



NOTA CIENTÍFICA

Aspectos Ambientais e Genéticos no Desenvolvimento de Leucemias

Kátia Kvitko^{1*}, Paula Rohr¹, Giovana Zucchetti¹ e Lúcia Mariano da Rocha Silla²

Recebido em: 31 de janeiro de 2008 Aceito em: 15 de agosto de 2008

Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/985>

RESUMO: (Aspectos Ambientais e Genéticos no Desenvolvimento de Leucemias). A etiologia da leucemia aguda (LA) pode ser explicada pela combinação de fatores genéticos e ambientais. Como exemplo das influências genéticas pode-se citar polimorfismos de genes de metabolização/detoxificação e, como de agente ambiental, a exposição ocupacional e por lazer. Tem sido descrito que leucemias infantis poderiam ter a iniciação ocorrendo *in utero* devido à exposição parental pré-ou durante a gestação. Este trabalho tem por objetivo analisar os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em relação à suscetibilidade de desenvolvimento de LA e a relação com alguns fatores ambientais. O DNA genômico de um banco de 87 pacientes foi analisado pela técnica de PCR multiplex. Também foram coletados dados de 24 famílias (pacientes pai e/ou mãe) e aplicado questionário sobre exposição. Foi detectado aumento significativo da frequência do genótipo *GSTT1* nulo quando comparado com uma população controle (40% X 21%) (P=0.005). A frequência do genótipo nulo para *GSTM1* nos pacientes não apresentou diferença significativa com relação aos controles (50% X 50%). Foi detectada uma prevalência alta de pais que relatam exposição a tintas e solventes no período de pré-concepção, podendo este ser um fator importante na origem da doença.

Palavras chaves: Leucemia Aguda, polimorfismos, suscetibilidade genética, exposição ocupacional.

ABSTRACT: (Environmental and Genetic Aspects on Leukemia Development). The causes of acute leukemia (AL) are likely to involve an interaction between genetic susceptibility and environment. Polymorphisms in genes coding metabolizing/detoxification enzymes are responsible for this susceptibility. Environmental exposure (occupational or recreational) may also be involved with the etiology of leukemia. Some studies have described that infant leukemia may have the initiation period during *in utero* development and this may be caused by the parental pre or during the pregnancy period. The aim of this study was to analyze polymorphisms of *GSTM1* and *GSTT1* genes in order to verify if they have a role in genetic susceptibility to AL and correlate with some environmental aspects. Genomic DNA from 87 patients was analyzed by a multiplex PCR methodology. Material from twenty four families (the patient, the mother and/or the father) were also analyzed and a questionnaire about environmental aspects was applied. Significant increase in the prevalence of *GSTT1* null genotype was detected in the patient group comparing to controls (40% X 21%) (P=0.005). No difference was found in the prevalence of *GSTM1* null genotype between AL patients and controls (50% X 50%). We detected higher prevalence of occupational exposure to solvents among the fathers, being this an important aspect on leukemia development.

Key words: Acute Leukemia, polymorphism, genetic susceptibility, occupational exposure.

INTRODUÇÃO

Leucemia refere-se a um grupo de neoplasias malignas que levam à proliferação clonal de células primordiais hematopoéticas. Os sintomas mais comuns das leucemias são fadiga, fraqueza, perda de peso e anorexia (Robbins *et al.* 1996). A maioria dos casos é diagnosticada como Leucemia Linfóide Aguda (LLA) (Kwan *et al.* 2006).

O Instituto Nacional do Câncer estima a ocorrência de 9540 novos casos de leucemias no Brasil para o ano de 2008. A expectativa para o estado do Rio Grande do Sul é de 810 novos casos (INCA 2008).

