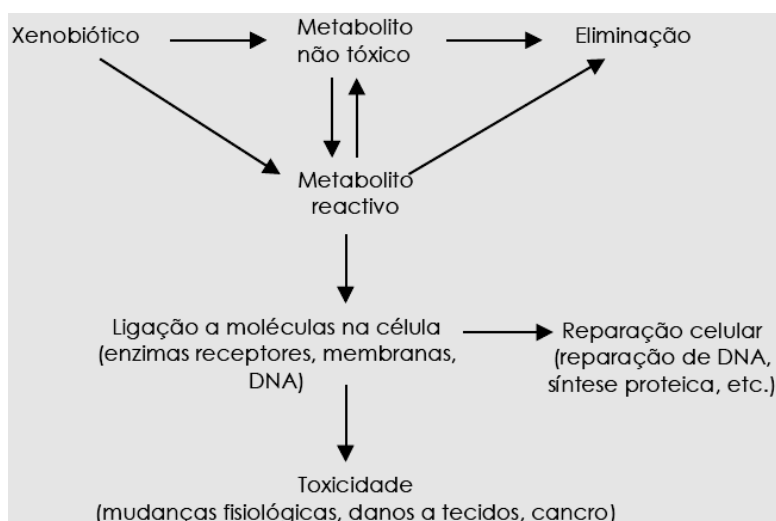


Figura 4. Mecanismos de inativação/ativação de xenobióticos.

Os genótipos que conferem variações nos níveis de atividade enzimática das fases I e II estão associados à susceptibilidade individual ao desenvolvimento de câncer e/ou variações em respostas terapêuticas a tratamentos com fármacos (GARTE, 1998). Com isso, alguns indivíduos ou subpopulações, como diferentes etnias, podem apresentar risco significativamente maior de desenvolver câncer quimicamente induzido do que a média populacional, devido às diferenças expressivas nos processos de ativação e detoxificação (IDLE, 1991; GILLILAND, 1997; CAPORASO, 1999). Falhas nesses processos (fase I e fase II) favorecem o acúmulo de alterações ocorridas em regiões de proto-oncogenes

e/ou genes supressores de tumor, que estimulam e inibem a proliferação celular, respectivamente, promovendo o surgimento de um tumor (ALBERTS et al., 2002). Um grande número de genes que codificam enzimas envolvidas nas vias de biotransformação de xenobióticos e na defesa celular foi identificado e clonado, aumentando assim, o conhecimento sobre as variantes alélicas desses genes que tornam a susceptibilidade às doenças variável (THIER et al., 2003). Muitos genes da superfamília CYP450 e GST, envolvidos na ativação e detoxificação de xenobióticos, são conhecidos pelos seus polimorfismos (MANNERVIK et al., 1985; NEBERT et al., 1996), sendo que algumas destas variantes foram encontradas associadas a diversos tipos de câncer. Esses polimorfismos são freqüentes e, tanto o tipo quanto a freqüência, étnico-dependentes. Os polimorfismos avaliados em populações brasileiras até agora mostram muitas vezes freqüências diferentes das obtidas em etnias semelhantes presentes em outros países, provavelmente reflexo da intensa miscigenação que caracteriza a população brasileira (AMORIM et al., 2002; ROSSINI et al., 2002).

3.3 Polimorfismos genéticos da GST

Cada classe das GSTs é codificada por um único gene ou por uma família gênica. Diferentes estudos sugerem que inúmeros sistemas genéticos de controle e modulação do metabolismo enzimático de xenobióticos estão envolvidos na gênese de diferentes tipos de tumores (WÜNSCH e GATTÁS, 2001). A variação interindividual para metabolizar xenobióticos, também chamada de polimorfismo metabólico, pode ser de substancial importância na determinação deste risco e, portanto, a análise da distribuição étnica destes polimorfismos é importante para identificar grupos de maior risco. Existem vários mecanismos genéticos responsáveis pela variação e modulação final da enzima metabolizadora (Figura 5).

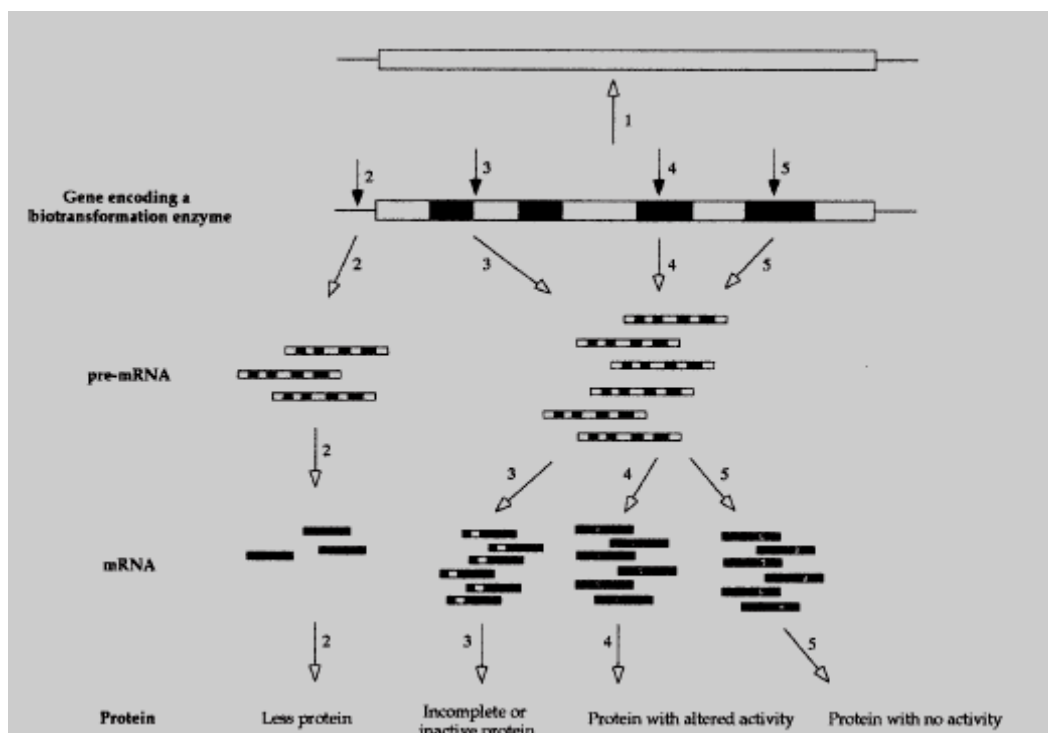


Figura 5. Representação esquemática de diferentes mecanismos moleculares de polimorfismos de enzimas metabolizadoras. Neste esquema, introns são representados pela cor branca, exons em cor preta e mutações por pequenas sombras. A região regulatória do gene é representada por uma linha ao lado do gene. Muitos mecanismos de polimorfismos genéticos são distinguíveis aqui. A região codificante do gene da enzima metabolizadora pode ser completamente ausente (1), causando uma completa ausência da proteína. A parte regulatória do gene pode estar mutada, causando a formação de menores níveis de pré mRNA e proteína (2). A mutação também pode estar presente em uma região entre introns e exons (3), o que causa um *splicing* incorreto do pre RNAm e a formação de uma proteína incompleta ou inativa. A mutação pode estar presente em algum lugar do exon, possivelmente causando uma mudança de aminoácido na proteína que poderá alterar (4) atividade catalítica da enzima ou até mesmo inativá-la (5).

3.3.1 GSTM1

Na classe *mu*, cinco genes (*GSTM1* a 5) foram mapeados no cromossomo 1 (1p13.3) (Figura 6). Os genes estão separados por aproximadamente 20 kb e localizados na seguinte ordem: 5'...*GSTM4* – *GSTM2* – *GSTM1* – *GSTM5*... 3'. O gene *GSTM3* localiza-se após o *GSTM5*, porém numa orientação 3'– 5'. Três alelos diferentes foram

identificados no mesmo locus *GSTM1*, incluindo a deleção do gene (*GSTM*0* ou *GSTM1-*) e duas outras mutações (*GSTM1*A* e *GSTM1*B*) que diferem na substituição da base C por G na posição 534 (REBBECK, 1997). Indivíduos com pelo menos um dos dois alelos funcionais para *GSTM1* (*GSTM1*A* e *GSTM1*B*) são chamados *GSTM1*-positivos e apresentam a mesma eficiência metabólica. Já os indivíduos portadores da deleção (*GSTM1-*) deste gene são designados *GSTM1*-nulos (GATTÁS et al., 2004), pois a deleção frequentemente está presente em ambos alelos resultando no genótipo homocigoto nulo (ROODI et al., 2004). O alelo nulo *GSTM1* (*GSTM1-*) resulta de uma recombinação homóloga envolvendo repetições de 4,2Kb em 5' e 3' (XU et al., 1998), que causa uma deleção de 16Kb contendo todo o gene *GSTM1*. A excisão desse gene é precisa, deixando os genes adjacentes intactos.

