

CASSIO CARDOSO FILHO

**Influência dos polimorfismos dos alelos Mu 1 (*GSTM1*) e
Theta 1 (*GSTT1*) do sistema da glutathione S-transferase
na susceptibilidade ao câncer de mama esporádico**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. MARIA SALETE COSTA GURGEL

**Unicamp
2007**

CASSIO CARDOSO FILHO

**Influência dos polimorfismos dos alelos Mu 1 (*GSTM1*) e
Theta 1 (*GSTT1*) do sistema da glutathione S-transferase
na susceptibilidade ao câncer de mama esporádico**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Tocoginecologia.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. MARIA SALETE COSTA GURGEL

**Unicamp
2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C179i Cardoso Filho, Cassio
 Influência dos polimorfismos dos alelos Mu 1
 (GSTM1) e Theta 1 (GSTT1) do sistema da glutathione
 S – transferase na susceptibilidade ao câncer de
 mama esporádico / Cássio Cardoso Filho. Campinas,
 SP: [s.n.], 2007.

 Orientador: Maria Salete Costa Gurgel
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Mamas - Cancer. 2. Polimorfismos (Genética).
 3. Glutathione transferase. I. Gurgel, Maria Salete
 Costa. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: CASSIO CARDOSO FILHO

Orientadora: Prof^a. Dr^a. MARIA SALETE COSTA GURGEL

Membros:

1. *Ne Sal bone*
2. *Cassio Mendes*
3. *Maya*

Dedico este trabalho...

Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 13/07/2007

*das as mulheres que sofrem as mazelas do câncer mamário,
e a todos aqueles que buscam minimizar as
dores e consequências causadas por esta doença.*

Dedico este trabalho...

***A todas as mulheres que sofrem as mazelas do câncer mamário,
e a todos aqueles que buscam minorar as
dores e consequências causadas por esta doença.***

Agradecimentos

A Deus, Uno e Trino, pelo AMOR incondicional por todos nós.

Aos meus pais, Cassio e Hilda, pelo dom da vida, e aos meus irmãos, Rodrigo e Leandro, pela companhia nesta estrada.

A minha amada esposa Adriana, parte de uma insondável tríplice aliança com Deus.

Aos professores de todas as minhas etapas de formação, pelo exemplo de ensinar e aprender, em especial à Profa. Dra. Maria Salete Costa Gurgel, pela atenção e paciência dispensadas em cada preciosa orientação.

A todos os colegas de trabalho e de pesquisa, em especial ao Prof. Gustavo Lourenço e à Profa. Dra. Carmen S. P. Lima, coletores de frutos de esperança.

Agradecimentos Institucionais

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
pelo financiamento parcial deste estudo através do auxílio-pesquisa –
FAPESP 2004/06319-0 - ***Influência dos
polimorfismos gênicos na susceptibilidade a tumores sólidos.***

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPEX)
da Universidade Estadual de Campinas pelo financiamento parcial
deste estudo através do auxílio-pesquisa 101/05.

“Sem música, a vida seria um erro”

Friedrich Nietzsche

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Summary	xiii
1. Introdução	15
1.1. Considerações Gerais	15
1.2. Fatores Prognósticos	18
1.3. Aspectos genéticos – Sistema da Glutathione S-transferase	20
2. Objetivos	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. Publicação	26
4. Conclusões	50
5. Referências Bibliográficas	51
6. Bibliografia de Normatizações	60
7. Anexos	61
7.1. Anexo 1 – Check List	61
7.2. Anexo 2 – Ficha para coleta de dados	62
7.3. Anexo 3 – Carta de aprovação do projeto CP - DTG – FCM – Unicamp	63
7.4. Anexo 4 – Carta de aprovação do projeto no CEP – FCM – Unicamp	64
7.5. Anexo 5 – Carta de aprovação do projeto no CONEP	66
7.6. Anexo 6 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (casos)	67
7.7. Anexo 7 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (doadores)	68
7.8. Anexo 8 – Planilhas de cálculos do tamanho amostral dos polimorfismos do sistema GST	69

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CM	Câncer de mama
CME	Câncer de mama esporádico (não-familiar)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio-padrão
DTG	Departamento de Tocoginecologia
EBCTCG	<i>Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group</i>
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GST	Sistema da glutathione S-transferase
GSTM1	Gene μ 1 do sistema da glutathione S-transferase
GSTP1	Gene π 1 do sistema da glutathione S-transferase
GSTT1	Gene θ 1 do sistema da glutathione S-transferase
IC	Intervalo de confiança

INCA	Instituto Nacional de Câncer
MS	Ministério da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i> (razão de chances)
p	Significância estatística
PCR	Reação em cadeia da polimerase
TH	Terapia hormonal
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Introdução: As deleções dos genes *GSTM1* e *GSTT1* têm sido associadas ao aumento do risco de várias neoplasias, porém não há consenso sobre suas influências no câncer de mama. **Objetivo:** Avaliar a ocorrência das deleções homozigóticas dos *GSTM1* e *GSTT1* em mulheres com câncer de mama esporádico (CME) – casos - e em mulheres sem câncer – controles - e comparar as características clínicas e biológicas dos CME entre mulheres portadoras e não-portadoras das referidas deleções. **Casuística e Método:** Foram avaliados 177 casos e 169 controles, com determinação das freqüências das referidas deleções pelo PCR. Estas foram correlacionadas às características clínicas e biológicas através do cálculo de *odds ratio* com seus respectivos intervalos de confiança de 95%. **Resultados:** Dos casos e controles, respectivamente, 46% e 45% não apresentaram qualquer deleção, 37% e 35% apenas do *GSTM1*, 11% e 10% apenas do *GSTT1*, 6% e 9% apresentaram ambos os genes deletados. Observou-se freqüência menor da deleção do *GSTM1* em mulheres pardas ($p=0,1128$), $OR=0,48$ ($0,24 - 0,98$). O risco foi menor de ocorrência de tumores grau nuclear 3 em pacientes com deleção do *GSTT1* ($p=0,04$), $OR=0,37$ ($0,15 - 0,90$). A deleção homozigótica de pelo menos um dos genes associou-se com mulheres

que não amamentaram ($p=0,0202$), $OR=0,41$ ($0,19 - 0,88$), e com a ausência de expressão dos receptores hormonais ($p=0,0300$), $OR_{adj}=2,25$ ($1,03 - 4,90$). Já a deleção de ambos os genes associou-se ao aumento de risco da ocorrência de tipos histológicos diferentes do carcinoma ductal invasivo clássico ($p=0,0571$), $OR_{adj}=12,09$ ($1,03 - 142,03$). **Conclusões:** mulheres com CME e antecedente de miscigenação com etnia negra tiveram menor frequência da deleção do *GSTM1*, enquanto os tumores com grau de diferenciação nuclear mais favorável relacionaram-se à deleção do *GSTT1*. Já as pacientes com pelo menos um dos genes deletados apresentaram maior risco de tumores que não expressam receptores hormonais, e a deleção combinada de ambos os genes associou-se ao aumento de risco para tipo histológico não ductal clássico.

Palavras-chave: câncer de mama; polimorfismos genéticos; glutathione S-transferase; *GSTM1*; *GSTT1*.

Summary

Introduction: The *GSTM1* and *GSTT1* gene deletions have been associated with an increased risk of various neoplasms, although there is a lack of consensus about their influence on breast cancer. **Objective:** To evaluate the occurrence of homozygous deletions of the *GSTM1* and *GSTT1* genes in women with sporadic breast cancer (SBC) – cases – and in women without cancer – controls - and compare the clinical and biological characteristics of SBC among women with and without the referred deletions. **Case Study and Method:** The study evaluated 177 cases and 169 controls, determining the frequency of the above-mentioned deletions by PCR. These were correlated with the clinical and biological characteristics by calculating the odds ratios and their 95% confidence intervals. **Results:** Of the cases and controls, 46% and 45% did not present any deletion, 37% and 35% had only *GSTM1* deletion, 11% and 10% had only *GSTT1* deletion, 6% and 9% had both genes deleted, respectively. A lower frequency of *GSTM1* deletion was observed in mulatto women ($p=0.1128$), OR=0.48 (0.24 – 0.98). The risk of occurring nuclear grade 3 tumors was lower in patients with *GSTT1* deletion ($p=0.04$), OR=0.37 (0.15 – 0.90). Homozygous deletion of at least one gene was associated with women who had not breastfed ($p=0.0202$),

OR=0.41 (0.19 – 0.88), and with absence of hormone receptor expression (p=0.0300), ORadj=2.25 (1.03 – 4.90). The deletion of both genes was associated with an increased risk of occurring histologic types different from classic invasive ductal carcinoma (p=0.0571), ORadj=12.09 (1.03 – 142.03). **Conclusions:** women with SBC and a history of miscegenation with the black race had a lower frequency of *GSTM1* deletion, while tumors with a more favorable degree of nuclear differentiation were related to *GSTT1* deletion. Patients with at least one gene deleted had a higher risk for tumors that did not express hormone receptors, and the combined deletion of both genes was associated with a greater risk for the non-classic ductal histologic type.

Keywords: breast cancer; genetic polymorphisms; glutathione S-transferase; *GSTM1*; *GSTT1*.

1. Introdução

1.1. Considerações Gerais

Dentre todas as neoplasias que acometem as mulheres, o câncer de mama (CM) tem-se apresentado mundialmente como o segundo mais freqüente, com elevação de suas taxas de incidência (variação percentual relativa de 80% nos últimos 30 anos), e é a principal causa de morte por neoplasia entre as mulheres brasileiras. Nos Estados Unidos da América foram estimados, para 2007, 178.480 casos novos de CM, com 40.460 óbitos decorrentes desta neoplasia (Ries et al., 2007). O número de casos novos de CM esperados para o Brasil em 2006 foi de 48.930, com uma incidência estimada de 52 casos a cada 100 mil mulheres, com aproximadamente 60% da casuística dos registros hospitalares composta por casos diagnosticados em estágios avançados (Brasil, 2006).

Alguns aspectos genéticos, epidemiológicos e ambientais têm sido aventados para justificar o aumento gradual, porém constante, na incidência do CM nos últimos 50 anos. Destes, ressaltam-se o envelhecimento da população, decorrente de ações sociais de saúde que evitam mortes prematuras (Kelsey, 1993), e o

estabelecimento de novos padrões reprodutivos e hormonais nas últimas décadas, com aumento do número de ciclos ovulatórios vivenciados pelas mulheres durante a sua vida (Pike et al., 1983; Russo e Russo, 1987; Hardy et al., 1993; Kelsey, 1993).

Nesta linha, tornam-se explicáveis as associações epidemiológicas observadas entre menarca precoce (antes dos 12 anos), menopausa tardia (após os 54 anos), idade tardia da primeira gravidez a termo (após os 30 anos de idade) e aumento do risco da neoplasia e a associação protetora da lactação (Dumitrescu e Cotarla, 2005). Além destes, está estabelecido o aumento de risco com o uso de terapia hormonal (TH) por mais de cinco anos consecutivos, mormente com os esquemas que utilizam estrogênios conjugados associados a progestagênios sintéticos de uso contínuo (Rossouw et al., 2002).