A etiologia das LLAs em crianças pode ser explicada por uma combinação de fatores ambientais e suscetibilidade genética. O estágio da *iniciação* parece ocorrer ainda na fase embrionária. Além disso, existem evidências sugerindo que a exposição pré-concepção dos pais a agentes xenobióticos também poderia influenciar na iniciação da doença. Os estágios de *promoção* e *progressão* devem ocorrer após o nascimento. A exposição parental pré-concepção a hidrocarbonetos, compostos derivados de petróleo, solventes e poluição têm sido sugerida como fator de risco para a LLA infantil (Savitz & Chen 1990,

Shu *et al.* 1999). A exposição *in utero* à radiação ionizante tem sido bem descrita como fator de risco bem como a exposição ocupacional materna a pesticidas durante a gravidez. O mecanismo aqui envolvido parece ser a carcinogênese transplacentar. Outros estudos sugerem que algumas doenças maternas como gripe, pneumonia e doenças sexualmente transmissíveis, ocorrendo no período de três meses antes da gravidez até o final da amamentação, poderiam influenciar na iniciação da LLA. (Kwan *et al.* 2006, Pearson *et al.* 2000, Raaschou-Nielson *et al.* 2001, Reynolds *et al.* 2001). Também já foi sugerido o efeito protetor ocasionado pela suplementação de ferro durante a gestação (Kwan *et al.* 2006).

Genes e proteínas relacionados com metabolização/detoxificação de xenobióticos são usualmente utilizados em estudos de marcadores potenciais de suscetibilidade para desenvolvimento de várias doenças, inclusive câncer, nas quais a etiologia está relacionada à exposição ambiental. Genes que codificam para enzimas de ativação (reação de fase I) ou detoxificação (reação de fase II) de xenobióticos são alvos potenciais para estudos de suscetibilidade genética. Muitos estudos mostram que a detoxificação

1. Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Caixa Postal 15053, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brasil

2. Setor de Hematologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

* Autor para contato. E-mail: katia.kvitko@ufrgs.br

celular feita por enzimas está relacionada com a proteção celular. A inativação de xenobióticos e de toxinas endógenas possibilita a preservação da integridade celular, além da inibição dos eventos de citotoxicidade provocados por estas substâncias e que podem ser a causa de algumas doenças, como as leucemias (Miller *et al.* 2002, Norppa 2003, Wilkinson & Clapper 1997). As Glutathionas-S-transferases (GSTs) correspondem a uma superfamília envolvida na fase II e protegem a célula contra metabólitos endógenos e exógenos através da conjugação da glutathione endógena com compostos eletrofilicos. Estas enzimas estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos incluindo carcinógenos ambientais, espécies reativas de oxigênio e agentes terapêuticos (Hayes *et al.* 2005, Strange *et al.* 2001).

Pelo menos sete classes de GSTs citosólicas são conhecidas em mamíferos. Alguns genes têm sido bem caracterizados como polimórficos. Alguns destes polimorfismos são associados com aumento da suscetibilidade à carcinogênese e a doenças inflamatórias (Hayes *et al.* 2005, Rhor *et al.* 2008). Os genes *GSTM1*, localizado no cromossomo 1p13.1, e o *GSTT1*, localizado no cromossomo 22q11.2, apresentam polimorfismos de presença/ausência, o que resulta na falta das proteínas ativas (Pemble *et al.* 1994, Sprenger *et al.* 2000, Tan *et al.* 1995, Xu *et al.* 1998). Estes polimorfismos apresentam variação de frequências conforme a população e grupo étnico estudado (Arruda *et al.* 1998, Gaspar *et al.* 2004, Kvitko *et al.* 2006, Pemble *et al.* 1994, Warwick *et al.* 1994).

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

Este trabalho tem como objetivo analisar aspectos da exposição parental no desenvolvimento da leucemia na criança e, a frequência dos polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes que desenvolveram leucemias para verificar se estes polimorfismos estão colaborando com a suscetibilidade para o desenvolvimento da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Um banco de DNA foi estabelecido anteriormente no Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com amostras de pacientes com Leucemia Aguda (LA). Todos os pacientes foram classificados como Euro-Brasileiros. A amostra consiste em

87 pacientes classificados em: 35 LLA, 24 LMA (Leucemia Mielóide Aguda) e 28 casos de LA (sem linhagem celular afetada determinada). Destes pacientes, 52 eram masculinos e 35 femininos. Outro conjunto de pacientes, com seus familiares, foram contatados através do setor de Hematologia do HCPA. Foram efetivamente coletados sangue para extração de DNA de 24 famílias. Antes da coleta, os familiares eram apresentados ao projeto. Os que concordavam em participar assinavam termo de consentimento informado e um questionário relativo a dados de exposição ocupacional (emprego anterior e atual) ou lazer (cigarro, álcool, drogas) e características familiares (moradia anterior e atual, doenças na família, câncer na família, etc.) era preenchido. As famílias constam de pelo menos o paciente e um dos pais (o pai ou a mãe).