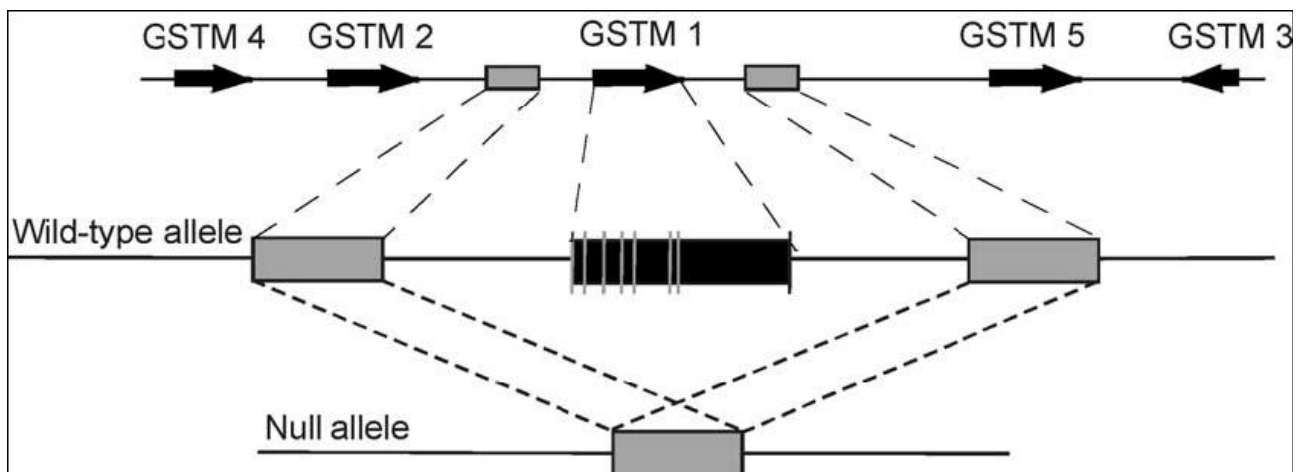


Figura 6. Localização de genes da família GST classe *mu* e deleção completa do gene *GSTM1*.

Indivíduos *GSTM1*-nulos exibem ausência da atividade enzimática e sugere que eles possuam um risco aumentado para efeitos de uma grande variedade de carcinógenos ambientais (MILLIKAN et al., 2000). *GSTM1-* foi positivamente associado com níveis altos de adutos no DNA, sugerindo que este possa influenciar na carcinogênese (NAZAR-STEWART et al., 1993). ZHONG et al. (1993) descreveram um

excesso de indivíduos com este genótipo entre casos de câncer coloretal: 56,1% comparado com 41,8% do grupo controle. Mais de 70% dos indivíduos com tumores no colon proximal são portadores do genótipo nulo.

O genótipo nulo tem uma frequência acima de 50% entre caucasóides, chineses e indianos (BOARD et al., 1990). Em alguns estudos realizados em populações brasileiras as frequências do genótipo nulo descritas foram de 55% (ARRUDA et al., 1998), 60,2% (GATTÁS e SOARES-VIEIRA, 2000), 48,9% (ROSSINI et al., 2002) e 55,4% (GATTÁS et al., 2004). Devido à alta frequência do genótipo nulo na maioria das populações analisadas, que varia entre os grupos étnicos, a distribuição alélica deste gene tem sido muito estudada.

3.3.2 GSTT1

Outro gene de importância nos estudos sobre susceptibilidade ao câncer, é o da classe *theta* *GSTT1*, mapeado no cromossomo 22 (22q11.2) (PEMBLE et al., 1994). A enzima codificada por este gene é capaz de detoxificar pequenos hidrocarbonetos reativos, como o diepoxibutano (PEMBLE et al., 1994).

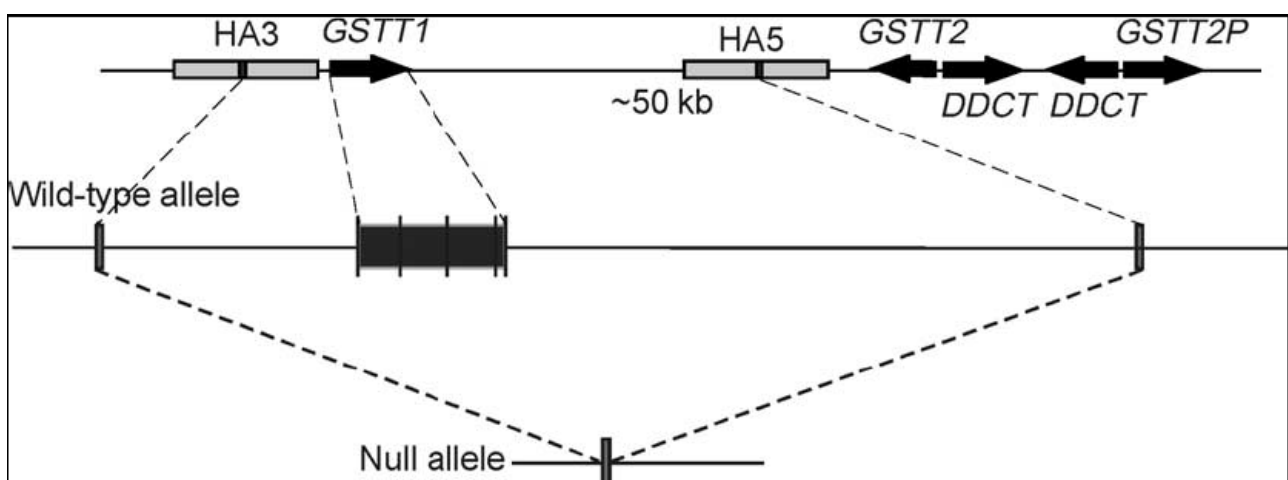


Figura 7. Localização de genes da família GST classe *theta* e deleção completa do gene *GSTT1*.

O gene *GSTT1* também é polimórfico e apresenta um alelo nulo (*GSTT1*-) que resulta na ausência da produção da enzima em indivíduos homocigotos (Figura 7) (PEMBLE et al., 1994).

Em humanos, a conjugação do halometano dependente de glutatona é polimórfica, com 60% da população classificada como “conjugadores” e 40% como “não conjugadores”. PEMBLE et al. (1994) demonstraram que o gene *GSTT1* está ausente em 38% da população. A presença ou ausência do gene é coincidente com o fenótipo conjugador (*GSTT1*+) e não conjugador (*GSTT1*-). A ausência da enzima implica na não detoxificação de uma série de compostos, como os halometanos sintéticos e outros químicos industriais. As frequências do *GSTT1*-nulo descritas na literatura são menores do que as descritas para o *GSTM1*-nulo e há uma baixa variação entre diferentes grupos étnicos. Há indicações de que a única exceção ocorra em asiáticos, que apresentam uma frequência maior de genótipo *GSTT1*-nulo, variando de 46 a 58% em chineses e de 42 a 46% em coreanos (GEISLER e OLSHAN, 2001). Em um estudo na população brasileira, as frequências descritas foram de 26,3% em negros, 22,3% em brancos e 17,2% em mulatos (GATTÁS et al., 2004). Outros estudos realizados na população brasileira, mas somente em caucasóides apontam frequências de 18,5% (ARRUDA et al., 1998) e 25,1% (ROSSINI et al., 2002). CHEN et al. (1996) descreveram um método para a caracterização simultânea dos alelos *GSTM1* e *GSTT1*. A frequência do genótipo nulo para o *GSTM1* foi maior em brancos e para *GSTT1*-nulo maior em afro-descendentes. A frequência observada do genótipo “duplo nulo” não foi significativamente diferente do previsto, assumindo que os dois polimorfismos são independentes. Genótipos *GSTT1* e/ou *GSTM1* nulos estão associados a um aumento de risco de câncer de bexiga, pulmão, col retal e de cabeça e pescoço (COTTON et al., 2000; ENGEL et al., 2002); bem como a outros tipos de câncer, pois a ausência dessas enzimas poderia reduzir a capacidade de um organismo detoxificar metabólitos reativos.

Além disso, os níveis de adutos de DNA, trocas entre cromátides-irmãs e mutações genéticas somáticas podem ser maiores em portadores dos genótipos *GSTM1/GSTT1* nulos (REBBECK, 1997). Os genótipos *GSTM1/GSTT1* nulos foram positivamente associados com o câncer de mama em mulheres com história familiar de câncer de mama (MILLIKAN et al., 2000). A deleção em homozigose do gene *GSTM1* é observada em taxas que variam de 20 a 70% nas diferentes populações investigadas, enquanto para o *GSTT1*, essa taxa é descrita como sendo de 11 a 38% (ABDEL-RAHMAN et al., 1996).

3.3.3 *GSTP1*

O gene *GSTP1*, localizado em 11q13 (MOSCOW et al., 1988), codifica a isoenzima P1, que está envolvida no metabolismo de compostos halogenados, moléculas de baixo peso molecular e epóxidos reativos de alguns PAHs (DUSINKÁ et al., 2001), apresentando maior concentração nos pulmões, esôfago e placenta. BOARD et al. (1990) descreveram três diferentes alelos *GSTP1*, sendo estes denominados *GSTP1*A*, que é o alelo selvagem, *GSTP1*B* e *GSTP1*C*. A variante *GSTP1*B* apresenta uma transição A/G no nucleotídeo +313 do éxon 5, mudando o códon 105 de ATC (Ile) para GTC (Val). O *GSTP1*C* é caracterizado por duas transições de nucleotídeos, sendo a primeira, a mesma observada no *GSTP1*B*, e a segunda, uma transição C/T no nucleotídeo +341 do éxon 6, resultando na mudança de GCG (Ala) para GTG (Val) no códon 114. O códon 105 compreende parte do sítio ativo da enzima *GSTP1* para a ligação de eletrofílicos reativos, e a substituição Ile105/Val105 nas variantes *GSTP1*B* e *GSTP1*C* afeta a atividade catalítica substrato-específica e a estabilidade térmica da proteína codificada (JOHANSSON et al., 1998; PANDYA et al., 2000).