Dieta rica em gordura, ganho de peso na pós-menopausa e obesidade também estão elencados como fatores de risco para o CM (Dumitrescu e Cotarla, 2005), assim como o consumo de álcool acima de duas doses ao dia parece aumentar este risco, possivelmente pelo aumento de precursores de carcinógenos por vias ainda não completamente determinadas (Singletary e Glapstur, 2001).

Quanto ao hábito de fumar, os dados são controversos, uma vez que não existem mecanismos biológicos que expliquem possíveis associações, além da disparidade dos estudos quanto à quantificação do número de cigarros consumidos, população, tempo de uso, fumo ativo ou passivo, outros fatores de risco associados (Coyle, 2004; Terry e Rohan, 2002; Nagata et al., 2006).

Em relação ao componente racial, parece haver uma associação entre o CM em mulheres não-brancas na população estadunidense ajustada por idade, com risco relativo de 1,3 para as não-brancas (Maxwell e Risinger, 2006); mas as dificuldades e os desafios na obtenção de informações precisas sobre dados étnicos e possível miscigenação permanecem na literatura (Tammemagi, 2007).

Dentre os aspectos genéticos, 10% a 15% dos casos de CM têm história familiar positiva para a doença, sendo que apenas 5% podem ser explicados pelas raras, mas de grande penetrância genética, mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2* (Newman et al., 1988; Peto et al., 1996; Levy-Lahad e Friedman, 2007). Isto leva a crer que há outras variações genéticas comuns, de baixa penetrância, que influenciam a predisposição ao CM.

Recentes estudos na literatura têm aumentado as evidências de que polimorfismos genéticos de baixa penetrância podem aumentar o risco do CM, apesar do impacto em termos de prevenção ainda ser desconhecido (Tempfer et al., 2006). Outros estudos ressaltam, ainda, a importância do estabelecimento das “assinaturas gênicas” dos tumores de mama na particularização do prognóstico e dos tratamentos dispensados a cada subgrupo de pacientes, por exemplo, usando kits comerciais, como o *Oncotype-Dx*[®] (Genomic Health, Redwood City, CA, USA), que analisa 21 polimorfismos genéticos, dentre eles o *GSTM1* (Paik et al., 2004; Kaklamani e Gradishar, 2006; Kaklamani, 2006; Paik et al., 2006).

Há dois grupos principais de genes potenciais candidatos aos papéis relatados acima (Dunning et al., 1999): aqueles que codificam proteínas envolvidas

no metabolismo dos hormônios esteróides (*CYP17*, *CYP19*) e outros relacionados à expressão de enzimas envolvidas no processo de carcinogênese (*CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *NAT1*, *NAT2*).

Cumpra ressaltar a possível interação entre fatores ambientais-epidemiológicos e genéticos, potencializando o risco do desenvolvimento do CM: fatores de risco relacionados à maior exposição estrogênica ou tabagismo, e as mutações de baixa penetrância (Zheng et al., 2002a).

1.2. Fatores Prognósticos

A fim de padronizar o acompanhamento dos casos de CM, no que tange ao diagnóstico, aplicabilidade de técnicas terapêuticas e prognóstico, utiliza-se o sistema de estadiamento do American Joint Committee on Cancer (Singletary et al., 2002). Este sistema considera a extensão do acometimento do tumor na mama e em tecidos adjacentes, como a pele e a parede torácica (T), a identificação da presença de metástases para linfonodos regionais como cadeias axilares, mamilária interna, infraclavicular e fossa supraclavicular (N) e a identificação da presença de metástases a distância (M). Oito faixas denominadas estádios podem ser determinadas (estádios 0, I, IIa, IIb, IIIa, IIIb, IIIc e IV), com as probabilidades de sobrevida em cinco anos decrescentes de 92% a menos de 13%. Com base em registros hospitalares brasileiros, aproximadamente 60% das mulheres têm o CM diagnosticado em fase avançada - estádios III e IV (Brasil, 2003) - onde a sobrevida em cinco anos varia de 13% a 40%, a despeito dos avanços terapêuticos.

A progressão do CM primário varia independentemente do poder preditivo do estadiamento. Parte dessas variações é explicada por fatores prognósticos, que conferem diferenças nas taxas de crescimento do tumor, poder de invasão, potencial metastático e outros mecanismos ainda não completamente conhecidos (Cianfrocca e Goldstein, 2004).

Podem ser divididos em fatores anatomopatológicos e biológicos. Dentre os anatomopatológicos tem-se o tipo histológico (Rosen e Oberman, 1993), grau de diferenciação tumoral (Bloom e Richardson, 1957; Scarff, 1968; Frierson et al., 1995), estado linfonodal axilar (Fisher et al., 1983; Mittra e MacRae, 1991), tamanho tumoral (Clark e McGuire, 1989) e angiogênese peri-tumoral, relacionada diretamente com pior prognóstico nas mulheres com CM (Gasparini et al., 1994). Quanto aos fatores prognósticos biológicos, mais estudados nos últimos 20 anos, estes adquirem maior expressão nas mulheres sem acometimento linfonodal axilar, onde exercem papel selecionador de mulheres de maior risco para recidiva (Mirza et al., 2002). São eles: expressão de receptores hormonais de estrogênio e progesterona, índice de atividade proliferativa (índice de marcação, citofluorometria na fase S, Ki 67), ploidia ou índice de DNA, receptores para fatores de crescimento (EGF-R, IGF-IR, SS-R receptor de somatostatina, TGF), oncogenes (Her-2-Neu, *p53*, BCL2), catepsina D, e outros (Cattoretti et al., 1988; Lovekin et al., 1991; Gasparini et al., 1992; Toikkanen et al., 1992; Martinazzi et al., 1993; Mirza et al., 2002). É necessário maior conhecimento sobre a biologia molecular do tumor para tentar identificar quais os fatores isolados, ou em associação com os já bem estabelecidos, que poderiam prever a evolução da doença.

1.3. Aspectos genéticos – Sistema da Glutathione S-transferase

As glutathione S-transferases constituem uma família de enzimas detoxificantes, que fazem parte do mecanismo de proteção contra a carcinogênese química, por catalisar a conjugação de moléculas eletrofílicas de carcinógenos à glutathione, reduzindo-os, quase sempre, a produtos menos tóxicos (Hayes e Pulford, 1995; Landi, 2000). Alguns vegetais crucíferos, como o brócolis e a couve-de-bruxelas (Lin et al., 1998), e o café (Slattery et al., 2000) foram descritos como indutores da produção das GSTs ou ativadores destas enzimas. Os isotiocianatos e indóis de vegetais crucíferos, hipoteticamente, reduziram o risco de ocorrência do câncer atribuído à exposição a carcinógenos por meio da ativação das GSTs. O tabagismo também foi descrito como um indutor da produção das GSTs. Este poderia constituir o seu efeito benéfico, pois altos níveis de GSTs parecem necessários aos fumantes para a detoxificação de carcinógenos provenientes do cigarro (Slattery et al., 2000).

Cinco classes de genes codificadores destas proteínas foram identificadas em humanos: alpha, mu, pi, sigma e theta (Hayes e Pulford, 1995; Parl, 2005). O gene *GSTM1*, da classe mu, compreende 5,9Kb de DNA genômico, contém 8 *éxons* e está localizado no braço curto do cromossomo 1, na região 1p13. Já o gene *GSTT1*, da classe theta, compreende 7,6Kb de DNA genômico, contém cinco *éxons* e está localizado no braço longo do cromossomo 22, na região 22q11. Os genes *GSTM1* e *GSTT1* são polimórficos em humanos, e estão ausentes ou deletados de forma homozigótica em 40 a 50% e 16% a 24% das diferentes populações étnicas, respectivamente (Hayes e Pulford, 1995; Nelson et al., 1995; Arruda et al., 1998), sendo que a deleção homozigótica do *GSTT1* pode

chegar a 80% em asiáticos (Landi, 2000). Tanto o *GSTT1* quanto o *GSTM1* estão expressos no tecido mamário (Kelley et al., 1994).

Indivíduos com a deleção homozigótica destes genes seriam mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças atribuídas à exposição a carcinógenos. A deleção homozigótica dos genes, isolada e combinadamente, foi associada com risco até seis vezes maior de ocorrência da leucemia mielóide aguda (Arruda et al., 2001). Sharma et al. (2006) evidenciaram modulação de efeitos entre câncer da cavidade oral relacionado ao tabagismo e deleção homozigótica do *GSTT1*. Entretanto, vários tumores sólidos e hematológicos vêm sendo estudados, com resultados na literatura não mostrando aumento do risco associado à deleção dos alelos do GST. Na população brasileira, não se observou aumento de risco em relação a: leucemia mielóide crônica (Lourenço et al., 2005), câncer colorretal esporádico (Nascimento et al., 2003), câncer de cabeça e pescoço (Goloni-Bertollo et al., 2006). Em recente meta-análise publicada, não se evidenciou correlação da deleção do *GSTT1* com o câncer de pulmão (Raimondi et al., 2006).

Ao mesmo tempo em que a expressão dos genes do GST seria benéfica por diminuir a chance de desenvolvimento de neoplasias de uma forma geral, pode também, em pacientes portadores de um câncer, propiciar maior resistência ao tratamento quimioterápico adjuvante, uma vez que essas drogas (ciclofosfamida, metotrexate, fluorouracil, doxirrubicina) seriam toxinas exógenas, com eliminação maior pelo GST, agindo assim com menor eficácia nas células tumorais (Hayes e Pulford, 1995). Yang et al. (2005) avaliaram a relação entre as deleções dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* em pacientes com CM e a sobrevida pós-quimioterapia.

Após cinco anos de acompanhamento, não houve diferença na sobrevida para pacientes que expressavam as do *GSTM1* e do *GSTT1*, porém as pacientes que apresentavam deleção homozigótica do *GSTP1* tiveram menor sobrevida.

Os resultados de estudos epidemiológicos prévios são controversos em relação ao CM. Alguns indicaram a associação da deleção homozigótica do gene *GSTM1* ao aumento do risco para CM (Zheng et al., 2002b), associação esta não observada por outros autores (Curran et al., 2000; Millikan et al., 2000); associação inversa (diminuição do risco para CM em mulheres com a deleção homozigótica do gene *GSTM1*) foi observada em outros estudos (Roodi et al., 2004). Sull et al. (2004), incluindo os trabalhos citados acima em meta-análise (total de 30 estudos selecionados), concluíram pelo aumento do risco frente à deleção homozigótica do gene *GSTM1*, em especial nas pacientes pós-menopausadas; ressaltada a limitação da distribuição heterogênea do polimorfismo nas diferentes populações étnicas.

A deleção homozigótica do gene *GSTT1* também foi associada ao aumento significativo do risco de CM por Zheng et al. (2002b), o que não se repetiu em outros estudos (Curran et al., 2000; Millikan et al., 2000; Gudmundsdottir et al., 2001; Krajcinovic et al., 2001; Amorim et al., 2002), mesmo em análises ampliadas (Vogl et al., 2004).