Extração de DNA e genotipagem

O DNA genômico destes pacientes foi extraído utilizando o protocolo de Lahiri & Nurnberger (1991). Os fragmentos gênicos das amostras foram amplificados utilizando-se primers específicos para os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* em um protocolo de PCR multiplex (Gaspar *et al.* 2004). O gene *GSTP1* foi usado como controle de amplificação visto que ambos genes analisados (*GSTM1* e *GSTT1*) apresentam polimorfismos de ausência e presença. A tabela 1 apresenta os tamanhos de fragmentos e as sequências dos primers utilizados. Em cada reação foram utilizados 100 ng de DNA genômico, 15 pmol de cada primer, 10 mM Tris-HCl, 4,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 100 mM de dNTPs e 1,0 U Taq DNA polimerase em um volume total de 50 µL. O protocolo de amplificação consiste de 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 6 ciclos em touchdown com 94°C, por 1 minuto, seguido de 2 minutos a 59°C (decrecendo a 54°C em uma taxa de 1°C por ciclo) e 1 minuto a 72°C, e 30 ciclos com 1 minuto a 94°C, seguido de 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo.

Análise estatística

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

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados para análise de PCR e os tamanhos dos fragmentos amplificados.

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

RESULTADOS

A idade destes pacientes variou entre seis meses e 63 anos, para LLA, sendo a média de $15,64 \pm 17,16$ anos, e entre seis e 80 anos para LMA, sendo a média de $34,75 \pm 20,93$ anos. Os pacientes provenientes do HCPA tinham média de idade, ao diagnóstico, de $7,90 \pm 4,76$. Destes, 16 pacientes eram masculinos e 8 femininos. Não houve diferença em relação à idade ao diagnóstico quando comparados pacientes masculinos e femininos.

Quanto aos resultados relacionados à exposição parental, foi verificado que, em relação ao hábito tabagista, 33,33% das mães fumam ou já fumaram, sendo que 19,05% fumaram durante a gestação. Já entre os pais a porcentagem de fumantes foi de 71,43%, um valor alto detectado na nossa amostra. Outro fator ambiental que avaliamos foi a exposição ocupacional a diferentes substâncias como tintas, solventes e agrotóxicos. Detectamos que 14,29% das mães e 71,43% dos pais relataram algum tipo de exposição ocupacional. A exposição materna foi principalmente a agrotóxicos e ao butano-propano; a exposição paterna foi, principalmente, a tintas e solventes.

A tabela 2 apresenta os resultados das frequências dos genótipos nulos relacionados aos genes *GSTM1* e *GSTT1*. Foi verificada diferença estatística entre as frequências do genótipo nulo para *GSTT1*, comparando pacientes com LA e a amostra controle ($P=0,005$). Como grupo controle foram usadas as frequências dos genótipos já descritas para população Euro-Brasileira do Rio Grande do Sul (Gaspar *et al.* 2004).

DISCUSSÃO

Embora algumas síndromes de origem monogênica estão associadas com o desenvolvimento de leucemias, elas explicam apenas uma pequena fração dos casos. Para muitos casos, a origem pode ser explicada por múltiplos fatores genéticos, como polimorfismos em enzimas metabolizadoras de xenobióticos, que podem interagir com fatores ambientais e modular a resposta desta exposição quando considerado o nível de dano incorporado e o resultando na indução da doença. Alguns trabalhos já relacionaram as Glutathionas-S-transferases com o desenvolvimento de LLA, mas com ressalvas de que estes achados deveriam ser confirmados por estudos maiores e com atenção especial a diversidade e geográfica na frequência destes polimorfismos (Pui *et al.* 2004).