Variações estruturais adicionais causadas pela mudança do aminoácido alanina para valina no códon 114 na *GSTP1*C* são de menor magnitude do que aquelas

causadas por mudanças no códon 105, não possuindo tanto impacto na atividade catalítica. O alelo *GSTP1*B* foi associado com o aumento da incidência de cânceres de bexiga, testículo e próstata (HARRIES et al., 1997), laringe e faringe (MATTHIAS et al., 1998) e pulmão (RYBERG et al., 1997; STUCKER et al., 2002), devido à atividade reduzida da variante *GSTP1*B*. Desse modo, a variante *GSTP1*B*, por apresentar menor capacidade de detoxificação dos metabólitos ativos, pode ser um fator de risco e um indicador de susceptibilidade para cânceres nos quais os PAHs estejam envolvidos na etiologia, como ocorre no caso dos cânceres de boca, cuja incidência aumenta de modo muito importante entre os indivíduos expostos ao tabaco.

Sem dúvida, tais polimorfismos modulam o risco de desenvolvimento de algumas neoplasias, porém, somente estudos subseqüentes poderão fornecer melhores informações sobre as contradições ora observadas, estabelecendo assim a participação dos mesmos na carcinogênese humana.

3.4 Grandes Grupos Étnicos Brasileiros

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de cruzamentos entre indivíduos de três continentes: os colonizadores Europeus, principalmente representados pelos portugueses, os escravos Africanos e os Ameríndios nativos (PARRA et al., 2002). A classificação das raças humanas é arbitrária, existindo, porém, como construção social que foi mudando com o tempo através de contextos sociais e foram sustentadas pela ideologia racial. Os traços físicos de um indivíduo, especialmente a pigmentação da pele, cor e textura do cabelo, e formas dos lábios e nariz, são constantemente utilizados para a categorização racial e desta maneira, costumam ser usados como fatores de segregação social. Entretanto, acredita-se que estes traços oligogenéticos se estabeleceram em conseqüência aos fatores geográficos

seletivos, como a radiação e o calor, e sua utilização como marcadores de “raça” pode ser biologicamente errônea (PARRA et al., 2002). Entretanto, a distribuição da variação genética difere entre os principais grupos humanos.

O conhecimento da variabilidade na suscetibilidade a doenças e a identificação de fatores de risco são de grande importância para o desenvolvimento de medidas de prevenção. Para uma avaliação mais consistente da participação de fatores genéticos em populações especiais é de fundamental importância o conhecimento da distribuição dos mesmos nas populações das quais as amostras foram obtidas (RAUNIO et al., 1995).

No Brasil, os povos ameríndios teriam sido os primeiros colonizadores (no sentido de que se propagaram pelo território). O número provável desses habitantes originais no que se refere a toda a América Latina seria de 43 milhões, com cerca de dois milhões deles vivendo no Brasil (SALZANO e CALLEGARI-JACQUES, 1988). Sua origem ainda não foi plenamente esclarecida, mas atualmente o quadro mais aceito quanto às origens dos nativos americanos é de que eles teriam provindo das montanhas Altai do sul da Sibéria, de onde teriam migrado em uma onda mais ou menos contínua, entrando no continente há pelo menos 15 mil anos usando como rota a costa do oceano Pacífico (SALZANO e BORTOLINI, 2002). Há indicações sobre os caminhos que esses migrantes pré históricos tomaram, bem como sobre diferentes aspectos de seus padrões de vida. Isto pode ser inferido não somente através do material genético, mas também pelos instrumentos que eles nos legaram, como pinturas em cavernas, e material mumificado. A princípio os portugueses acreditavam que os índios pertenciam ao mesmo grupo racial. Após algum tempo, percebeu-se que havia diferenças significativas. Hoje se diz que os índios do Brasil podiam ser divididos em quatro principais grupos étnicos: tupi-guaranis (região do litoral), macro-jê ou tapuias (região do Planalto Central), aruaques (Amazônia) e caraíbas (Amazônia) (Figura 8). Hoje, no Brasil, vivem cerca de 460 mil índios, distribuídos entre 225 sociedades indígenas, que perfazem cerca de 0,25% da população

brasileira (IBGE, 2008). Cabe esclarecer que este dado populacional considera tão-somente aqueles indígenas que vivem em aldeias, havendo estimativas de que, além destes, há entre 100 e 190 mil vivendo fora das terras indígenas, inclusive em áreas urbanas. Há também 63 referências de índios ainda não-contatados, além de existirem grupos que estão requerendo o reconhecimento de sua condição indígena junto ao órgão federal indigenista (IBGE, 2008).



Figura 8. Povos indígenas no Brasil na época do descobrimento. (Disponível em <http://juserve.de>).

Os Africanos foram introduzidos no começo do século XVI, trazidos para o Brasil como escravos para trabalhar inicialmente no cultivo de cana-de-açúcar, depois na exploração do ouro e diamantes e, por fim, em cafezais (ALVES-SILVA et al., 2000). Dentre os negros trazidos para o Brasil, dois grupos foram predominantes: os bantus, vindos de Angola, e os sudaneses, de várias regiões sendo as principais, Costa da Mina e do Golfo de Benin. A região que mais recebeu escravos foi a Bahia. O tráfico baiano pode

ser classificado em quatro ciclos distintos: ciclo da Guiné-Bissau e Cacheu (séc. XVI); ciclo de Angola e Congo (dos portos de Luanda, Cabinda e Benguela, séc. XVII); ciclo da Costa da Mina e Golfo de Benin (séc. XVIII até 1815); e o último ciclo de 1816 até 1851, ocorrendo na ilegalidade (Figura 9) (MATTOSO, 1982; VIANA-FILHO,1988; FAUSTO, 1997). A contribuição da população Africana para as populações atuais brasileiras é encontrada em vários aspectos como a cultura, a religião e a origem genética das populações atuais.



Figura 9. Principais rotas e portos de transporte de escravos Africanos para o Brasil. (Disponível em [http:// fesa.org.br](http://fesa.org.br)).

Com relação à origem genética, o componente Africano miscigenado a outros componentes como o Europeu e Ameríndio, é um dos mais marcantes. Com relação à imigração Européia, calcula-se que 500.000 portugueses chegaram ao país entre 1500 e 1808 (SALZANO e FREIRE-MAIA, 1967). A colonização inicialmente envolveu apenas homens, pois a imigração Européia de mulheres nos primeiros séculos foi insignificante. Portanto, desde o início da colonização portuguesa houve miscigenação entre homens portugueses e mulheres Ameríndias.

Durante o período de 1500 a 1808 aproximadamente 500.000 portugueses vieram para o Brasil (CARVALHO-SILVA et al., 2001). Com a abertura dos portos brasileiros às nações amigas, o Brasil recebeu números crescentes de imigrantes de várias partes do mundo.

4.Objetivos

Geral:

Avaliar os padrões alélicos para o gene da Glutathione S-transferase (*GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*) na população sudeste baiana.

Específicos:

- Avaliar epidemiologicamente a distribuição de polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*, segundo as características étnicas da população sudeste baiana;
- Comparar as frequências gênicas observadas com outras descritas na literatura, visando contribuir para um melhor conhecimento da estrutura populacional;
- Possibilitar a disponibilização de dados para a identificação de marcadores genéticos correlacionados com as neoplasias em um estudo posterior com associação do tipo caso-controle.

5. Justificativa e Relevância

O estudo da ancestralidade do indivíduo através de marcadores genéticos pode ser útil por fornecer informações, por exemplo, sobre mapeamento por mistura, predição de riscos médicos, estudos de dispersão de populações, fluxo gênico e história evolutiva. Além disso, a farmacogenética tem tido recentemente um importante desenvolvimento e as pesquisas nesta área têm demonstrado diferenças significativas, inter e intrapopulacionais, no metabolismo, eficácia e toxicidade de medicamentos (KITTLES e WEISS, 2003). O estudo de amostras de diferentes grupos étnicos (Euro-descendentes, Afro-descendentes e Ameríndios) nos dará informações relevantes sobre a dinâmica gênica na população nordeste do Brasil e estrutura genética da população brasileira, caracterizada por significativa miscigenação étnica, comparada com outras populações mundiais estudadas para esses marcadores. Os genes do biometabolismo têm sido associados a diversas doenças induzidas ambientalmente. O conhecimento das freqüências de seus polimorfismos em populações de diferentes grupos étnicos é de grande interesse por servir de base para estudos epidemiológicos populacionais e futuras ações de prevenção em nível sócio-populacional. Esses dados poderão ser utilizados para determinação de susceptibilidade a reações adversas a drogas, doenças e perfil populacional para a indústria farmacêutica brasileira, quer seja estatal ou privada, segundo as necessidades apontadas para a política de medicamentos do país. Como o equilíbrio entre as enzimas que induzem a formação de metabólitos reativos e as que os inativa pode ter influência no desenvolvimento de neoplasias, deve-se considerar a susceptibilidade genética na elaboração de modelos que estabeleçam perfis de risco populacional ou individual à exposição ambiental. Por isso, torna-se fundamental a realização de estudos genéticos para um melhor conhecimento do perfil biológico de pacientes com a doença. O desenvolvimento da farmacogenética como ciência no Brasil ainda é modesta, e deve ser uma das áreas prioritárias em saúde, pois caracterizam a

população, geram conceitos básicos, qualificam pesquisadores e interferem diretamente em programas e normas nacionais para o uso racional de medicamentos.