Também a deleção combinada dos genes *GSTM1* e *GSTT1* esteve associada ao aumento do risco de CM em alguns estudos (Gudmundsdottir et al., 2001; Mitrunen, et al., 2001; Amorim et al., 2002), porém não em outros

(Curran et al., 2000; Millikan et al., 2000). Por outro lado, menor risco de ocorrência do CM foi observada por Ambrosone et al. (2001) em mulheres com a deleção combinada dos genes *GSTM1* e *GSTT1* do que em mulheres com a presença de ambos os genes. Menor taxa de mortalidade associada à doença foi também observada, pelos mesmos autores, em mulheres com a deleção combinada dos genes, em relação à taxa de mortalidade observada em mulheres com a presença de ambos os genes.

Ainda há a postulação de que a presença dos alelos dos genes do GST favoreceria a sobrevivência das células tumorais, aumentando a resistência ao estresse oxidativo e aos mecanismos de apoptose (Perquin et al., 2001). A associação da deleção homozigótica do gene *GSTT1* com o tabagismo iniciado em idade precoce favoreceria a ocorrência de CM na pós-menopausa (Zheng et al., 2002a).

Não se encontra estabelecido se ocorrem associações das deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* com variáveis clínico-patológicas de mulheres com CM, como idade de manifestação da doença, etnia, tabagismo (Zheng et al., 2002a), etilismo (Zheng et al., 2003), extensão de acometimento do tumor, grau de diferenciação do tumor, estado dos receptores hormonais (Park, 2003) e outros.

Enfim, o desenvolvimento do CM é multifatorial, no qual componentes genéticos, ambientais e biológicos estão imbricados na sequência de eventos da diferenciação tumoral. Dentre os componentes genéticos existe pouca informação

sobre o papel dos polimorfismos de baixa penetrância na gênese desta neoplasia, em sua forma esporádica (não-familiar). Os papéis desempenhados pelas deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* no risco de ocorrência do CM e suas associações com os aspectos clínicos das mulheres e anatomopatológicos do tumor não estão suficientemente definidos.

A falta de conhecimento acerca destes componentes não permite programar a abordagem diagnóstica, nem planejar adequadamente o tratamento de mulheres com CME, o que se reflete no desfecho desta doença.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a ocorrência das deleções homozigóticas dos genes *M1* e *T1* do GST em mulheres portadoras de CME e em mulheres sem CM, e verificar se a ocorrência das deleções está associada com fatores clínicos ou biológicos do tumor.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar se a ocorrência das deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* se associa com a ocorrência de CME.
- Verificar se a ocorrência das deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* (e suas combinações) se associa às características clínicas das mulheres.
- Verificar se a ocorrência das deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* (e suas combinações) se associa às características biológicas do CME.

3. Publicação

From: natgen@natureny.com <natgen@natureny.com>
Date: Tue, 12 Jun 2007 14:30:10 UT
Subject: Receipt of NG-A21435 Cardoso-Filho
To: cardosofilho@gmail.com

IMPORTANT: Please note the reference number: NG-A21435 Cardoso-Filho. This number must be quoted whenever you communicate with us regarding this paper.

12th Jun 2007

Dear Dr. Cardoso-Filho,

Thank you for the submission entitled "Clinical and pathological implications of GSTM1 and GSTT1 gene deletions in sporadic breast cancer." Your file, NG-A21435 Cardoso-Filho, is now with the editors.

You may check the status of the paper by selecting the "Check manuscript status" link under the following URL:

<<http://mts-ng.nature.com/cgi-bin/main.plex?el=A4G5GrI4A3hnS2F5A956mR8m2btAkr7xXT9jWsQZ>>

We will contact you by email as soon as we have made a decision regarding publication. While we are happy to answer any inquiries regarding this paper, contacting the editorial office rarely has any impact on the duration of the assessment process. If you do find it necessary to contact our office, please do so by - EMAIL - stating the manuscript reference number. Nature Genetics corresponds only with the designated corresponding author of any single manuscript.

For your reference, please note that all published original primary research manuscripts, Reviews and Perspectives must contain a declaration of any competing financial interests. The declaration is required only when a paper is being accepted. Full details of the policy can be found at "<http://www.nature.com/nature/submit/policies/competing/index.html>"

Thank you,

Lawrence Jaskaran
Senior Editorial Assistant
Nature Genetics
natgen@natureny.com

This email has been sent through the NPG Manuscript Tracking System NY-610A-NPG&MTS.

Clinical and pathological implications of *GSTM1* and *GSTT1* gene deletions in sporadic breast cancer

Cassio Cardoso Filho¹, Maria Salete Costa Gurgel², Gustavo Jacob Lourenço³, Carmen Silvia Passos Lima⁴, Julia Yoriko Shinzato², Luiz Carlos Zeferino², Fernando Ferreira Costa⁴

1- Center for Women's Integrated Healthcare, Universidade Estadual de Campinas - CAISM/UNICAMP

2- Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine – DTG/FCM/UNICAMP.

3- Laboratory of Conventional and Molecular Cytogenetics – HEMOCENTRO/UNICAMP

4- Department of Clinical Medicine – DCM/FCM/UNICAMP

Study resulting from a Master's Dissertation, conducted at the Center for Women's Integrated Healthcare - CAISM/UNICAMP and HEMOCENTRO/UNICAMP.

Address for Correspondence:

Prof. Dr. Maria Salete Costa Gurgel

Caixa Postal 6081 - CEP – 13083-970

Cidade Universitária “Zeferino Vaz” - Barão Geraldo, Campinas, SP

Phone/fax: (19) 3521-9305

e-mail: salete@caism.unicamp.br

Financial support: FAPESP 2004/06319-0 and FAEPEX 101/05.

Summary

Introduction: The *GSTM1* and *GSTT1* gene deletions have been associated with an increased risk of various neoplasms, although there is a lack of consensus about their influence on breast cancer. **Objective:** To evaluate the occurrence of homozygous deletions of the *GSTM1* and *GSTT1* genes in women with sporadic breast cancer (SBC) – cases – and in women without cancer – controls – and compare the clinical and biological characteristics of SBC among women with and without the referred deletions.

Case Study and Method: The study evaluated 177 cases and 169 controls, determining the frequency of the above-mentioned deletions by PCR. These were correlated with the clinical and biological characteristics by calculating the odds ratios and their 95% confidence intervals. **Results:** Of the cases and controls, 46% and 45% did not present any deletion, 37% and 35% had only *GSTM1* deletion, 11% and 10% had only *GSTT1* deletion, 6% and 9% had both genes deleted, respectively. A lower frequency of *GSTM1* deletion was observed in mulatto women ($p=0.1128$), $OR=0.48$ (0.24 – 0.98). The risk of occurring nuclear grade 3 tumors was lower in patients with *GSTT1* deletion ($p=0.04$), $OR=0.37$ (0.15 – 0.90). Homozygous deletion of at least one gene was associated with women who had not breastfed ($p=0.0202$), $OR=0.41$ (0.19 – 0.88), and with absence of hormone receptor expression ($p=0.0300$), $OR_{adj}=2.25$ (1.03 – 4.90). The deletion of both genes was associated with an increased risk of occurring histologic types different from classic invasive ductal carcinoma ($p=0.0571$), $OR_{adj}=12.09$ (1.03 – 142.03).

Conclusions: women with SBC and a history of miscegenation with the the black race had a lower frequency of *GSTM1* deletion, while tumors with a more favorable degree of

nuclear differentiation were related to *GSTT1* deletion. Patients with at least one gene deleted had a higher risk for tumors that did not express hormone receptors, and the combined deletion of both genes was associated with a greater risk for the classic non-ductal histologic type.

Keywords: breast cancer; genetic polymorphisms; glutathione S-transferase; *GSTM1*; *GSTT1*.

Introduction

Among all the malignancies that affect women, breast cancer (BC) is the second most common neoplasm worldwide, with a relative variation in incidence rate of 80% in the last 30 years. It is the main cause of cancer death among Brazilian women (1).

It has been suggested that several genetic, epidemiological and environmental aspects may justify this gradual but steady rise in disease incidence (2). In about 10 to 15% of BC cases, there is a positive family history for the disease, and only 5% may be explained by the rare *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations (3,4,5), despite their high gene penetrance. Thus it can be assumed that there may be other common genetic variations of low penetrance, which influence predisposition to the disease, although the impact on prevention is still unknown (6).

Glutathione S-transferases (GSTs) are a family of detoxifying enzymes, which are part of a protective mechanism against chemical carcinogenesis, through catalytic conjugation of carcinogen electrophilic molecules to glutathione, reducing them virtually always to less toxic products (7). Five classes of genes encoding these proteins have been identified in humans: Alpha, Mu, Pi, Sigma and Theta (7,8). The GST Mu 1 (*GSTM1*) and GST Theta 1 (*GSTT1*) genes are polymorphic in humans and are absent or homozygously deleted in 40 to 50% and 16 to 24% of different ethnic populations, respectively (7,9,10).

Individuals with these deletions would be more susceptible to the development of neoplasms (7,11). Nevertheless, studies of various solid and hematological tumors have been conducted, with results showing that there was no increased risk associated with GST allele deletions (12,13,14,15).

In a meta-analysis, Sull et al. (2004) concluded that there was an increased risk of BC in the *GSTM1* deletion, especially among postmenopausal patients (16). However, these authors highlighted the limitation of results due to the heterogeneous distribution of polymorphism in different populations. Other studies are controversial regarding BC (17-26).

The roles of *GSTM1* and *GSTT1* deletions in the risk of BC occurrence and their associations with clinical (27,28) and histopathological (29) aspects are not sufficiently defined and knowledge of these components would permit a more adequate working plan regarding prevention, diagnosis and treatment of women with sporadic breast cancer (SBC).

Thus, the study proposed to know the proportion of women with SBC who have homozygous deletions of the *GSTM1* and *GSTT1* genes, in comparison to women without cancer, and verify whether these deletions are associated with clinical and biological characteristics.

Patients and Methods

Type of study

A case-control study was conducted to investigate 175 women with SBC, two with bilateral disease, totalling 177 cancer cases, sequentially examined at CAISM/UNICAMP from December 2002 to October 2004, and a control group of 169 healthy female blood donors (from a universe of 367 donors) who had been enrolled in the Blood Center of UNICAMP during the same period.

Selection of subjects

Women aged 25 years or older and with no previous personal history or family history of BC in a first-degree relative were included as controls. These same criteria were adopted for the case group, associated with the histopathological diagnosis of invasive breast carcinoma. Excluded were women who had no knowledge of their family history (adoption, in vitro fertilization), or those incapable of informing their clinical data.

These women were invited to participate in the study at the time of hospital admission for their surgical treatment, or at the time of blood donation. Peripheral blood was drawn for DNA analysis and study of GST polymorphisms.

This study was approved by the Ethics in Research Committee of the School of Medicine of UNICAMP and by the National Commission of Ethics in Research (CONEP), following the precepts of the Declaration of Helsinki (2004) and Resolution 196/96 of the National Council of Health (Brasil, 1996). All subjects signed an informed consent term, and no one refused to participate in the study.