A família das enzimas GSTs está envolvida no metabolismo de muitos xenobióticos, tendo seus níveis induzidos pela exposição a substâncias externas; esta indução

sugere que estas enzimas fazem parte de um sistema adaptativo ao estresse químico (Rollinson *et al.* 2000). As GSTs podem regular os níveis de dano ao DNA das células tronco hematopoéticas. *In vitro*, o genótipo nulo de *GSTT1* foi associado a um aumento da frequência de troca de cromátides irmãs induzidas por diepoxibutano em cultura de linfócitos (Norppa *et al.* 1995). A presença do gene *GSTM1* mostrou um papel de proteção de danos de DNA induzidos quimicamente e aductos de DNA (Liu *et al.* 1991, Van Poppel *et al.* 1992, Shields *et al.* 1993, Scarpato *et al.* 1997). Já foram detectadas as presenças das proteínas GSTT1 e GSTM1 na medula óssea de pacientes com neuroblastoma. Estas observações podem ser consideradas como indicando um mecanismo biológico de ligação entre o aumento no risco de desenvolvimento de leucemia e falta de atividade das enzimas GSTT1 e GSTM1 neste tecido (Hall *et al.* 1994, Rollinson *et al.* 2000). As enzimas GSTs também estão envolvidas na rota de defesa contra elementos endógenos tóxicos, agindo na via metabólica de excreção das espécies reativas de oxigênio (ROS). A importância do estudo destes polimorfismos também fica ressaltada quando consideramos que ROS pode ser gerado por estresse oxidativo celular, um componente endógeno da célula. A interação gene-ambiente, considerando estes polimorfismos em doenças auto-imunes, também tem sido estudada como em artrite reumatóide, lúpus, Síndrome de Sjögren, colite ulcerativa esclerose (revisão em Rohr *et al.* 2008). Em uma amostra de pacientes provenientes da mesma região deste trabalho (Porto Alegre, RS), Rohr *et al.* (2008) demonstraram influência do gene *GSTT1* na etiologia de artrite idiopática juvenil, onde os pacientes apresentaram frequência maior de genótipo nulo para este gene.

Este mesmo gene, o *GSTT1*, em nossos resultados, parece estar associado com o desenvolvimento de LA, enquanto que a falta da enzima GSTM1 não parece estar envolvida com o desenvolvimento da doença. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Rollinson *et al.* (2000) em uma amostra de indivíduos adultos do Reino Unido que desenvolveram LA. Entretanto, outros autores não encontraram associação entre o genótipo nulo *GSTT1* e outros genes de metabolização em LLA. (Canalle *et al.* 2004). Yuille *et al.* (2002) estudando uma amostra de pacientes com LLC, não encontraram diferenças nas frequências dos genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1*, porém, avaliando os genótipos de *GSTP1*, observaram que as frequências dos que conferem uma redução da atividade enzimática estavam aumentadas, apesar de não ser uma diferença significativa.

Esta diferença entre os estudos pode indicar que a

Tabela 2. Frequências dos genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* na população controle de Euro-brasileiros e na amostra de pacientes com Leucemia Aguda.

Genótipo	Euro-brasileiros**	Pacientes
<i>GSTM1</i> nulo	0,5	0,5
<i>GSTT1</i> nulo	0,211 *	0,4 *