GLUTATHIONE S-TRANSFERASE VARIANTS IN A BRAZILIAN POPULATION

Luiz Alexandre V. Magno¹; Jhimmy Talbot¹; Teddy Talbot¹; Alex Marques Borges Santos¹; Renan P. Souza²; Lauro J. Marin¹; Marcos Lázaro Moreli¹; Paulo R. S. de Melo¹; Ronan X. Corrêa¹; Fabrício Rios Santos¹ e Giuliano Di Pietro¹.

1- Laboratório de Farmacogenômica e Epidemiologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brazil; 2- Neurogenetics Section, Centre for Addiction and Mental Health, Toronto, Canada

Abstract

Recent pharmacogenomic studies have revealed significant interethnic differences in Glutathione S-transferases (GSTs) allelic frequencies among various ethnic groups. We have therefore investigated *GSTM1* (gene deletion), *GSTT1* (gene deletion) and *GSTP1* (rs1695) polymorphism frequencies in three Brazilian ethnic groups (n=203). *GSTM1* and *GSTT1* polymorphism analyzes were performed by multiplex polymerase chain reaction (PCR) and *GSTP1* (rs1695) analysis was done by PCR-RFLP. *GSTM1*- polymorphism frequency was 33.2%, while *GSTT1* null (*GSTT1*-) was 30.2%. Valine *GSTP1**B (rs1695) allele was present in 35.1% subjects, while the heterozygous form (isoleucine/valine) was the most prevalent genotype (46.6%). We found a statistically significant difference genotype frequency among Amerindians x Caucasians ($p = 0.016$) and Amerindians x African-Americans ($p = 0.033$). Considerable frequency variation was found in our study, even when compared to other studies, showing considerable phylogeographical heterogeneity to the genes studied in Brazilian populations.

Keywords: Glutathione S-transferases; pharmacogenetics; Brazilian population; ethnicity; metabolic enzymes.

Introduction

Characterization of naturally occurring variations in the human genome has evoked immense interest during recent years. Variations known as those that contain common functional allelic variants that affect gene expression or protein function have become increasingly popular markers in molecular genetics [1, 2]. Glutathione S-transferases (GSTs) are an enzymatic family consisting of numerous cytosolic, mitochondrial, and microsomal proteins able to catalyze multiple reactions with endogenous and xenobiotic substrates [3]. They catalyze reduced glutathione conjugation to electrophilic centers via the sulfhydryl group on a wide variety of substrates [4-6].

Soluble GSTs exist as dimeric proteins (~ 25 kDa) which are highly expressed, constituting of up to four percent of the total soluble proteins in the liver [7]. At present, eight soluble cytoplasmic mammalian GST distinct classes have been identified: alpha, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta, and zeta [8]. In general, GSTs catalyzed reactions are considered detoxifying and serve to protect cellular macromolecules from damage caused by several environmental carcinogens found in food, tobacco smoke, air and medications, endogenous compounds such as peroxidized lipids [4], and inactivate products formed as secondary

metabolites during oxidative stress [9-11]. GSTs are involved in gene-environment interactions, modifying individual predisposition to various diseases and they were shown to be able to influence treatment response to drugs such as glucocorticoids and alkylating agents [12-14].

It has been hypothesized that allelic variants are associated with less effective detoxification [4-6]. Genetic polymorphisms have been described in all classes of GSTs [14]. There are three important described variants at the *GSTM1* locus (1p13.3): *GSTM1*0* (a deletion) and others two polymorphisms (*GSTM1*A* and *GSTM1*B*) differ by a substitution at base position C534G, there are no phenotype differences [15]. Theta GST class is encoded by the *GSTT1* gene (22q11.23) and it may present a deletion that results in a lack of functional gene product (*GSTT1*0*) [16]. Most *GSTM1* and *GSTT1* null variant studies have compared the doubled deletion with the genotypes containing at least one functional allele [14]. DNA adducts and cytogenetic endpoints analyzed have indicated an increased susceptibility of *GSTM1* and/or *GSTT1* null genotype to genotoxicity of common low-dose chemicals [17, 18]. The most extensively studied *GSTP1* gene (11q13) variant, *GSTP1*B* (*rs1695*), is an A1578G change at the fifth exon (change of isoleucine to valine in the codon 105), which generally confer a lower metabolic activity [19, 20].

Ethnicity is an important variable influencing drug response and pharmacogenetic studies have revealed significant interethnic differences in allelic frequencies of polymorphic genes encoding drug metabolizing enzymes, drug transporters and drug targets [21-24]. Accordingly, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* allelic frequencies are different among various ethnic groups and regions [25]. Brazil form is one of the most heterogeneous populations of the world, which is the result of five centuries of mixing between populations colonizing European, African slaves and native Amerindians [26]. Due to this high degree of miscegenation, the Brazilian population; the fifth largest in the world, is unique compared to other populations [27]. In this study, we have investigated *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* variant frequencies in Brazilian individuals residing in Bahia, a Brazilian northeast State with highly admixed population. This work provides the basis for future clinical studies concerning variability in the response and/or toxicity to drugs known to be substrates for GSTs and determine whether there are differences in this gene polymorphism among the three most prevalent Brazilian ethnic groups (African-Americans, Amerindians and Caucasians).

Methods

Subjects

All 203 individuals included in this study were blood donors at the Hospital São José (Ilhéus, Bahia), who have reported no symptomatic, metabolic or genetic conditions (age 34.3 ± 10.2 ; male 61%; African-Americans 69.1%, Caucasian 15.7% and Amerindians 15.2%). Volunteers were classified by self-reported ancestry in Caucasian, African-Americans or Amerindian. Signed informed consent was obtained from each participants and the study was conducted after being approved by the Human Ethics Committee from the Universidade Estadual de Santa Cruz.

Sample collection and DNA analyzes

Peripheral blood (5ml) was collected in EDTA vacutainer tubes from all participating individuals after obtaining their written consent. Genomic DNA extraction was performed from whole blood using FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Boston, MA, USA). *GSTM1* and *GSTT1* polymorphism analyses were performed by multiplex polymerase chain reaction (PCR) [28], with the ubiquitous β -globin gene as an internal standard. This was carried out amplification using the following primers: *GSTT1* forward primer 5'- TCT CCT TAC TGG TCC TCA CAT CTC - 3'; *GSTT1* reverse primer 5'- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA - 3'; *GSTM1* forward primer 5'- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA - 3'; and *GSTM1* reverse primer 5'- GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G - 3'. Each 25 μ l PCR reaction contained 2.5 μ l of 10X reaction buffer (Tris-HCl 10mM pH 8.3 and KCl), 2mM MgCl₂, 200 μ M each of deoxynucleoside triphosphates, 10pmol of each primer, 1 unit of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 100ng genomic DNA. Thermal cycling conditions for the PCRs were as follows: 15min at 95°C, followed by 30 cycles of 95°C for 2min, 60°C for 1min, and 72°C for 1min, with a final extension at 72°C for 10min. PCR products were visualized on a 2% (w/v) agarose gel (Pronadisa, Madrid, Spain) electrophoresis at 100V for 50 min. Two 480bp bands for *GSTT1* and 215bp for *GSTM1* were obtained for the *GSTT1+*/*GSTM1+* genotype. *GSTT1+*/*GSTM1-* genotype showed one band of 480bp, and the *GSTT1-*/*GSTM1+* genotype showed a band of 215bp. For the *GSTT1-*/*GSTM1-* genotype (designated as null genotype), no bands were obtained and thus β -globin (268pb) internal positive standard was necessary. *GSTP1* (rs1695) analysis was done as previously described by Harries *et al.* [29]. Briefly, the primers P105 F 5'- ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA - 3' and P105 R 5'- TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT - 3' were used to obtain a 176bp fragment. PCR products (20 μ L) were digested

with 5U *BsmAI* restriction endonuclease (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) in a 25 μ L reaction and digestion products were separated by electrophoresis on 3.5% (w/v) agarose gel. Mutations resulted in 91 and 85pb fragments and 176pb fragment was seen for the wild-type form.

Statistical analysis

Individual markers analyses comparing variant frequencies among ethnic groups were performed using χ^2 tests. Statistical programs used were the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and UNPHASED [30]. Hardy-Weinberg equilibrium test was also performed using χ^2 tests [31]. Population stratification was accessed using Structure 2.2 [32] and multiple logistic regression analysis was carried out to evaluate ethnic influences on the polymorphisms frequency. Statistical significance was assumed as $p < 0.05$.

Results

GSTM1 and *GSTT1* variant frequencies among the three ethnic groups and gender are shown in Table 1. *GSTM1*- allele was found in 33.2% of the population, while the *GSTT1*- obtained a frequency of 30.2%. When both variants were analyzed together, the most frequently form observed in the total sample was *GSTM1*+/*GSTT1*+ (48.8%) and this pattern was found for all conditions (ethnic groups and genders). Null variant frequencies showed that in Caucasians and African-Americans *GSTM1*- were overrepresented when compared with Amerindians frequency, while Amerindians *GSTT1*- was more frequent represented than African-American or Caucasian. There were no significant statistical differences among the ethnic groups studied and gender (Figure 1). The *GSTP1* (rs1695) most frequent genotype was the heterozygous with 46.6%, (Table 1) and this pattern was found in all conditions, except for Amerindians that had a higher prevalence of homozygous isoleucine genotype (62,1%). Indeed, we found a statistically significant difference when compared *GSTP1* (rs1695) frequency in Amerindians and Caucasians ($p = 0.016$) or Amerindians and African-Americans ($p = 0.033$) (Figure 1). Isoleucine allele was the most frequent with 64.9%. Using multiple logistic regression analysis, it was further confirmed that the Amerindians is characterized for lower *GSTP1**B frequency after corrections for age and gender (OR = 0.120 [0.015 - 0.961] $p = 0.046$) (Table 2). Statistical analysis showed no genotypic or allelic frequency significant differences among gender and observed frequencies of all variants have followed the Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$) (Figure 1).