Molecular analysis of the GST genes

Genomic DNA was prepared from peripheral blood samples by extraction with the GFX Genomic Blood DNA™ (Amersham Pharmacia Biotech) purification kit. Exons 4 and 5 of the *GSTM1* gene and exon 4 and intron 4 of the *GSTT1* gene were amplified by Multiplex polymerase chain reaction of (PCR) (30,31). A fragment of the beta globin gene, including exon 3 and sequence of introns 2 and 3, was amplified in the same reaction and served as control for the DNA sample (32).

The presence or homozygous deletion of the *GSTM1* and *GSTT1* genes were analyzed by electrophoresis in 2.0% agarose gel. Genotypes were evaluated only when a band corresponding to fragment amplification of the beta globin gene was identified (Figure 1).

Obtainment of clinical and biological characteristics

From review of the medical charts and interview to present the informed consent term, the following information was obtained: age, ethnic group, age at menarche, age at first full-term pregnancy, lactation, menstrual status, age at menopause, smoking, use of hormone therapy, clinical tumor staging, histologic type, histologic and nuclear grades, in addition to the expression of hormone receptors.

Ethnic group was the racial group in which each woman was self-assigned: white, no history of miscegenation, miscegenated (mulatto, or white with a history of miscegenation with the black ethnic group), black. Lactation was considered a history of having breastfed continuously for at least six months. Smoking was considered a habit of consuming at least one cigarette a day, or having quit smoking less than ten years previously.

Statistical analysis

The data collected was typed twice and the data bank was submitted to review and consistency analysis. A descriptive evaluation was made by calculation of the mean, standard deviation, median, absolute and relative frequencies. Associations between groups, deletion patterns and clinical/biological characteristics were assessed by the chi-square and Fisher exact tests. To estimate risks, the crude and adjusted odds ratios (OR) were calculated (using multiple logistic regression models). Homogeneity according age

was evaluated by the Mann-Whitney test. The significance level was set at 5% and SAS version 9.01 software was used.

Results

Homozygous deletion of the *GSTM1* gene was observed in 75 (42.2%) cases of SBC and in 75 (44.4%) controls ($p=0.7067$). Homozygous deletion of the *GSTT1* gene was detected in 30 (16.9%) and 33 (19.5%) cases, respectively ($p=0.5346$). At least one deletion studied was found in 95 (53.7%) and 93 (55%) cases, respectively.

The mean age of the controls was 52.57 ± 4.64 years (ranging from 31 to 62 years). Around 89% were classified as being part of the white ethnic group and 11% were non-white. Of the 177 BC cases, the mean age was 56.23 ± 13.35 years, ranging from 28 to 89 years. About 65% of the patients declared themselves white, 58% were aged 50 years or older at the time of diagnosis and 62% were postmenopausal. One-fourth were smokers and only 5% had used combined HT with estrogen and progestin for at least 5 years prior to BC diagnosis.

Regarding biological characteristics, the histologic type of 147 cases (83%) was invasive ductal carcinoma (classic) and the histologic types of the remaining tumors were: 7 (4%) lobular, 8 (4.5%) colloid, 1 (0.6%) medullary, 4 (2.3%) tubular, 4 (2.3%) apocrine, 1 (0.6%) undifferentiated, 2 (1.1%) papillary and 3 (1.7%) histiocytoid. In the majority of cases, tumors were undifferentiated, histologic and nuclear grade 3, although they expressed hormone receptors in about 70%. In 57% of the cases, clinical staging for diagnosis revealed disease that was still locally and regionally restricted - stages I and II.

Among BC cases, when correlating the presence of each polymorphism alone with sociodemographic and clinical characteristics, a significantly lower frequency of homozygous deletion of the *GSTM1* gene was evidenced in mulatto women or in those with a history of black miscegenation ($p=0.1128$), $OR= 0.48$ ($0.24 - 0.98$). No association was observed between isolated deletions of the *GSTM1* and *GSTT1* genes and the remaining characteristics studied (Table 1).

After adjusting for age, ethnic group, menopausal status and smoking, no relationship was observed between tumor biological characteristics and homozygous deletion of the *GSTM1* gene. Regarding *GSTT1*, a significantly lower risk of occurring undifferentiated tumors (nuclear grade 3) was observed in patients with the referred homozygous deletion ($p=0.04$), $OR_{adj}=0.37$ ($0.15 - 0.90$) (Table 1).

The same analyses were carried out taking combinations of deletion into consideration. The genotype distribution in the SBC group was 82 (46.3%) with both genes present, 10 (5.6%) women with combined homozygous deletion of both genes, and 95 (53.7%) with homozygous deletion of at least one of the genes studied. A lower occurrence of homozygous deletion of at least one gene was observed in patients who had not breastfed ($p=0.0202$), $OR=0.41$ ($0.19 - 0.88$). A higher occurrence of this genotype in cases that did not express hormone receptors was also evidenced ($p=0.0300$), $OR_{adj}=2.25$ ($1.03 - 4.90$). Regarding deletion of both genes, an increased risk of occurring tumors with a histological type different from classic ductal carcinoma was observed ($p=0.0571$), $OR_{adj}=12.09$ ($1.03 - 142.03$) (Table 2).

Discussion

In this study, an association between several clinical and biological characteristics of SBC and certain genotypes of GST polymorphisms was observed, characterizing a possible association between these polymorphisms and BC.

Glutathione S-transferase is a family of intracellular enzymes divided into five major groups with their respective subunits: Alpha (A1, A2, A3 and A4), Pi (P1), Mu (M1, M2, M3, M4 and M5), Theta (T1 and T2), and Zeta (33,34). This family of enzymes located in the cell cytosol prevents the action of substances on cells, avoiding DNA damage. These enzymes catalyze the conjugation of diverse electrophilic compounds (particularly halogenated) to glutathione, mostly promoting the formation of less reactive and more water-soluble metabolites that are readily excreted in urine, preventing DNA mutations in cells (24,35).

Epidemiological studies suggest that individuals with homozygous deletions of these genes, particularly the *GSTM1* gene, have a high risk of developing various types of neoplasia, including cancers of the bladder, colon, lung, skin and stomach (7). Meanwhile, the frequency of *GSTT1* gene deletion also varies among different populations, and few studies have correlated this genotype with an increased risk of cancer susceptibility (11).

Several studies have investigated the association of the *GSTM1* and *GSTT1* genotypes with the risk of developing breast carcinoma, but the results are mostly inconsistent and heterogeneous (18,22,24). In a case-control study with 224 Indian women, Chacko et al. (2005) observed no association between the *GSTM1* gene deletion and a significantly increased risk of BC (36). However, these authors did find an increased risk in women with the *GSTT1* gene deletion (OR=3.6, CI=1.6 – 7.7). Also in a case-control

study, Roodi et al. (2004) found a significant risk of BC in women without the *GSTM1* gene deletion, suggesting that this genotype might have a protective effect (25).

Recently, a meta-analysis published by Sull et al. (2004), which evaluated 30 studies correlating the *GSTM1* gene status with the risk of BC, indicated that since deficiency of this gene is not rare in the general population, there may be variability in the risk of BC attributed. The strongest associations were observed in postmenopausal women with a low frequency of *GSTM1* deletion (16). Vogl et al. (2004) published an analysis on the association of the GST *M1*, *T1* and *P1* genes and BC. Their results showed that the isolated deletion of these genes confers no substantial risk of BC on their carriers. Therefore, analysis of population-based (clinical) and histopathological (biological) characteristics is necessary for individualizing risk (26).

The risk of BC increases with age, due to exposure of women to their own sex hormones or other factors not yet fully established (2, 37-39). BC is quite uncommon before the age of 35 years, but its incidence increases rapidly and progressively above this age group (1). Stratifying SBC cases by age, it was observed that the mean age of 56 years was similar to that observed in the control group (52 years) and to that described in international case studies: 61 years in the United States of America (40).

Among the clinical characteristics common to the control group and SBC cases (age, race and polymorphisms), no statistically significant differences were observed regarding the distribution of deletions studied. Furthermore, the distribution was similar to that expected in the world literature and in Brazilian case studies (7, 9, 10). The distribution of different deletion patterns of polymorphisms studied was shown to be similar between the groups: OR=0.98 (0.63 – 1.53) and OR=1.19 (0.66 – 2.13), respectively.

The data derived from the study indicate that there is a genetic balance between the population of SBC cases and the general Brazilian population regarding these GST polymorphisms, suggesting the low penetrance of these homozygous deletions relative to BC occurrence. In all analyses, homogeneity according to age was evaluated to reduce the distortions connected with the younger mean age of the controls.

The distribution of polymorphisms was examined according to clinical and sociodemographic characteristics, e.g. race, age at diagnosis, age at menarche, age at first full-term pregnancy, lactation, age at menopause, menopausal status at diagnosis, smoking, use of HT. This data has been widely used for characterizing epidemiological risk factors (41). Among SBC cases, it was verified that a history of miscegenation with the black ethnic group confers protection against homozygous deletion of *GSTM1* (which is more prevalent than *GSTT1* in the population). Analysis of ethnic groups, incorporating the history of miscegenation, was shown to be adequate for a miscegenated population such as the Brazilian. Risk stratification is necessary, since different ethnic groups aggregate genetic alterations in penetrance that are as low as the polymorphisms currently studied, conferring significant genetic peculiarities upon large populations and cancer risk (42).

Among tumor biological characteristics, the distribution of polymorphisms was examined according to histologic type, nuclear and histologic grades, expression of hormone receptors, and staging. Homozygous deletion of the *GSTT1* gene was associated with better differentiated tumors according to nuclear grade and no other associations were observed. Since gene encoding enzymes act on carcinogen detoxification, and a significant amount of this class is found in breast tissue (43), it could be assumed that a carcinogenic pathway occurred in these cases through metabolites that led to reduced differentiation of cell clones.

On the other hand, it is known that GST also plays an important role in estrogen metabolism (29). The decreased enzyme activity due to the *GSTT1* null genotype could explain the association observed between this deletion and tumors with a better prognosis, since higher estrogen exposure is necessary for cell differentiation to occur. A decreased risk for deletion of at least one GST gene in nonbreastfeeding women with SBC may also be correlated with reduced differentiation of breast tissue in these patients.

Regarding the combination of polymorphisms, the occurrence of homozygous deletion of at least one gene was associated with tumors that did not express hormone receptors, conferring a worse oncologic prognosis on this subgroup of patients. The combined homozygous deletions of *GSTM1* and *GSTT1* were associated with tumors having a histologic type different from the classic invasive ductal carcinoma. In this subgroup of patients, 17 (10%) of them had a worse oncologic prognosis.

These observations have made it possible to consider that regulation of carcinogen detoxification and their effects on cells are complex mechanisms, and the case studies presented did not permit further elucidation. In addition, other characteristics that are dependent on estrogen exposure had no correlation with deletions evaluated in the current study.