* $P=0,005$

** Resultados descritos em Gaspar *et al.* 2004

influência dos genótipos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* na suscetibilidade genética para leucemias varia entre as populações, ou que podem estar havendo diferenças na exposição ambiental envolvendo o desenvolvimento de leucemia devido a interações específicas gene-gene ou gene-ambiente. Este último ponto poderia ser reforçado pelos resultados apresentados no trabalho de revisão de Pui et al. (2004) onde é demonstrado que alterações genéticas são diferentes quando são comparadas as leucemias agudas que se desenvolvem em crianças e adultos. Assim, acredita-se que a exposição e a metabolização dos xenobióticos no período pré-concepção e no período embrionário/fetal seria fator de risco importante para o desenvolvimento da doença em idade mais precoce. Nossos resultados até aqui demonstram indícios de uma possível influência de fator ambiental genotóxico relacionado com o desenvolvimento de LA em criança, fator que pode estar relacionado com a exposição parental. Na amostra estudada foi possível identificar alguns fatores ambientais relacionados como de risco, principalmente através da exposição ocupacional paterna, salientando uma prevalência à exposição a solventes e tintas. Estes dados são preliminares e devem ser interpretados com cautela, o que deveremos fazer aumentando a amostra e estudando outros genes de metabolismo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPERGS, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, V. R., GRIGNOLLI, C. E., GONÇALVES, M. S., SOARES, M. C., MENEZES, R., SAAD, S. T. O. & COSTA F. F. 1998. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (*GSTM1*) and theta (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clinical Genetics*, 54: 210-214.
- CANALLE, R., BURIM, R. V., TONE, L. G. & TAKAHASHI, C. S. 2004. Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 43: 100-109.
- GASPAR, P., MOREIRA, J., KVITKO, K., TORRES, M., MOREIRA, A. & WEIMER, T. 2004. *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *TP53* polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics and Molecular Biology*, 27: 133-138.
- HALL, A. G., MCGUCHIN, A. G., PEARSON, A. D. J., CATTAN, A. R., MALCOLM, A. J. & REID, M. M. 1994. Glutathione S-transferase in bone marrow metastasis of disseminated neuroblastoma. *Journal of Clinical Pathology*, 47: 468-469.
- HAYES, J. D., FLANAGAN, J. U. & JOWSEY, I. R. 2005. Glutathione-S-transferases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 5: 51-88.
- INCA. MINISTÉRIO DA SAÚDE-BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA. *Estimativas da incidência e mortalidade por câncer*. Rio de Janeiro: Disponível em: <http://www.inca.gov.br> acesso em 21 janeiro 2008.
- KVITKO, K., GASPAR, P. A., TORRES, M. R. & HUTZ, M. H. 2006. *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms in an Afro-Brazilian group. *Genetics and Molecular Biology*, 29(4): 613-616.
- KWAN, M. L., METAYER, C., CROUSE, V. & BUFFLER P. A. 2006. Maternal Illness and Drug/Medication Use during the Period Surrounding Pregnancy and Risk of Childhood Leukemia among Offspring. *American Journal of Epidemiology*, 165(1): 27-35.
- LAHIRI, D. K. & NURNBERG Jr., J. I. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, 19: 5444.
- LIU, Y. H., TAYLOR, J., LINKO, P., LUCIER, G. W., THOMPSON, C. L. & 1991. Glutathione S-transferase μ in human lymphocyte and liver: role in modulating formation of carcinogen-derived DNA adducts. *Carcinogenesis*, 12: 2269-2275.
- MILLER, M. S., MCCARVER, D. G., BELL, D. A., EATON, D. L. & GOLDSTEIN, J. A. 1997. Genetic polymorphism in human drug metabolic enzymes. *Fundamental and Applied Toxicology*, 40: 1-14.
- NORPPA, H., HIRVONEN, A., JARVENTAUS, H., UUSKULA, M., TASA, G., OJAJARVI, A. & SORSA, M. 1995. Role of *GSTT1* and *GSTM1* genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxibutano in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 16: 1261-1264.
- PEARSON, R. L., WACHTEL, H. & EBI, K. L. 2000. Distance-weighted traffic density in proximity to a home is a risk factor for leukemia and other childhood cancers. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 50: 175-180.
- PEMBLE, S., SCHROEDER, K. R., SPENCE, S. R., MEYER, D. J., HALLIER, E., BOLT, H. M., KETTERER, B. & TAYLOR, J. B. 1994. Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and characterization of genetic polymorphism. *Biochemical Journal*, 300: 271-276.
- PUI, C.-H., RELLING, M. V. & DOWNING, J. R. 2004. Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 350: 1535-1548.
- RAASCHOU-NIELSON, O., HERTEL, O., THOMSEN, B. L. & OLSEN, J. H. 2001. Air pollution from traffic at the residence of children with cancer. *American Journal of Epidemiology*, 153(5): 433-443.
- REYNOLDS, P., ELKIN, E., SCALF, R., VON BEHREN, J. & NEUTRA, R. R. 2001. A case-control pilot study of traffic exposures and early childhood leukemia using a geographic information system. *Bioelectromagnetics*, Supplement 5: S58-S68.
- ROHR, P., VEIT1, T. D., I. SCHEIBEL, I., XAVIER, R. M., BRENOL, J. C. T., CHIES, J. A. B. & KVITKO, K. 2008. *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 26: 169-173.
- ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S. & KUMAR, V. 1996. Fundamentos de Patologia: Estrutural e funcional. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 780p.
- ROLLINSON, S., RODDAM, P., KANE, E., ROMAN, E., CARTWRIGHT, R., JACK, A. & MORGAN, G. J. 2000. Polymorphism variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukemia. *Carcinogenesis*, 21: 43-47.
- SAVITZ, D. A. & CHEN, J. 1990. Parental occupation and childhood cancer: review of epidemiologic Studies. *Environmental Health Perspectives*, 88: 325-337.
- SCARPATO, R., HIRVONEN, A., MIGLIORE, L., FALCK, G & NORPPA, H. 1997. Influence of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms on the frequency of chromosome aberrations in smokers and pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutation Research*, 389: 227-235.
- SHIELDS, P. G., BOWMAN, E. D., HARRINGTON, A. M., DOAN, V. T. & WESTON, A. 1993. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes. *Cancer Research*, 53: 3486-3492.
- SHU, X. O., STEWART, P., WEN, W.-Q., HAN, D., POTTER, J. D., BUCKLEY, J. D., HEINEMAN, E. & ROBISON L. L. 1999. Parental occupational exposure to hydrocarbons and risk of acute lymphocytic leukaemia in offspring. *Cancer Epidemiology, Biomarkers Prevention*, 8: 783-791.
- SPRENGER, R., SCHLAGENHAUFER, R., KERB, R., BRUHN, C., BROCKMOLLER, J., ROOTS, I. & BRINKMANN, U. 2000.