Table 1: *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* variant frequencies.

Gene	Variant	Total (%)	Caucasian (%)	African-American (%)	Amerindian (%)	Male (%)	Female (%)
<i>GSTM1</i>	<i>GSTM1</i> ⁻	0.332	0.379	0.338	0.265	0.328	0.328
	<i>GSTM1</i> ⁺	0.668	0.621	0.662	0.735	0.672	0.672
<i>GSTT1</i>	<i>GSTT1</i> ⁻	0.302	0.276	0.289	0.382	0.292	0.328
	<i>GSTT1</i> ⁺	0.698	0.724	0.711	0.618	0.708	0.672
<i>GSTM1/GSTT1</i>	<i>GSTM1</i> ⁻ / <i>GSTT1</i> ⁻	0.122	0.138	0.113	0.147	0.117	0.148
	<i>GSTM1</i> ⁺ / <i>GSTT1</i> ⁻	0.180	0.138	0.176	0.235	0.175	0.180
	<i>GSTM1</i> ⁻ / <i>GSTT1</i> ⁺	0.210	0.241	0.225	0.118	0.212	0.180
	<i>GSTM1</i> ⁺ / <i>GSTT1</i> ⁺	0.488	0.483	0.486	0.500	0.496	0.492
<i>GSTP1</i> (rs1695)	Ile	0.649	0.625	0.611	0.741	0.644	0.620
	Val	0.351	0.375	0.389	0.259	0.356	0.375
	Ile/Ile	0.405	0.300	0.364	0.621	0.394	0.432
	Ile/Val	0.466	0.650	0.495	0.241	0.500	0.386
	Val/Val	0.128	0.050	0.141	0.138	0.106	0.182

Ile: Isoleucine allele
Val: Valine allele

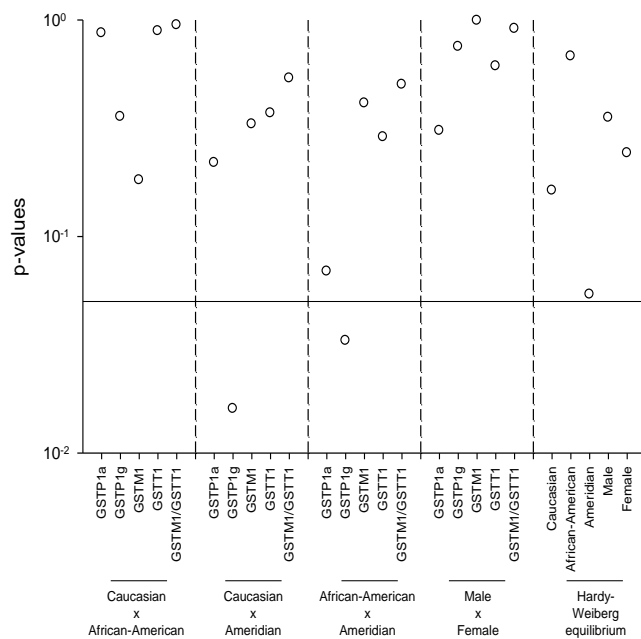


Figure 1: Statistical analyzes results. “a” means allelic association test and “g” means genotypic association test. Solid line parallel to y axis represents $p = 0.05$. Any point plotted below this line represents statistical significant difference among compared groups.

Table 2: Logistic regression analysis of the *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms among ethnic groups for risk of mutant allele.

Variant	African-American OR ^y (CI 95%)	p	Caucasian OR ^y (CI 95%)	p	Amerindian OR ^y (CI 95%)	p
<i>GSTM1</i> -	1.153(0.407-2.261)	0.789	1.483(0.414-5.313)	0.545	0.793(0.312-2.018)	0.626
<i>GSTT1</i> -	0.562(0.184-1.722)	0.313	0.479(0.129-1.777)	0.271	1.148(0.472-2.790)	0.761
<i>GSTP1</i> *Val	0.212(0.035-1.270)	0.089	0.095(0.006-1.584)	0.101	0.120(0.015-0.961)	0.046*

Reference group is *GSTM1*+, *GSTT1*+ and *GSTP1**Ile, respectively.

^yOdds Ratio (OR) and 95% Confidence Interval (CI) for each reference allele compared are shown.

* $p < 0.05$.

No significant population stratification was observed when analyzed all three variants on Structure 2.2 (data not shown).

Discussion

Metabolic genes form a genetic marker group that has been extensively examined, especially in case-control studies in complex diseases, such as cancer or drug therapy response. The identification of genetic variants identification with high frequencies in genes involved with carcinogenic metabolism, like as found in our study (35.1% to *GSTP1**B), has allowed development of hypotheses that attempt to explain the high degree of individual variability in susceptibility to cancer [33].

In addition, pharmacogenetic has recently taken an important role showing significant differences, inter and intra population in metabolism, efficacy and toxicity of drugs [34], and this fact varies between regions studied. The Brazilian population, especially in the northeast, offers a great research potential because it presents a unique admixture and diversity of variant combinations in different loci enabling gene interaction studies [35]. The southeast of Bahia region presents one of the most heterogeneous Brazilian populations [36].

This study aimed to access *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* variant frequencies and determine whether there are differences in these among ethnic groups of northeastern Brazil for the first time. Although African-Americans gender ratio was not homogeneous (data not shown), genetic variants distribution studied in this sample was homogeneous across gender. These

results confirm the data from other studies that also found no statistical significant differences when frequencies were compared across gender [33]. Subjects' age was another factor without influence on variant frequencies (data not shown) corroborating with other study [33], and therefore allows us to exclude that the possibilities of these variants being crucial for the overall survival of individuals.

Interestingly, we found significant difference in the variants distribution of *GSTM1* and *GSTT1* in our sample, when compared with other studies conducted in Brazil. The *GSTM1*-frequency (33.2%) is the lowest, corroborating with other studies. Moreover, the frequency of *GSTT1*, with 30.2%, is the highest [37, 38].

The heterozygotes frequency of the *GSTP1* gene, which is a measure of genetic diversity, showed to be high (46.6%), suggesting a possible trend towards heterozygosis for the variant in the Northeast population. To date, this is the first study that has performed *GSTP1* (rs1695) analysis in a Brazilian Amerindian population.

GSTP1 (rs1695) frequencies were statistically different in Amerindians from Caucasian and African-Americans, $p = 0.016$ and 0.033 , respectively. The genetic drift may be explained for the *GSTP1* (rs1695) homozygote high frequencies among Amerindians (62.1%), as compared to African-American (36.4%) and Caucasians (30.0%), beyond natural selection in response to environmental changes, since these genes encode enzymes responsible for metabolizing a large number of xenobiotics.

Multiple logistic regression analysis was carried out and confirmed that there is a significant difference in allelic distribution among the ethnic groups. This finding supports that *GSTP1* allelic distribution is differently present among the ethnic populations. However, these findings need to be interpreted with restrictions because there is no molecular analysis of ethnic background in order to confirm the information raised by the volunteer's self-identification of ethnicity, especially considering that it has been shown an intense ethnic admixture in this population. To date, this is the first study that has performed *GSTP1* (rs1695) analysis in a Brazilian Amerindian population.

Our results shown in Brazilian individuals genotyped for *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* allelic variants provided a considerable finding of phylogeographical heterogeneity, reporting further evidence for ethnic variability in drugs and xenobiotics metabolism. We hope that our results will aid in understanding the Brazilian population ethnic diversity and offer basis for more rational use of drugs that are substrates for those variants.

Acknowledgments: Authors would like to thank Naide Silveira de Souza for helping throughout the sample and Vincenzo de Luca for his help during the data analyses. This work was supported by FAPESB, CNPq and UESC.

Corresponding author: Dr. Giuliano Di Pietro: Laboratório de Farmacogenômica e Epidemiologia Molecular, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus – Itabuna (Km16), Salobrinho, Postal code 45662000. Telephone +557336805327, Fax +557336805114.

Disclosure/Conflicts of interest: Authors have no potential disclosures or conflicts of interest to declare.