In future studies with a larger number of cases in each ethnic stratum, more consistent data could be obtained on the influence of racial miscegenation present in the Brazilian population and the genotypic profile in relationship to the GST system. It is also possible to obtain further information about the reproductive clinical characteristics between carriers and non-carriers of deletions.

Concerning determination of GST polymorphisms, Vogl et al. (2004) proposed analyzing variations in homozygosis and heterozygosis in individuals that have at least

one of the alleles, thus constituting three possible genotypes for each GST class: homozygous for presence of the gene, heterozygous, and homozygous for deletion (26). It is presumed that analysis would be stratified further, observing the nuances of heterozygous deletion of these polymorphisms. Such an undertaking could result in a combinatory analysis of all deletions in the three most prevalent classes in healthy breast tissue and in breast tumors: *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1*.

Furthermore, there has been a recent trend in the literature towards evaluating the influence of these polymorphisms not only on carcinogenesis and tumor characterization, but also on assessment of therapeutic response to different genotypes (44). The presence of GST alleles is presumed to favor the survival of tumor cells, increasing resistance to oxidative stress and to the mechanisms of apoptosis (45). The oncologic treatment currently used for BC may have a large degree of overlap with these metabolic pathways: radiotherapy and chemotherapy, concerning detoxification of electrophilic compounds, and hormone therapy, according to modulation of estrogen metabolism.

Therefore, our results indicate that investigation into the role of polymorphisms in the GST system, especially the *GSTM1* and *GSTT1* genes, in the genesis and evolution of SBC should proceed, aimed at broadening knowledge of the metabolic pathways of carcinogens and their overlap with BC development and individualized treatments for these patients.

References

1. Brasil, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2006 – Incidência de câncer no Brasil – 2006 - INCA [on line]. Rio de Janeiro.
http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5
[accessed April 10th 2007].
2. Kelsey, J.L. Breast cancer epidemiology: summary and future directions. *Epidemiol Rev* 1993;15(1):256-63.
3. Newman, B., Austin, M.A., Lee, M., King, M.C. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(9):3044-8.
4. Peto, J., Easton, D.F., Matthews, F.E., Ford, D., Swerdlow, A.J.. Cancer mortality in relatives of women with breast cancer: the OPCS Study. Office of Population Censuses and Surveys. *Int J Cancer* 1996; 65(3):275-83.
5. Levy-Lahad, E., Friedman, E. Cancer risks among *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *Br J Cancer* 2007; 15;96(1):11-5.
6. Tempfer, C.B., Hefler, L.A., Schneeberger, C., Huber, J.C. How valid is single nucleotide polymorphism (SNP) diagnosis for the individual risk assessment of breast cancer? *Gynecol Endocrinol* 2006; 22(3):155-9.
7. Hayes, J.D., Pulford, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995;30(6):445-600.

8. Parl, F.F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett* 2005; 221(2):123-9.
9. Nelson, H.H., et al. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis*. 1995 May;16(5):1243-5.
10. Arruda, V.R. 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 Sep;54(3):210-4.
11. van der Hel, O.L., et al. Cumulative genetic defects in carcinogen metabolism may increase breast cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control* 2005;16(6):675-81.
12. Nascimento, H., et al. Possible influence of glutathione S-transferase *GSTT1* null genotype on age of onset of sporadic colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2003; 46(4):510-5.
13. Lourenço, G.J., et al. Polymorphisms of glutathione S-transferase mu1 (*GSTM1*) and theta 1 (*GSTT1*) genes in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Haematol* 2005; 75(6):530-1.
14. Goloni-Bertollo, E.M., et al. Evaluation of the influence of *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes in head and neck carcinogenesis. *Rev Assoc Med Bras* 2006; 52(5):365-8.
15. Raimondi, S., et al. Meta and pooled analysis of *GSTT1* and lung cancer: a HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol* 2006; 164(11):1027-42
16. Sull, J.W., Ohrr, H., Kang, D.R., Nam, C.M. Glutathione S-transferase M1 status and breast cancer risk: a meta-analysis. *Yonsei Med J*. 2004 Aug 31;45(4):683-9.

17. Curran, J.E., Weinstein, S.R., Griffiths, L.R. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (*GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1*) and breast cancer susceptibility. *Cancer Lett.* 2000 May 29;153(1-2):113-20.
18. Millikan, R., et al. Glutathione S-transferases M1, T1, and P1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 Jun;9(6):567-73.
19. Ambrosone, C.B., et al. Polymorphisms in glutathione S-transferases (*GSTM1* and *GSTT1*) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res.* 2001 Oct 1;61(19):7130-5.
20. Gudmundsdottir, K., Tryggvadottir, L., Eyfjord, J.E. *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* genotypes in relation to breast cancer risk and frequency of mutations in the *p53* gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Nov;10(11):1169-73.
21. Krajcinovic, M., et al. Genetic susceptibility to breast cancer in French-Canadians: role of carcinogen-metabolizing enzymes and gene-environment interactions. *Int J Cancer.* 2001 Apr 15;92(2):220-5.
22. Mitrunen, K., et al. Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(3):229-36.
23. Amorim, L.M.F., et al. *CYP1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1* polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Lett.* 2002 Jul 26;181(2):179-86.
24. Zheng, W., et al. *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Jul;74(1):9-16.

25. Roodi, N., Dupont, W.D., Moore, J.H., Parl, F.F. Association of homozygous wild-type glutathione S-transferase M1 genotype with increased breast cancer risk. *Cancer Res.* 2004 Feb 15;64(4):1233-6.
26. Vogl, F.D., et al. Glutathione S-transferases M1, T1, and P1 and breast cancer: a pooled analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(9):1473-9.
27. Zheng, T., et al. Cigarette smoking, glutathione-s-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, and breast cancer risk (United States). *Cancer Causes Control.* 2002a Sep;13(7):637-45.
28. Zheng, T., et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, alcohol consumption and breast cancer risk. *Br J Cancer.* 2003 Jan 13;88(1):58-62.
29. Park, S.K., et al. Reproductive factors, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Mar;78(1):89-96.
30. Comstock, K.E., Sanderson, B.J., Claflin, G., Henner, W.D. GST1 gene deletion determined by polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 1990 Jun 25;18(12):3670.
31. Pemble, S., et al. Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J.* 1994 May 15;300 (Pt 1):271-6.
32. Saiki, R.K., et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):487-91.
33. Board, P.G., Baker, R.G., Chelvanayagam, G., Jermin, L.S. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem J.* 1997;328:929-35.

34. Lizard-Nacol, S., et al. Glutathione S-transferase M1 null genotype: lack of association with tumour characteristics and survival in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res.* 1999;1:81-7.
35. Landi, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res.* 2000 Oct;463(3):247-83.
36. Chacko, P., Joseph, T., Mathew, B.S., Rajan, B., Pillai, M.R. Role of xenobiotic metabolizing gene polymorphisms in breast cancer susceptibility and treatment outcome. *Mutation Res.* 2005; 581: 153-63.
37. Pike, M.C., Krailo, M.D., Henderson, B.E., Casagrande, J.T., Hoel, D.G. Hormonal risk factors, breast tissue age, and the age-incidence of breast cancer. *Nature* 1983; 303(5920):767-70.
38. Russo, J., Russo, I.H. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest* 1987; 57(2):112-37.
39. Hardy, E.E., Pinotti, J.A., Osis, M.J., Faundes, A. Reproductive variables and risk of breast cancer: a case-control study carried out in Brazil. *Bol Oficina Sanit Panam* 1993; 115(2):93-102.
40. Ries, L.A.G., et al. (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004*, National Cancer Institute. Bethesda, MD.
http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html?statfacts_page=breast.html&x=14&y=16 [accessed April 10th 2007]
41. Singletary, S.E. Rating the risk factors for breast cancer. *Ann Surg.* 2003 Apr;237(4):474-82.

42. Maxwell, G.L., Risinger, J.I. Racial disparities research: it's not just black and white. *Gynecol Oncol* 2006; 101(2):194-7.
43. Kelley, M.K., et al. Variability of glutathione S-transferase isoenzyme patterns in matched normal and cancer human breast tissue. *Biochem J.* 1994 Dec 15;304 (Pt 3):843-8.
44. Yang, G., et al. Genetic polymorphisms in Glutathione S-Transferase genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) and survival after chemotherapy for invasive breast carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 52-8.
45. Perquin, M., et al. The glutathione-related detoxification system is increased in human breast cancer in correlation with clinical and histopathological features. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001;127(6):368-74.

Table 1 - Correlation of the presence of each polymorphism alone with sociodemographic and clinical characteristics

	<i>MI</i>				<i>TI</i>			
	DEL	PRE	<i>p</i> value	OR (IC 95%)	DEL	PRE	<i>p</i> value	OR (IC 95%)
	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)		
	75 (42.4)	102 (57.6)			30 (16.9)	147 (83.1)		
AGE			0.4917				0.0994	
≤56	38 (40.0)	57 (60.0)		1.23 (0.68 - 2.24)	12 (12.6)	83 (87.4)		1.95 (0.87 - 4.33)
>56	37 (45.1)	45 (54.9)		1.00	18 (22.0)	64 (78.0)		1.00
MENARCHE			0.6204				0.7890	
≤11	13 (46.4)	15 (53.6)		1.23 (0.55 - 2.77)	4 (14.3)	24 (85.7)		0.76 (0.24 - 2.39)
>12	60 (41.4)	85 (58.6)		1.00	26 (17.9)	119 (82.1)		1.00
RACE			0.1128				0.4600	
White	54 (47.0)	61 (53.0)		1.00	18 (15.7)	97 (84.3)		1.00
Black	5 (50.0)	5 (50.0)		1.13 (0.31 - 4.11)	3 (30.0)	7 (70.0)		2.31 (0.55 - 9.77)
Mulatto	15 (30.0)	35 (70.0)		0.48 (0.24 - 0.98)	9 (18.0)	41 (82.0)		1.18 (0.49 - 2.85)
RACE			0.0833				0.4688	
White	54 (47.0)	61 (53.0)		1.00	18 (15.7)	97 (84.3)		1.00
Non-white	20 (33.3)	40 (66.7)		0.57 (0.30 - 1.08)	12 (20.0)	48 (80.0)		1.35 (0.60 - 3.02)
1st PREGNANCY			0.3774				0.7213	
≤29	55 (44.4)	69 (55.6)		1.00	18 (14.5)	106 (85.5)		1.00
>30	6 (33.3)	12 (66.7)		0.63 (0.22 - 1.78)	3 (16.7)	15 (83.3)		1.18 (0.31 - 4.48)
LACTATION			0.0784				0.6996	
N	12 (30.8)	27 (69.2)		0.50 (0.23 - 1.09)	5 (12.8)	34 (87.2)		0.81 (0.28 - 2.38)
Y	49 (47.1)	55 (52.9)		1.00	16 (15.4)	88 (84.6)		1.00
MENOPAUSE (age)			0.1785				0.4768	
≤53	40 (44.9)	49 (55.1)		1.00	18 (20.2)	71 (79.8)		1.00
> 54	5 (27.8)	13 (72.2)		2.12 (0.70 - 6.46)	5 (27.8)	13 (72.2)		1.52 (0.48 - 4.81)
MENOPAUSAL STATUS			0.9878				0.0943	
N	26 (41.9)	36 (58.1)		1.00	7 (11.3)	55 (88.7)		1.00
S	45 (42.1)	62 (57.9)		1.00 (0.53 - 1.88)	23 (21.5)	84 (78.5)		1.52 (0.48 - 4.81)
SMOKING			0.9509				0.8796	
N	56 (42.7)	75 (57.3)		1.00	22 (16.8)	109 (83.2)		1.00
Y	19 (42.2)	26 (57.8)		0.98 (0.49 - 1.94)	8 (17.8)	37 (82.2)		1.07 (0.44 - 2.61)
HISTOLOGIC TYPE*			0.4590				0.0957	
DCI	71 (41.8)	99 (58.2)		1.00	27 (15.9)	143 (84.1)		1.00
LCI and others	4 (57.1)	3 (42.9)		1.60 (0.33 - 7.70)	3 (42.9)	4 (57.1)		3.79 (0.72 - 20.00)
HISTOLOGIC GRADE*							0.5120	
1 or 2	10 (41.7)	14 (58.3)		1.00	5 (20.8)	19 (79.2)		1.00
3	59 (41.5)	83 (58.5)		0.93 (0.38 - 2.31)	22 (15.5)	120 (84.5)		0.71 (0.23 - 2.18)
NUCLEAR GRADE*							0.0400	
1 or 2	24 (35.3)	44 (64.7)		1.00	16 (23.5)	52 (76.5)		1.00
3	43 (44.8)	53 (55.2)		1.43 (0.73 - 2.78)	11 (11.5)	85 (88.5)		0.37 (0.15 - 0.90)
STAGING*							0.9836	
1 / 2	41 (41.0)	59 (59.0)		1.00	17 (17.0)	83 (83.0)		1.00
3 / 4	34 (44.2)	43 (55.8)		1.25 (0.66 - 2.36)	13 (16.9)	64 (83.1)		1.00 (0.44 - 2.26)
HORMONE RECEPTORS*							0.4081	
N	22 (53.7)	19 (46.3)		1.98 (0.93 - 4.20)	9 (22.0)	32 (88.0)		1.35 (0.54 - 3.38)
P	46 (37.4)	77 (62.6)		1.00	20 (16.3)	103 (83.7)		1.00