- Characterization of glutathione S-transferase *GSTT1* deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics*, 10: 557-565.
- STRANGE, R. C., LEAR, J. T. & FRYER, A. A. 1998. Glutathione S-transferase polymorphisms: influence on susceptibility to cancer. *Chemical Biological Interaction*, 111-112: 351-364.
- STRANGE, R. C., SPITERI, M. A., RAMACHANDRAN, S. & FRYER, A.A. 2001. Glutathione S-transferase family of enzymes. *Mutation Research*, 482: 21-6.
- TAN, K. L., WEBB, G. C., BAKER, R. T. & BOARD, P. G. 1995. Molecular cloning of a cDNA and chromosomal localization of a human theta-class glutathione S-transferase gene (*GSTT2*) to chromosome 22. *Genomics*, 25: 381-387.
- VAN POPPEL, G.; VOGEL, N.; VAN BALDEREN & KOK, F. J. 1992. Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme μ . *Carcinogenesis*, 13: 303-305.
- WARWICK, A., SARHANIS, P., REDMAN, C., PEMBLE, S., TAYLOR, J. B., KETTERER, B., JONES, P., ALLDERSEA, J., GILFORD, J. & YENGI, L. 1994. Theta class glutathione S-transferase *GSTT1* genotypes and susceptibility to cervical neoplasia: interactions with *GSTM1*, *CYP2E1* and smoking. *Carcinogenesis*, 16: 1243-1245.
- WILKINSON, J. & CLAPPER, M. L. 1997. Detoxification enzymes and chemoprevention. *Proceeding Society Experimental Biological Medicine*, 216: 192-200.
- XU, S., WANG, Y., ROE, B. & PEARSON, W. R. 1998. Characterization of human class mu glutathione S-transferase gene cluster and the *GSTM1* deletion. *Journal Biological Chemistry*, 273: 3517-3527.
- YUILLE, M., CONDIE, A., HUDSON, C., KOTE-JARAI, Z., STONE, E., EELES, R., MATUTES, E., CATOVSKY, D. & HOUSLTON, R. 2002. Relationship between glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 99: 4216-4218.