Bibliography

- [1] Cargill M, Altshuler D, Ireland J, et al: Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 1999;22:231–238.
- [2] Vasilou V, Pappa A: Polymorphisms of human Aldehyde Dehydrogenases consequences. *Pharmacology* 2000;61:192–198.
- [3] Boyer TD: The glutathione S-transferases: an update. *Hepatology* 1989;9:486–96.
- [4] Gulick AM, Fahl WE: Forced evolution of glutathione S-transferase to create a more efficient drug detoxification enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8140–8144.
- [5] Seidegard J, Ekström G: The role of human glutathione S-transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect* 1997;105:791–799.
- [6] Hayes JD, Strange RC: Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000;61:154–166.
- [7] Eaton DL, Bammler TK: Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci* 1999;49:156–64.
- [8] Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, et al: Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 2001;482:21–6.
- [9] Hirvonen A: Genetic factors in individual responses to environmental exposures. *J Occup Environ Med* 1995;37:37–43.
- [10] Wiencke JK, Kelsey KT, Lamela RA, et al: Human glutathione S-transferase deficiency as a marker of susceptibility to epoxide-induced cytogenetic damage. *Cancer Res* 1990;50:1585–90.
- [11] Norppa H, Hirvonen A, Järventaus H, et al: Role of *GSTT1* and *GSTM1* genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1995;16:1261–4.
- [12] Anderer G, Schrappe M, Brechlin AM, et al: Polymorphisms within glutathione S-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics* 2000;10:715–26.
- [13] Dasgupta RK, Adamson PJ, Davies FE, et al: Polymorphic variation in *GSTP1* modulates outcome following therapy for multiple myeloma. *Blood* 2003;102:2345–50.
- [14] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR: Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51–88.
- [15] Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, et al: Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7202–7206.
- [16] Pemble S, Schroeder KR, Spencer TSR, et al: Human glutathione S-transferase Theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994;300:271–276.
- [17] Steiner C, Peters WH, Gallagher EP, et al: Genistein protects human mammary epithelial cells from benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and 4-hydroxy-2-nonenal genotoxicity by modulating the glutathione/glutathione S-transferase system. *Carcinogenesis* 2007;28:738–48.
- [18] Rojas M, Cascorbi I, Alexandrov K, et al: Modulation of benzo[a]pyrene di-epoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphism. *Carcinogenesis* 2000;21:35–41.
- [19] Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, et al: Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of fulllength cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem* 1997;272:10004–12.
- [20] Watson MA, Stewart RK, Smith GB, et al: Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998;19:275–80.
- [21] Koseler A, Ilcol YO, Ulus IH: Frequency of mutated allele *CYP2D6*4* in the Turkish population. *Pharmacology* 2007;79:203–206.
- [22] Wood AJJ: Racial differences in the response to drugs – Pointers to genetic differences. *N Engl J Med* 2001;344:1393–6.
- [23] Huang N, Agrawal V, Giacomini KM, Miller WL: Genetics of P450 oxidoreductase: sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:1733–8.
- [24] Solus JF, Arietta BJ, Harris JR, et al: Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. *Pharmacogenomics* 2004;5:895–931.
- [25] Bolt HM, Thier R: Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases *GSTT1* and *GSTM1* in pharmacology and toxicology. *Curr Drug Metab*. 2006;7:613–28.
- [26] Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, et al: Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:177–82.

- [27] Vieira AR, Karras JC, Orioli IM, et al: Genetics origins in a South American clefting population. *Clin Genet* 2002;62:458–463.
- [28] Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW: A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of *GSTM1* and *GSTT1* genes in population studies. *Cancer Lett* 1996;107:229–233.
- [29] Harris MJ, Coggan M, Langton L: Polymorphism of the Pi class glutathione S-transferase in normal populations and cancer patients. *Pharmacogenetics* 1998;8:27–31.
- [30] Dudbridge F: Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 2003;25:115–21.
- [31] Souza RP, Romano-Silva MA, Lieberman JA, et al: Association study of *GSK3* gene polymorphisms with schizophrenia and clozapine response. *Psychopharmacology (Berl)* 2008;200:177–86.
- [32] Falush D, Stephens M, Pritchard JK: Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol* 2007;16:574–578.
- [33] Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, et al: Metabolic gene polymorphisms frequencies in control populations. *Can Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1239–1248.
- [34] Liggett SB: Pharmacogenetics of Beta-1- and Beta-2-Adrenergic Receptors. *Pharmacology* 2000;61:167–173.
- [35] Zembrzuski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH: Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann Hum Genet* 2006;70:822–828.
- [36] Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SDJ: The phylogeography of brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Genet* 2001;68:281–286.
- [37] Arruda VR, Grignolli CE, Gonçalves MS, et al: Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (*GSTM1*) and theta (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clin Genet* 1998;54:210–214.
- [38] Suarez-Kurtz G, Vargens DD, Struchiner CJ, et al: Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of GST polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17:765–71.
- [39] Leng S, Dai Y, Niu Y, et al: Effects of genetic polymorphisms of metabolic enzymes on cytokinesis-block micronucleus in peripheral blood lymphocyte among coke-oven workers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1631–9.

7. Conclusões

- A frequência do alelo *GSTM1*- na população de estudo foi a mais baixa do país com 33,2% (Apêndice 1);
- A nulidade para gene *GSTT1* (*GSTT1*-), com 30,2%, configura o mais alto percentual de ausência desta variante no Brasil (Apêndice 1);
- Para o genótipo combinado das duas variantes (*GSTM1*- e *GSTT1*-) não foi possível observar, por meio de testes estatísticos, diferença na distribuição de suas respectivas frequências entre os três grupos étnicos estudados (Afro-descendentes, Euro-descendentes e Ameríndios) e na comparação destes resultados com grupos étnicos semelhantes oriundos de outras regiões do Brasil (Apêndice 1 e 3);
- A variante A1578G do gene *GSTP1* na população estudada, apresentou a maior frequência alélica do Brasil (35,1%), e entre os genótipos, o heterozigoto foi o mais prevalente (46,6%) (Apêndice 2);
- Foi observado com significância estatística, diferença na frequência genotípica da variante *GSTP1**B entre Ameríndios/Euro-descendentes ($p = 0.016$) e Ameríndios/Afrodescendentes ($p = 0.033$) quando comparados. Utilizando regressão logística, os Ameríndios são fortemente caracterizados pela ausência da variante *GSTP1**B, comparado a outros grupos étnicos estudados;
- As análises estatísticas não evidenciaram diferenças significativas da frequência genotípica e alélica quanto ao sexo ou idade dos participantes do estudo;
- As informações obtidas neste estudo contribuem para auxiliar no melhor delineamento de estudos do tipo caso-controle que incluam estes genes na população brasileira;

8. Referências

ABDEL-RAHMAN SZ, EL-ZEIN RA, ANWAR WA, AU WW: A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996; 107:229-233.

AGARWAL ML, TAYLOR WR, CHERNOV MV, CHERNOVA OB, STARK GR, DUNNING AM, HEALEY CS, PHAROAH PDP, TEARE MD, PONDER BAJ, EASTON DFA: Systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1999; 8:843-854.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P: *Molecular biology of the cell*, 4 ed New York: Garland Science, 2002.

ALVES-SILVA J, SANTOS MS, GUIMARÃES PEM, FERREIRA ACS, BANDELT H, PENA SDJ, PRADO VF: The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am J Hum Genet* 2000; 67:444-461.

AMES BN, PROFET M, GOLD LS: Nature's chemicals and synthetic chemicals: Comparative toxicology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87:7782-7786

AMORIM LM, LOTSCH PF, SIMAO TD, GALLO CV, PINTO LF: Analysis of *CYP1A1* exon 7 polymorphisms by PCR-SSCP in a Brazilian population and description of two novel gene variations. *Mutat Res* 2004; 547: 35-40.

ARCA P, HARDISSON C, SUAREZ JE: Purification of a Glutathione S-transferase that mediates fosfomycin resistance in bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 34:844-848.

ARMSTRONG RN: Structure catalytic mechanism and evolution of the Glutathione s-transferases. *Chemical research in toxicology* 1997; 10:2-18.

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 mu (*GSTM1*) and theta (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clin Genet* 1998; 54:210-214.

AU WW, OH HY, GRADY J, SALAMA SA, HEO MY: Usefulness of genetic susceptibility and biomarkers for evaluation of environmental health risk. *Environ and Mol Mutagenesis* 2001; 37:215-225 .

BOARD PG, COGGAN M, JOHNSTON P, ROSS V, SUZUKI T, WEBB CG: Genetic heterogeneity of the human Glutathione S-transferases: a complex of gene families. *Pharmacol Ther* 1990; 48:357-369.

BOOTH J, BOYLAND E, SIMS P: An enzyme from rat liver catalyzing conjugation with glutathione. *Biochemical Journal*, 1961; 79:516-524.

BROCKMÖLLER J, KERB R, DRAKOULIS N, NITZ M, ROOTS I: Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class m isoenzymes and y in lung cancer patients and controls. *Cancer Res* 1993; 53:1004-1011.

CAPORASO N: Selection of candidate genes for population studies. Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. IARC Scientific publications 1999; 148:23-36.

CARVALHO-SILVA DR, SANTOS FR, ROCHA J, PENA SDJ: The phylogeography of brazilian Y-chromosome lineages. Am J Genet 2001; 68:281-286.

CHEN C, LIU Q, RELLING MV: Simultaneous characterization of Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American Whites and Blacks. Pharmacogenetics 1996; 6:187-191.

COMBES B, STAKELUM GS: A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. Journal of Clinical Investigation 1961; 40:981-988.

COTTON SC, SHARP L, LITTLE J, BROCKTON N: Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a huge review. Am J Epidemiol 2000; 151:7-32.

DALY AK, CHOLERTON S, GREGORY W, IDLE JR. Metabolic polymorphisms. Pharmac Ther 1993; 57:129-160.

DIXON DP, DAVIS BG, EDWARDS R: Functional divergence in the Glutathione transferase superfamily in plants. Journal of Biological Chemistry 2002; 277:30859-30869.

DUSINSKÁ M, FICEK A, HORSKA A, RASLOVA K, PETROVSKA H, VALLOVA B, DRLICKOVA M, WOOD SG, STUPAKOVA A, GASPAROVIC J, BOBEK P, NAGYOVA A, KOVACIKOVA Z, BLAZICEK P, LIEGEBEL U, COLLINS AR: Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. Mutat Res 2001; 482:47-55.

DANIELSON U, MANNERVIK B: Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. Biochemical Journal 1985; 231:263-267.

DIXON DP, LAPHORN A, EDWARDS R: Plant glutathione transferases. Genome Biology 2002; 3:30041-300410.