* after adjusting for age, ethnic group, menopausal status and smoking

Table 2 - Correlation of the combination of deletions with sociodemographic and clinical characteristics

	<i>Both genes presented</i>		<i>p value</i>	OR (IC 95%)	<i>At least one gene deleted</i>		<i>p value</i>	OR (IC 95%)
	n	n			n	n		
	82	95			10			
AGE			0.1315				0.3136	
≤56	49	46		1.58 (0.87 - 2.87)	4			2.23 (0.58 - 8.51)
>56	33	49		1.00	6			1.00
MENARCHE			0.6632				0.3919	
≤11	14	14		0.84 (0.37 - 1.88)	3			2.02 (0.46 - 8.79)
>12	66	79		1.00	7			1.00
RACE			0.1945				0.3819	
White	50	65		1.00	7			1.00
Black	3	7		1.79 (0.44 - 7.29)	1			2.38 (0.22 - 26.18)
Mulatto	28	22		0.60 (0.31 - 1.18)	2			0.51 (0.10 - 2.63)
RACE			0.3025				0.7381	
White	50	65		1.00	7			1.00
Non-white	31	29		0.72 (0.39 - 1.35)	3			0.69 (0.17 - 2.87)
1st PREGNANCY			0.4859				1.000	
≤29	58	66		1.00	7			1.00
>30	10	8		0.70 (0.26 - 1.90)	1			0.83 (0.09 - 7.48)
LACTATION			0.0202				1.0000	
N	25	14		0.41 (0.19 - 0.88)	3			1.06 (0.23 - 4.80)
S	44	60		1.00	5			1.00
MENOPAUSE (age)			0.9612				0.5868	
≤53	39	50		1.00	8			1.00
> 54	8	10		0.98 (0.35 - 2.70)	0			3.66 (0.19 - 69.69)
MENOPAUSAL STATUS			0.4452				0.3090	
N	31	31		0.78 (0.42 - 1.47)	2			0.38 (0.08 - 1.91)
Y	47	60		1.00	8			1.00
SMOKING			0.6548				0.4631	
N	59	72		0.86 (0.44 - 1.69)	6			1.79 (0.46 - 6.94)
Y	22	23		1.00	4			1.00
HISTOLOGIC TYPE*			0.4528				0.0571	
DCI	80	90		1.00	8			1.00
LCI and others	2	5		1.79 (0.32 - 9.54)	2			12.09 (1.03 - 142.03)
HISTOLOGIC GRADE*			0.8522				0.6161	
1 or 2	11	13		1.00	2			1.00
3	68	74		0.90 (0.31 - 2.21)	7			0.28 (0.04 - 1.98)
NUCLEAR GRADE*			0.4766				0.0800	
1 or 2	35	33		1.00	7			1.00
3	44	52		1.23 (0.63 - 2.40)	2			0.28 (0.05 - 1.62)
STAGING*			0.9206				0.5034	
1 / 2	46	54		1.00	4			1.00
3 / 4	36	41		1.04 (0.56 - 1.95)	6			2.35 (0.57 - 9.61)
HORMONE RECEPTORS*			0.0300				0.3606	
N	13	28		2.25 (1.03 - 4.90)	3			2.19 (0.44 - 10.96)
P	63	60		1.00	6			1.00

* after adjusting for age, ethnic group, menopausal status and smoking

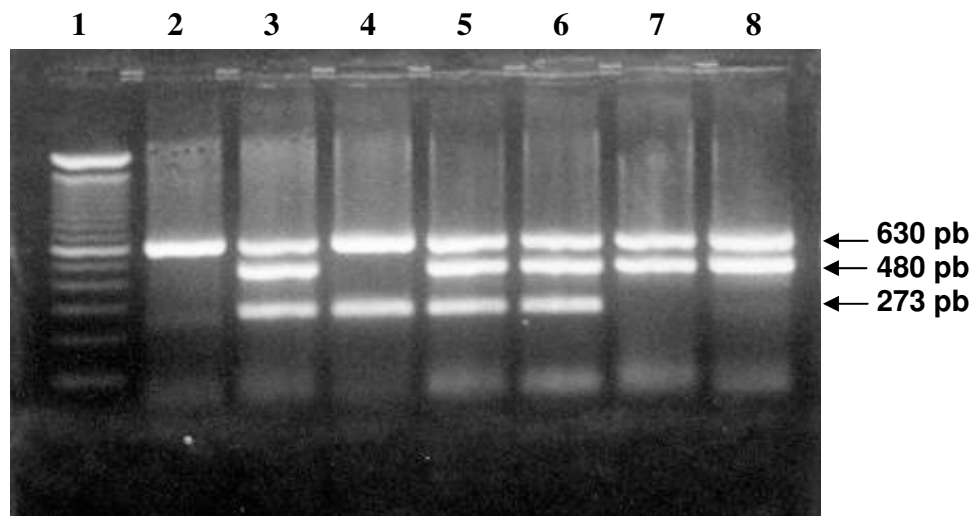


Figure 1 - Exons 4 and 5 of the *GSTM1* gene and exon 4 and intron 4 of the *GSTT1* gene amplified by Multiplex polymerase chain reaction of (PCR): 480 pb (*GSTT1*) and 273 pb (*GSTM1*). A fragment of the beta globin gene, including exon 3 and sequence of introns 2 and 3, was amplified in the same reaction and served as control for the DNA sample (first column). Both deletions are presented on the second column.

4. Conclusões

- As frequências das deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e de suas combinações foram semelhantes nos grupos com CME e no grupo-controle.
- A menor ocorrência da deleção homozigótica do gene *GSTM1* em mulheres com CME se associou à etnia parda; a ocorrência de pelo menos uma das deleções homozigóticas se associou a mulheres que não amamentaram.
- A menor ocorrência da deleção homozigótica do gene *GSTT1* em mulheres com CME se associou a tumores melhor diferenciados. Já a ocorrência de pelo menos uma das deleções homozigóticas se associou com a ausência de expressão dos receptores hormonais. Ainda, a ocorrência de ambas as deleções homozigóticas se associou a tipos histológicos diferentes do carcinoma ductal invasivo clássico.

5. Referências Bibliográficas

Ambrosone CB, Sweeney C, Coles BF, Thompson PA, McClure GY, Korourian S, et al. Polymorphisms in glutathione S-transferases (*GSTM1* and *GSTT1*) and survival after treatment for breast cancer. **Cancer Res** 2001; 61(19):7130-5.

Amorim LF, Rossini A, Mendonca G, Lotsch P, Simao TA, Gallo CM, et al. CYP1A1, *GSTM1*, and *GSTT1* polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. **Cancer Lett** 2002;181(2):179-86.

Arruda VR, Grignolli CE, Goncalves MS, Soares MC, Menezes R, Saad ST, 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(3):210-4.

Arruda VR, Lima CS, Grignoli CR, de Melo MB, Lorand-Metze I, Alberto FL, Saad ST, Costa FF. Increased risk for acute myeloid leukaemia in individuals with glutathione S-transferase mu 1 (*GSTM1*) and theta 1 (*GSTT1*) gene defects. **Eur J Haematol** 2001; 66(6):383-8.

Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. **Br J Cancer** 1957; 11(3):359-77.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas da Incidência e Mortalidade por câncer no Brasil – 2003 - INCA [on line]. Rio de Janeiro. http://www.inca.gov.br/estimativas/2003/conteudo_view.asp?ID=5 [acesso em 10 de abril de 2007].

Brasil, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2006 – Incidência de câncer no Brasil – 2006 - INCA [on line]. Rio de Janeiro. http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5 [acesso em 10 de abril de 2007].

Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D. *P53* expression in breast cancer. **Int J Cancer** 1988; 41(2):178-83.

Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist** 2004; 9(6):606-16.

Clark GM, McGuire WL. New biologic prognostic factors in breast cancer. **Oncology (Williston Park)**. 1989; 3(5):49-54; discussion 58, 61, 64.

Coyle YM. The effect of environment on breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat** 2004; 84(3):273-88.

Curran JE, Weinstein SR, Griffiths LR. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (*GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1*) and breast cancer susceptibility. **Cancer Lett** 2000; 153(1-2):113-20.

Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? **J Cell Mol Med** 2005; 9(1):208-21.

Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1999; 8(10):843-54.

Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. **Cancer** 1983; 52(9):1551-7.

Frierson HF Jr, Wolber RA, Berean KW, Franquemont DW, Gaffey MJ, Boyd JC, et al. Interobserver reproducibility of the Nottingham modification of the Bloom and Richardson histologic grading scheme for infiltrating ductal carcinoma. **Am J Clin Pathol** 1995; 103(2):195-8.

Gasparini G, Gullick WJ, Bevilacqua P, Sainsbury JR, Meli S, Boracchi P, et al. Human breast cancer: prognostic significance of the c-erbB-2 oncoprotein compared with epidermal growth factor receptor, DNA ploidy, and conventional pathologic features. **J Clin Oncol** 1992; 10(5):686-95.

Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Dalla-Palma P, Caffo O, et al. Tumor microvessel density, *p53* expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. **J Clin Oncol** 1994; 12(3):454-66.

Goloni-Bertollo EM, Biselli JM, Correa LC, Maniglia JV, Rossit AR, Ruiz MT, et al. Evaluation of the influence of *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes in head and neck carcinogenesis. **Rev Assoc Med Bras** 2006; 52(5):365-8.

Gudmundsdottir K, Tryggvadottir L, Eyfjord JE. *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* genotypes in relation to breast cancer risk and frequency of mutations in the *p53* gene. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 10(11):1169-73.

Hardy EE, Pinotti JA, Osis MJ, Faundes A. Reproductive variables and risk of breast cancer: a case-control study carried out in Brazil. **Bol Oficina Sanit Panam** 1993; 115(2):93-102.

Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Crit Rev Biochem Mol Biol** 1995; 30(6):445-600.

Kaklamani VG, Gradishar WJ. Gene expression in breast cancer. **Curr Treat Options Oncol** 2006; 7(2):123-8.

Kaklamani V. A genetic signature can predict prognosis and response to therapy in breast cancer: Oncotype DX. **Expert Rev Mol Diagn** 2006; 6(6):803-9.

Kelley MK, Engqvist-Goldstein A, Montali JA, Wheatley JB, Schmidt DE Jr, Kauvar LM. Variability of glutathione S-transferase isoenzyme patterns in matched normal and cancer human breast tissue. **Biochem J** 1994; 304(Pt 3):843-8.

Kelsey JL. Breast cancer epidemiology: summary and future directions. **Epidemiol Rev** 1993;15(1):256-63.

Krajcinovic M, Ghadirian P, Richer C, Sinnett H, Gandini S, Perret C, et al. Genetic susceptibility to breast cancer in French-Canadians: role of carcinogen-metabolizing enzymes and gene-environment interactions. **Int J Cancer** 2001; 92(2):220-5.

Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. **Mutat Res** 2000;463(3):247-83.

Levy-Lahad E, Friedman E. Cancer risks among *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. **Br J Cancer** 2007; 96(1):11-5.

Lin HJ, Probst-Hensch NM, Louie AD, Kau IH, Witte JS, Ingles SA, et al. Glutathione transferase null genotype, broccoli, and lower prevalence of colorectal adenomas. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1998;7(8):647-52.

Lourenco GJ, Ortega MM, Nascimento H, Teori MT, Souza CA, Costa FF, et al. Polymorphisms of glutathione S-transferase mu1 (*GSTM1*) and theta 1 (*GSTT1*) genes in chronic myeloid leukaemia. ***Eur J Haematol*** 2005; 75(6):530-1.

Lovekin C, Ellis IO, Locker A, Robertson JF, Bell J, Nicholson R, et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer. ***Br J Cancer*** 1991; 63(3):439-43.

Martinazzi M, Crivelli F, Zampatti C, Martinazzi S. Relationship between *p53* expression and other prognostic factors in human breast carcinoma. An immunohistochemical study. ***Am J Clin Pathol*** 1993; 100(3):213-7.

Maxwell GL, Risinger JL. Racial disparities research: it's not just black and white. ***Gynecol Oncol*** 2006; 101(2):194-7.

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(6):567-73.

Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. ***Ann Surg*** 2002; 235(1):10-26.

Mittra I, MacRae KD. A meta-analysis of reported correlations between prognostic factors in breast cancer: does axillary lymph node metastasis represent biology or chronology? ***Eur J Cancer*** 1991; 27(12):1574-83.

Mitrunen K, Jourenkova N, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, et al. Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. ***Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*** 2001;10(3):229-36.

Nagata C, Mizoue T, Tanaka K, Tsuji I, Wakai K, Inoue M, et al [Research Group for the Development and Evaluation of Cancer Prevention Strategies in Japan]. Tobacco smoking and breast cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiological evidence among the Japanese population. **Jpn J Clin Oncol** 2006; 36(6):387-94.

Nascimento H, Coy CS, Teori MT, Boin IF, Goes JR, Costa FF, et al. Possible influence of glutathione S-transferase *GSTT1* null genotype on age of onset of sporadic colorectal adenocarcinoma. **Dis Colon Rectum** 2003; 46(4):510-5.

Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, et al. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. **Carcinogenesis** 1995;16(5):1243-5.

Newman B, Austin MA, Lee M, King MC. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. **Proc Natl Acad Sci USA** 1988; 85(9):3044-8.

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med** 2004; 351(27):2817-26.

Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24(23):3726-34.

Parl FF. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. **Cancer Lett** 2005; 221(2):123-9.

Park SK, Kang D, Noh DY, Lee KM, Kim SU, Choi JY, et al. Reproductive factors, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat** 2003;78(1):89-96.

Peto J, Easton DF, Matthews FE, Ford D, Swerdlow AJ. Cancer mortality in relatives of women with breast cancer: the OPCS Study. Office of Population Censuses and Surveys. **Int J Cancer** 1996; 65(3):275-83.

Perquin M, Oster T, Maul A, Froment N, Untereiner M, Bagrel D. The glutathione-related detoxification system is increased in human breast cancer in correlation with clinical and histopathological features. **J Cancer Res Clin Oncol** 2001;127(6):368-74.

Pike MC, Krailo MD, Henderson BE, Casagrande JT, Hoel DG. Hormonal risk factors, breast tissue age, and the age-incidence of breast cancer. **Nature** 1983; 303(5920):767-70.

Raimondi S, Paracchini V, Autrup H, Barros-Dios JM, Benhamou S, Boffetta P, et al. Meta and pooled analysis of *GSTT1* and lung cancer: a HuGE-GSEC review. **Am J Epidemiol** 2006; 164(11):1027-42

Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, et al. (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004*, National Cancer Institute. Bethesda, MD. http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html?statfacts_page=breast.html&x=14&y=16 [acesso em 10 de abril de 2007]

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(4):1233-6.

Rosen PP, Oberman HA. Tumors of the mammary gland. **Armed Forces Institute of Pathology**, Washington D.C., 1993.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al [Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators]. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA** 2002; 288(3):321-33.

Russo J, Russo IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. **Lab Invest** 1987; 57(2):112-37.

Scarff RW, Torloni H. Histological typing of breast tumors. **International histological classification of tumors, No.2**. World Health Organization, Geneva, 1968: 510-13.

Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. **J Clin Oncol** 2002; 20(17):3628-36.

Singletary SE. Rating the risk factors for breast cancer. **Ann Surg** 2003; 237(4):474-82.

Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. **JAMA**. 2001; 286(17): 2143-51.

Sharma A, Mishra A, Das BC, Sardana S, Sharma JK. Genetic polymorphism at *GSTM1* and *GSTT1* gene loci and susceptibility to oral cancer. **Neoplasma** 2006; 53(4):309-15.

Slattery ML, Kampman E, Samowitz W, Caan BJ, Potter JD. Interplay between dietary inducers of GST and the *GSTM-1* genotype in colon cancer. **Int J Cancer**. 2000; 87(5):728-33.

Sull JW, Ohrr H, Kang DR, Nam CM. Glutathione S-transferase M1 status and breast cancer risk: a meta-analysis. **Yonsei Med J** 2004; 45(4):683-9.

Tammemagi CM. Racial/ethnic disparities in breast and gynecologic cancer treatment and outcomes. **Curr Opin Obstet Gynecol** 2007; 19(1):31-6.

Tempfer CB, Hefler LA, Schneeberger C, Huber JC. How valid is single nucleotide polymorphism (SNP) diagnosis for the individual risk assessment of breast cancer? **Gynecol Endocrinol** 2006; 22(3):155-9.

Terry PD, Rohan TE. Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2002; 11(10 Pt 1):953-71.

Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. **J Clin Oncol** 1992; 10(7):1044-8.

Vogl FD, Taioli E, Maugard C, Zheng W, Pinto LF, Ambrosone C, et al. Glutathione S-transferases M1, T1, and P1 and breast cancer: a pooled analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2004; 13(9):1473-9.

Yang G, Shu XO, Ruan ZX, Cai QY, Jin F, Gao YT, et al. Genetic polymorphisms in Glutathione S-Transferase genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) and survival after chemotherapy for invasive breast carcinoma. **Cancer** 2005; 103:52-8.

Zheng T, Holford TR, Zahm SH, Owens PH, Boyle P, Zhang Y, et al. Cigarette smoking, glutathione-s-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, and breast cancer risk (United States). **Cancer Causes Control** 2002a;13(7):637-45.

Zheng W, Wen WQ, Gustafson DR, Gross M, Cerhan JR, Folsom AR. *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat** 2002b; 74(1):9-16.

Zheng T, Holford TR, Zahm SH, Owens PH, Boyle P, Zhang Y, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, alcohol consumption and breast cancer risk. **Br J Cancer** 2003; 88(1):58-62.

6. Bibliografia de Normatizações

França JL, Borges SM, Vasconcellos AC, Magalhães MHA. **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed., Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98 (alterada 2005).

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Check List

**Polimorfismos genéticos do sistema da glutatona S-transferase:
epidemiologia e fatores prognósticos do câncer de mama esporádico**

Pesquisador: Cassio Cardoso Filho

	SIM	NÃO
Sexo feminino	☐	☐
Idade ≥ 25 e ≤ 90 anos	☐	☐
Antecedente pessoal negativo para câncer de mama	☐	☐
Conhece seus antecedentes familiares	☐	☐
Antecedente familiar de primeiro grau negativo para câncer de mama	☐	☐
Grau de compreensão adequado frente aos questionamentos do pesquisador	☐	☐

Se todas as questões forem respondidas como “SIM”, o sujeito será incluído no projeto sob o número: _____ ☐ CASO ☐ CONTROLE

7.2. Anexo 2 – Ficha para coleta de dados

Polimorfismos genéticos do sistema da glutathione S-transferase: epidemiologia e fatores prognósticos do câncer de mama esporádico

Pesquisador: Cassio Cardoso Filho

Número na pesquisa: _____ Data programada da cirurgia: ____ / ____ / ____

1. Idade: _____ anos ☐ ign

2. Idade à menarca: _____ anos ☐ ign

3. Idade à menopausa: _____ anos ☐ não se aplica ☐ ign

4. Idade à primeira gravidez a termo: _____ anos ☐ não se aplica ☐ ign

5. Lactação (por tempo maior do que 06 meses): ☐ sim ☐ não

6. TRH por mais de 05 anos: ☐ sim ☐ não ☐ ign

7. Hábito tabágico: ☐ nunca fumou, ou parou há mais de 10 anos
☐ fumante, ou parou há menos de 10 anos (inclusive)

8. Etilismo: ☐ sim ☐ não

9. Etnia:
[1] Branca, sem antecedente de miscigenação com outras etnias
[2] Parda, ou branca com antecedente de miscigenação com etnia negra
[3] Branca, com antecedente de miscigenação com etnia amarela
[4] Branca, com antecedente de miscigenação com indígenas
[5] Negra
[6] Amarela
[7] Outros