ENGEL LS, TAIOLI E, PFEIFFER R, GARCIA-CLOSAS M, MARCUS PM, LAN Q, BOFFETTA P, VINEIS P, AUTRUP H, BELL DA, BRANCH RA, BROCKMOLLER J, DALY AK, HECKBERT SR, KALINA I, KANG D, KATO HT, LAFUENTE A, LIN HJ, ROMKES M, TAYLOR JA, ROTHMAN N: Pooled analysis and meta-analysis of Glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: a HuGE review. Am J Epidemiol 2002; 156:95-109.

FAUSTO B: História do Brasil, 5^a ed. - São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo/Fundação do Desenvolvimento da Educação, 1997.

FROVA, C: The plant Glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. Physiologia Plantarum 2003; 119:469-479.

GATTÁS GJF, SOARES-VIEIRA JA: Cytochrome P450-2E1 and Glutathione S-transferase *mu* polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. *Occup Med* 2000; 50: 508-511.

GATTÁS GJF, KATO M, SOARES-VIEIRA JA, SIRAQUE MS, KOHLER P, GOMES L, REGO MAV, BYDLOWSKI SP: Ethnicity and Glutathione S-transferase (*GSTM1/GSTT1*) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 2004; 34:451-458.

GARTE SJ: The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis* 1998; 19:1329-1332.

GEISLER SA, OLSHAN AF: *GSTM1 GSTT1* and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-huge review. *Am J Epidemiol* 2001; 154:95-103.

GILLILAND FD: Ethnic differences in cancer incidence: a marker for inherited susceptibility? *Environ Health Perspect* 1997; 105:897-900.

GUENGERICH FP SHIMADA T: Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat Res* 1998; 400:201-13.

HARRIES LW, STUBBINS MJ, FORMAN D, HOWARD GC, WOLF CR: Identification of genetic polymorphisms at the Glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997; 18:641-644.

HASLER JA, ESTABROOK BR, MURRAY CM, PIKULEVA DI, WATERMAND M, CAPDEVILAE J, HOLLAE V, HELVIGE C, FALCK BJR, FARRELL FG, KAMINSKY GLS, SPIVACK GSD, BOITIER HE, BEAUNE HP: Human cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 1999; 20:1-137.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 20 dez 2008.

IDLE J: Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? *Mutat Res* 1991; 247:259-266.

JOHANSSON AS, STENBERG G, WIDERSTEN M, MANNERVIK B: Structure activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1 governed by the H-site residue 105. *J Mol Biol* 1998; 278:687-698.

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

KAMPRANIS SC, DAMIANOVA R, ATALLA, HM TOBY, KONDI G, TSICHLIS PN, MAKRIS AM: A novel plant Glutathione s-transferase/peroxidase suppresses bax lethality in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275, 29207-29216.

KETTER B: Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mut Res* 1988; 202:343-361

KITTLES RA, WEISS KM: Race ancestry and genes: implications for defining disease risk. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003; 4:33-67.

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

LOYALL L, UCHIDA K, BRAUN S, FURUYA M, FROHNMEYER H: Glutathione and a UV light-induced Glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. *The Plant Cell* 2000, 12:1939-1950.

MACLEOD S, SINHA R, KADLUBAR FF, LANG NP: Polymorphisms of *CYP1A1* and *GSTM1* influence the in vivo function of *CYP1A2*. *Mutat Res* 1997; 376:135-142.

MANNERVIK B, ALIN P, GUTHENBERG C, JENSSON H, TAHIR MK, 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* 1985; 82:7202-7206.

MATTHIAS C, BOCKMUHL U, JAHNKE V, HARRIES LW, WOLF CR, JONES PW, ALLDERSEA J, WORRALL SF, HAND P, FRYER AA, STRANGE RC: The glutathione S-transferase *GSTP1* polymorphism: effects on susceptibility to oral/pharyngeal and laryngeal carcinomas. *Pharmacogenetics* 1998; 8:1-6.

MATTOSO KQ: *Ser escravo no Brasil São Paulo: Brasiliense, 1982.*

McLELLAN LI, WOLF CR: Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries. Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 1999, 2:153-164.

MEISTER A, ANDERSON ME: Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 1983; 52:711-60

MEYER UA, ZANGER UM: Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Ver Pharmacol Toxicol* 1997; 37:269-296.

MILLER MS, MCCARVER DG, BELL DA, EATON DL, GOLDSTEIN JA: Genetic polymorphisms in human drug metabolic enzymes. *Fundam Appl Toxicol* 1997; 40:1-14

MILLIKAN R, PITTMAN G, TSE CK, SAVITZ DA, NEWMAN B, BELL D: Glutathione S-transferases M1, T1 and P1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:567-573.

MOSCOW JA, TOWNSEND AJ, GOLDSMITH ME, WHANG-PENG J, VICKERS PJ, POISSON R, LEGAULT-POISSON S, MYERS CE, COWAN KH: Isolation of the human anionic Glutathione S-transferase cDNA and the relation of its gene expression to estrogen-receptor content in primary breast cancer. *Proc Nat Acad Sci* 1988; 85:6518-6522.

MUELLER LA, GOODMAN CD, SILADY RA, WALBOT V: AN9, a petunia Glutathione S-transferase required for anthocyanin. *Plant Physiology* 2000; 123:1561-1570.

MÜLLAUER L, GRUBER P, SEBINGER D, BUCH J, WOHLFART S, CHOTT A: Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res* 2001; 488:211-231.

NAZAR-STEWART V, VAUGHAN TL, STAPLETON P, VAN LOO J, NICOLBLADES B, EATON DLA: Population-based study of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 genotypes and risk for lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 40:247-258.

NEBERT DW, MCKINNON RA, PUGA A: Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 1996; 15: 273-280.

NEBERT DW: Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mut Res* 1991; 247:267-281.

NEBERT DW, ROE AL: Ethnic and genetic differences in metabolism genes and risk of toxicity and cancer. *Sci Total Environ* 2001; 274:93-102.

NEUEFEIND T, HUBER R, DASENBROCK H, PRADE L, BIESELER B: Crystal structure of herbicide-detoxifying maize Glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: evidence for an induced-fit mechanism. *Journal of Molecular Biology* 1997; 274:446-53

PANDYA U, SRIVASTAVA, SK, SINGHAL SS, PAL A, AWASTHI S, ZIMNIAK P, AWASTHI YC, SINGH SV: Activity of allelic variants of Pi class human Glutathione S-transferase toward chlorambucil. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 258-262.

PARRA FC, AMADO RC, LAMBERTUCCI JR, ROCHA J, ANTUNES CM, PENA SDJ: Color and genomic ancestry in Brazilians. *Genetics* 2002; 100:177-182.

PEMBLE S, SCHROEDER KR, SPENCER SR, MEYER DJ, HALLIER E, BOLT HM, KETTERER B, TAYLOR JB: Human Glutathione S-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994; 300:271-276.

PERERA FP: Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility risk assessment and prevention. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:496-509.

PUGA A, NEBERT DW, MCKINNON RA, MENON AG: Genetic polymorphisms in human drug-metabolizing enzymes: potential uses of reverse genetics to identify genes of toxicological relevance. *Crit Rev Toxicol* 1997; 27:199-222.

RANSON H, PRAPANTHADARA L, HEMINGWAY J: Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT-resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal* 1997; 324:97-102

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 – a review. *Gene* 1995; 159:13-121.

REBBECK, TR. Molecular epidemiology of the human Glutathione S-transferase genotypes *GSTM1* and *GSTT1* in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol, Biom and Prevent* 1997; 6:733-743.

REINEMER P, PRADE L, HOF P, NEUEFEIND T, HUBER R, ZETTL R, PALME K, SCHELL J, KOELLN I, BARTUNIK HD, BIESELER B: Three-dimensional structure of Glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant Glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *Journal of Molecular Biology* 1996; 255:289-309.

ROODI N, DUPONT WD, MOORE JH, PARL FF: Association of homozygous wild-type Glutathione S-transferase M1 genotype with increased breast cancer risk. *Cancer Res* 2004; 64: 1233-1236.

ROSSINI A, RAPOZO DCM, AMORIM LMF, MACEDO JMB, MEDINA R, NETO JFN, GALLO CVM, PINTO LFR: Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res* 2002; 1:233-240.

RYBERG D, SKAUG V, HEWER A, PHILLIPS DH, HARRIES LW, WOLF CR, OGREID D, ULVIC A, VU P, HAUGEN A: Genotypes of Glutathione S-transferase M1 e P1 and significance for lung DNA adducts levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 1997; 60:284-295.

SALINAS AE, WONG MG: Glutathione S-transferases – A review *Current Medicinal Chemistry* 1999; 6:279-309.

SALZANO FM, FREIRE-MAIA N: Populações Brasileiras: aspectos demográficos, genéticos e antropológicos. Companhia Editora Nacional São Paulo, 1967.

SALZANO FM, CALLEGARI-JACQUES SM: South American Indians. A case Study in Evolution Oxford: Clarendon Press 1988.

SALZANO FM, BORTOLINI MC: Genetics and evolution of latin american populations. CAMBRIDGE: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 2002. 552 p.

SHEEHAN D, MEADE G, FOLEY VM, DOW DCA: Structure function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 2001; 360:1-16.

SHIMADA T, FUJII-KURIYAMA Y: Metabolic activation of polycyclic aromatic: 77 hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci* 2004; 95:1-6.

STUCKER I, HIRVONEN A, DE WAZIERS I, CABELGUENNE A, MITRUNEN K, CENEE S, KOUM-BESSON E, HEMON D, BEAUNE P, LORiot MA: Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2002; 23:1475-81.

STRANGE RC, FRYER AA: The Glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publications 1999; 148: 231-249.