10. GH ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ ign ☐ não se aplica

11. GN ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ ign ☐ não se aplica

12. RE ☐ (+) ☐ (-) ☐ ign ☐ não se aplica

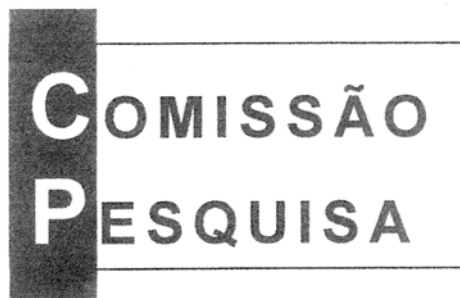
13. RP ☐ (+) ☐ (-) ☐ ign ☐ não se aplica

14. Estadiamento ☐ I ☐ IIa ☐ IIb ☐ IIIa ☐ IIIb ☐ IIIc ☐ IV
☐ ignorado ☐ não se aplica

Nome: _____

HC: _____

7.3. Anexo 3 – Carta de aprovação do projeto CP - DTG – FCM – Unicamp



Campinas, 11 de setembro de 2003

O protocolo de pesquisa “INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DOS ALELOS DO SISTEMA DA GLUTIONA S-TRANSFERASE UM 1 (GSTM1) E THETA 1 (GSTT1) NA SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO” da pesquisadora Maria Salete Costa-Gurgel foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do DTG/FCM/UNICAMP e encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa-FCM-UNICAMP.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Lúcia Helena Costa Paiva

*Presidente da Comissão de Pesquisa
Departamento de Tocoginecologia - DTG/FCM/UNICAMP*

Comissão de Pesquisa-FCM-DTG-UNICAMP
Rua Alexander Flemming, 101 - Cidade Universitária Zeferino Vaz – Campinas/SP
Fones: (019) 3788-9402/3788-9403

7.4. Anexo 4 – Carta de aprovação do projeto no CEP – FCM – Unicamp



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

☒ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (0__19) 3788-8936
fax (0__19) 3788-8925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 17/12/02
(Grupo I)

PARECER PROJETO: N° 582/2002

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DOS ALELOS DO DO SISTEMA DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE MU 1 (GSTM1) E THETA 1 (GSTT1) NA SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carmen Silvia Passos Lima

INSTITUIÇÃO: HEMOCENTRO/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 12/12/2002

II - OBJETIVOS

Determinar a frequência de ocorrência das deleções homozigóticas dos genes GSTM1 e GSTT1 do sistema glutathiona-S-transferase em um grupo de pacientes portadores de câncer de mama esporádico e em um grupo controle.

III - SUMÁRIO

Serão investigados 300 pacientes portadores de câncer de mama esporádico e 300 indivíduos normais. Os pacientes encontram-se em seguimento clínico nos ambulatórios do CAISM e os indivíduos controles serão doadores de sangue. Será feita uma coleta de sangue para análise de DNA em todos os sujeitos de pesquisa e nos casos dos pacientes será extraído também DNA de um fragmento do tumor que for retirado cirurgicamente.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de um estudo de grupo I, onde serão analisados fatores de susceptibilidade ao câncer de mama. O projeto está bem estruturado. O DNA será guardado e estudos futuros serão apresentados ao Comitê de Ética. Ao final do trabalho, como se trata de uma análise de susceptibilidade, os pacientes deverão ser informados dos resultados obtidos.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, lembrando que o pesquisador deve:

a) no caso de utilização do material biológico para um novo estudo, um novo protocolo deverá ser submetido ao CEP/FCM.

b) os resultados e conclusões deverão ser informados aos pacientes no final do estudo, bem como feita a orientação genética.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

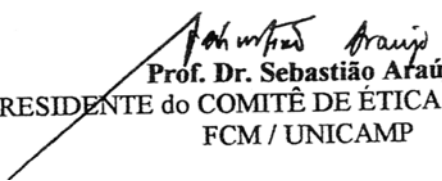
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 17 de dezembro de 2002.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

7.5. Anexo 5 – Carta de aprovação do projeto no CONEP

04/03/2021 15:18

0612266453

CONEP

PAGE 05



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 504/2003

Registro CONEP: 7238 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 582/2002

Processo nº 25000.007434/2003-12

Projeto de Pesquisa: "Influência dos polimorfismos dos alelos do sistema glutathionum 1 (GSTM1) e THETA 1 (GSTT1) na susceptibilidade ao Câncer de mama esporádico "

Pesquisador Responsável : Dr.ª Carmen Sílvia Passos Lima

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP

Área Temática Especial : Genética Humana

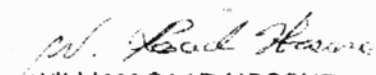
Ao se proceder à análise das respostas ao Parecer 287/2003, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a) foram atendidas as solicitações do referido parecer;
- b) o projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 196/96 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada .

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado

Brasília, 28 de março de 2003


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

7.6. Anexo 6 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (casos)

Influência dos polimorfismos dos alelos do sistema da glutathione S-transferase Mu 1 (*GSTM1*) e Theta 1 (*GSTT1*) na susceptibilidade ao câncer de mama esporádico

Pesquisador: Cassio Cardoso Filho

Nome: _____

Idade: _____ anos **RG:** _____ **HC:** _____

Endereço: _____

Nome do responsável legal (se aplicável): _____

RG: _____ **Grau de parentesco:** _____

Endereço: _____

Aceito participar de um estudo no CAISM – UNICAMP sobre alterações genéticas que podem estar envolvidas no aparecimento do câncer de mama. Isto ainda não está comprovado, e a análise do meu DNA poderá ajudar a esclarecer essa dúvida. Assim eu contribuirei para um melhor entendimento dos fatores que levam ao surgimento do câncer de mama, para o progresso de exames diagnósticos e para novas formas de tratamento. Minha contribuição será autorizar a utilização de:

- uma parte do sangue colhido antes da cirurgia ou da quimioterapia para a análise de DNA. Compreendo que não terei prejuízos com a realização desta análise.
- informações do meu prontuário médico, sabendo que meus dados pessoais de identificação serão mantidos em sigilo pelo pesquisador.

Fui informada que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento no CAISM. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar o Dr. Cassio Cardoso Filho ou a Dra. Maria Salete Costa-Gurgel, Tel: (19) 3788-9305. Em caso de reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da FCM - UNICAMP, Tel: (19) 3788-8936. Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

Assinatura do sujeito ou do responsável legal

Assinatura do pesquisador

Campinas, ____ / ____ / ____

7.7. Anexo 7 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (doadores)

Influência dos polimorfismos dos alelos do sistema da glutathione S-transferase Mu 1 (*GSTM1*) e Theta 1 (*GSTT1*) na susceptibilidade ao câncer de mama esporádico

Pesquisador: Cassio Cardoso Filho

Nome: _____
Idade: _____ anos RG: _____ HC: _____
Endereço: _____

Nome do responsável legal (se aplicável): _____
RG: _____ Grau de parentesco: _____
Endereço: _____

Fui convidada a participar de um estudo no HEMOCENTRO – UNICAMP por ser uma pessoa sadia. O objetivo do estudo é estudar as alterações genéticas que podem estar envolvidas no aparecimento do câncer de mama. Isto ainda não está comprovado, e a análise do meu DNA poderá ajudar a esclarecer esta associação, contribuindo para um melhor entendimento dos fatores que levam ao surgimento desta doença, podendo colaborar para o progresso de exames para o diagnóstico e para novas formas de tratamento. O pesquisador necessita de um grupo de mulheres sem câncer de mama para comparar com as que têm esta doença. Minha contribuição será a de autorizar a utilização de:

- Uma parte do sangue colhido quando da doação de sangue para a análise de DNA. Compreendo que não terei prejuízos com a realização desta análise.
- Informações do meu prontuário médico, sabendo que meus dados pessoais de identificação serão mantidos em sigilo pelo pesquisador.

Fui informada que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai me trazer prejuízos. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar o Dr. Cassio Cardoso Filho, Tel: (19) 3788-9305 ou a Dra. Carmen Silvia Passos Lima, Tel: (19) 3788-8740. Em caso de reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da FCM - UNICAMP, Tel: (19) 3788-8936. Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

Assinatura do sujeito ou do responsável legal

Assinatura do pesquisador

Campinas, ____ / ____ / _____

7.8. Anexo 8 – Planilhas de cálculos do tamanho amostral dos polimorfismos do sistema GST

“CONTROLES”

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) - Polimorfismo do gene *GSTM1*

Genótipo	Observado (O)	%	freq		Genótipo	Esperado (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
AA			0	Valor de p	AA	33,00	-33,00	1089,08	33,00
AB			0	Valor de q	AB	133,00	-133,00	17688,67	133,00
BB	134	44,67	0,45		BB	134,00	0,00	0,00	0,00
Total	300		0,45	1,00				X ²	166,000
								HW	Desequilíbrio
								GL	1
								p value	0,0001

Cálculo do tamanho amostral - *GSTM1*

E ** (30%)	0,20	E (20%)	0,13
N *** (30%)	21,18	N (20%)	47,66

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) - Polimorfismos do gene *GSTT1*

Genótipo	Observado (O)	%	freq		Genótipo	Esperado (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
AA			0	Valor de p	AA	102,20	-102,20	10444,86	102,20
AB			0	Valor de q	AB	145,80	-145,80	21257,62	145,80
BB	52	17,33	0,17		BB	52,00	0,00	0,00	0,00
Total	300		0,17	1,00				X ²	248,000
								HW	Desequilíbrio
								GL	1
								p value	0,0001

Cálculo do tamanho amostral - *GSTT1*

E (30%)	0,12	E (20%)	0,08
N (30%)	59,84	N (20%)	134,64

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) - Polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*

Genótipo	Observado (O)	%	freq		Genótipo	Esperado (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E	
AA			0	Valor de p	0,72	AA	154,29	-154,29	23806,75	154,29
AB			0	Valor de q	0,28	AB	121,71	-121,71	14812,26	121,71
BB	24	8,00	0,08			BB	24,00	0,00	0,00	0,00
Total	300		0,08		1,00			X ²	276,000	
								HW	Desequilíbrio	
								GL	1	
								p value	0,0001	

Cálculo do tamanho amostral - *GSTM1* e *GSTT1*

E (30%)	0,08	E (20%)	0,06
N (30%)	108,23	N (20%)	243,51

* Segundo Beiguelman, numa amostra de n indivíduos, x apresentam fenótipo recessivo autossômico. Se aceita-se que a hipótese está verdadeira ($AA=p^2$; $Aa=2pq$ e $aa=q^2$), pode-se aceitar que x/n determina a frequência q^2

** Erro tolerado (E), com probabilidade de 95%, a 30% e 20% da frequência real
E = q x precisão da estimativa (em percentual)

*** Tamanho amostral (N), depende da precisão da estimativa: $N = (1,96)^2 \times p \times q / E^2$