TANG AH, TU CPD: Biochemical characterization of *Drosophila* Glutathione S-transferases D1 and D2 *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:27876-84.

TEW KD: Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Research* 1994; 54:4313-20.

THIER R, BRUNING T, ROOS PH, RIBS HP, GOLKA K, KO Y, BOLT HM: Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected *CYP*, *NAT* and *GST* genes. *Int J Environ Health* 2003; 206:149-171.

VAN POPPEL G, DE VOLGEL N, VAN BLADEREN PJ, KOK FJ: Increased cytogenetic damage in smokers deficient in Glutathione S-transferase isozyme mu. *Carcinogenesis* 1992; 13:303-305.

VENITT S: Mechanisms of carcinogenesis and individual susceptibility to cancer. *Clin Chem* 1994; 407:1421-1425.

VIANA-FILHO LO: Negro na Bahia 3^a ed Rio de Janeiro: Nova Fronteira 1988.

VINEIS P, MALATS N, LANG M, D'ERRICO A, CAPORASO N, CUZICK J, BOFFETA P: Metabolic polymorphism and susceptibility to cancer. *IARC Scie Publ n 148*, 1999.

WILCE MCJ, PARKER MW: Structure and function of Glutathione S-transferases. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1205:1-18.

WILKINSON J, CLAPPER ML: Detoxification enzymes and chemoprevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 216:192-200.

WORMHOUDT LW, COMMANDEUR JNM, VERMEULEN NPE: Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase cytochrome P450, Glutathione S-transferase and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotics metabolism and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1999; 29:59-124.

WÜNSCH VF, GATTÁS GJF: Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. *Cad Saúde Pública* 2001;17:467-480.

XU S, WANG Y, ROE B, PEARSON WR: Characterization of the human class Mu Glutathione S-transferase gene cluster and the *GSTM1* deletion. *J Biol Chem* 1998; 273:3517-3527.

ZHONG S, WYLLIE AH, BARNES D, WOLF CR, SPURR NK: Relationship between the *GSTM1* genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 1993; 14:1821-4.

9. Apêndice

APÊNDICE 1 –	DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DAS VARIANTES <i>GSTM1</i> - E <i>GSTT1</i> - DE AMOSTRAS DE DIFERENTES POPULAÇÕES.....	62
APÊNDICE 2 –	DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DA VARIANTE <i>GSTP1*B</i> DE AMOSTRAS DE DIFERENTES POPULAÇÕES.....	63
APÊNDICE 3 –	DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DAS VARIANTES DOS GENES <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> E <i>GSTP1</i> NA POPULAÇÃO BRASILEIRA.....	64

APÊNDICE 1. Distribuição das frequências alélicas e genóticas das variantes *GSTM1*0* e *GSTT1*0* de amostras de diferentes populações.

População	Nº Total de Indivíduos	Frequências de <i>GSTM1*0</i>	Nº Total de Indivíduos	Frequências de <i>GSTT1*0</i>	Referências
<i>Europeus e Euro-descendentes</i>					
Europeus e Euro-descendentes	10.514	0,531 (5.583)	5.577	0,104 (580)	GARTE et al. (2001)
Europeus e Euro-descendentes	1.981	0,513 (1.016)	1.026	0,186 (191)	RAIMONDI et al. (2005)
Euro-americanos	1.282	0,498 (639)	839	0,168 (141)	TAIOLI et al. (2003)
Finlandeses	478	0,418 (200)	478	0,132 (63)	MITRUNEN et al. (2001)
Islandeses	395	0,542 (214)	395	0,205 (81)	GUDMUNDSDOTTIR et al. (2001)
Euro-americanos	369	0,520 (192)	373	0,164 (61)	MILLIKAN et al. (2000)
Poloneses	321	0,511 (164)	316	0,193 (61)	GAJECKA et al. (2005)
Franceses	211	0,555 (117)	211	0,190 (40)	LONGUEMAUX et al. (1999)
Euro-americanos	168	0,452 (76)	168	0,125 (21)	OLSHAN et al. (2000)
Total e Média	15.719	0,504±0,044	9.383	0,163±0,036	
<i>Africanos e Afro-descendentes</i>					
Africanos e Afro-descendentes	479	0,265 (127)	-	-	GARTE et al. (2001)
Afro-americanos	259	0,278 (72)	259	0,166 (43)	MILLIKAN et al. (2000)
Afro-americanos	120	0,200 (24)	-	-	FORD et al. (2000)
Africanos (Tanzânia)	114	0,333 (38)	114	0,254 (29)	DANDARA et al. (2002)
Total e Média	972	0,269±0,055	373	0,210±0,063	
<i>Asiáticos</i>					
Asiáticos	1.511	0,529 (799)	575	0,470 (270)	GARTE et al. (2001)
Japoneses	634	0,506 (321)	-	-	YOKOYAMA et al. (2002)

APÊNDICE 2. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas da variante *GSTP1*B* de amostras de diferentes populações.

População	Nº Total de Indivíduos	Frequências Alélicas	Frequências Genótípicas (Nº de Indivíduos)			Referências
			*A/A	*A/B	*B/B	
<i>Europeus e Euro-descendentes</i>						
Europeus e Euro-descendentes	1.138	0,288	0,490 (558)	0,442 (503)	0,068 (77)	GARTE et al. (2001)
Finlandeses	481	0,259	0,553 (266)	0,376 (181)	0,071 (34)	MITRUNEN et al. (2001)
Euro-americanos	408	0,180	0,672 (274)	0,296 (121)	0,032 (13)	GAEDIGK et al. (2002)
Islandeses	395	0,334	0,448 (177)	0,435 (172)	0,117 (46)	GUDMUNDSDOTTIR et al. (2001)
Euro-americanos	368	0,306	0,484 (178)	0,421 (155)	0,095 (35)	MILLIKAN et al. (2000)
Franceses	189	0,310	0,492 (93)	0,397 (75)	0,111 (21)	LONGUEMAUX et al. (1999)
Euro-americanos	168	0,357	0,405 (68)	0,476 (80)	0,119 (20)	OLSHAN et al. (2000)
Italianos	153	0,291	0,503 (77)	0,412 (63)	0,085 (13)	DUFOUR et al. (2005)
Total e Média	3.300	0,291±0,049				
<i>Africanos e Afro-descendentes</i>						
Afro-americanos	247	0,508	0,219 (54)	0,546 (135)	0,235 (58)	MILLIKAN et al. (2000)
<i>Asiáticos</i>						
Chineses (Taiwan)	254	0,207	0,630 (160)	0,327 (83)	0,043 (11)	LEE et al. (2000)
Coreanos	171	0,187	0,661 (113)	0,304 (52)	0,035 (6)	KIM et al. (2004)
Japoneses	164	0,165	0,689 (113)	0,293 (48)	0,018 (3)	MORITA et al. (1998)
Chineses	150	0,217	0,607 (91)	0,353 (53)	0,040 (6)	TAN et al. (2000)
Total - Média	739	0,194±0,018				

APÊNDICE 3. Distribuição das frequências alélicas e genóticas das variantes dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* na população brasileira.

Região	Nº Total de Indivíduos	Freq. Genotípica de <i>GSTM1</i>		Freq. Genotípica de <i>GSTT1</i>		Freq. de <i>GSTP1</i> *B	Freq. Genotípica de <i>GSTP1</i>			Referência
		<i>GSTM1</i> +	<i>GSTM1</i> *0	<i>GSTT1</i> +	<i>GSTT1</i> *0		*A/A	*A/B	*B/B	
<i>Euro-brasileiros</i>										
Sudeste (São Paulo)	130	0,450 (58)	0,550 (72)	0,815 (106)	0,185 (24)	-	-	-	-	ARRUDA et al. (1998)
Sudeste (São Paulo)	233	0,446(104)	0,554 (129)	0,777 (181)	0,223 (52)	-	-	-	-	GATTÁS et al. (2004)
Sul (Paraná)	95	0,463 (44)	0,537 (51)	0,705 (67)	0,295 (28)	-	-	-	-	TORREZAN (2006)
Sul (Paraná)	85	-	-	-	-	0,330	0,482 (41)	0,376 (32)	0,142 (12)	OLIVEIRA (2006)
Sudeste (Rio de Janeiro)	319	0,511 (163)	0,489 (156)	0,749 (239)	0,251 (80)	0,315	0,514 (164)	0,342 (109)	0,144 (46)	ROSSINI et al. (2002)
Sul (Rio Grande do Sul)	90	0,500 (45)	0,500 (45)	0,789 (71)	0,211 (19)	0,278	0,522 (47)	0,400 (36)	0,078 (7)	KVITKO et al. (2006)
<i>Afro-brasileiros</i>										
Nordeste (Bahia)	117	0,670 (78)	0,330 (39)	0,810 (95)	0,190 (22)	-	-	-	-	ARRUDA et al. (1998)
Sudeste (São Paulo)	137	0,672 (92)	0,328 (45)	0,737 (101)	0,263 (36)	-	-	-	-	GATTÁS et al. (2004)
Sudeste (Rio de Janeiro)	272	0,658 (179)	0,342 (93)	0,743 (202)	0,257 (70)	0,309	0,478 (130)	0,426 (116)	0,096 (26)	ROSSINI et al. (2002)
Sul (Rio Grande do Sul)	100	0,660 (66)	0,340 (34)	0,720 (72)	0,280 (28)	0,420	0,290 (29)	0,580 (58)	0,130 (13)	KVITKO et al. (2006)

(n) – número de indivíduos; (-) – Dados não disponíveis;