



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA**

**ANCESTRALIDADE E FREQUÊNCIA DE GENÓTIPOS NULOS DOS GENES
GSTM1 E *GSTT1* EM UMA POPULAÇÃO DE LONGEVOS DO NORDESTE
BRASILEIRO**

SÔNIA CARMEM MORAIS LEITE

**CAMPINA GRANDE
2020**

SÔNIA CARMEM MORAIS LEITE

**ANCESTRALIDADE E FREQUÊNCIA DE GENÓTIPOS NULOS DOS GENES
GSTM1 E *GSTT1* EM UMA POPULAÇÃO DE LONGEVOS DO NORDESTE
BRASILEIRO**

**Dissertação apresentada à Universidade
Estadual da Paraíba - UEPB, em cumprimento
aos requisitos necessários para a obtenção do
Título de Mestre em Saúde Pública.**

Área de Concentração Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Mathias Weller

**CAMPINA GRANDE
2020**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

L533a Leite, Sônia Carmem Morais.

Ancestralidade e frequência de genótipos nulos dos genes GSTM1 e GSTT1 em uma população de longevos do nordeste brasileiro [manuscrito] / Sônia Carmem Morais Leite. - 2020.

68 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2020.

"Orientação : Prof. Dr. Mathias Weller, Departamento de Biologia - CCBS."

1. GSTM. 2. GSTT. 3. Ancestralidade. 4. Polimorfismo genético. I. Título

21. ed. CDD 614

SÔNIA CARMEM MORAIS LEITE

**ANCESTRALIDADE E FREQUÊNCIA DE GENÓTIPOS NULOS DOS GENES
GSTTM1 E GSTT1 EM UMA POPULAÇÃO DE LONGEVOS DO NORDESTE
BRASILEIRO**

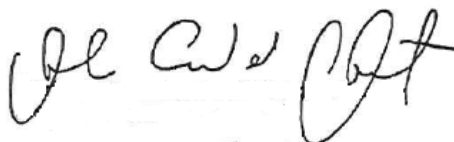
Dissertação apresentada à Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Saúde Pública.

Aprovada em: 28/08/2020

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Mathias Weller (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dra. Silvana Cristina Santos
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Renan Barbosa Lemos
Universidade de São Paulo (USP)

Ao meu pai, Adelino, minha mãe Terezinha, pelos punhos firmes de descanso e amor,
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Deus trino, Pai, Amigo e Fiel pelos imensas formações vivenciadas neste tempo. Agradeço por esculpir e polir, com delicadeza a chama do Amor Esposal através deste meio em minha vida. A Ti, imenso espanto por ser sempre Belo, Novo e Criativo. Todo o louvor e gratidão.

Aos familiares, pelo carinho e aconchego sustentador, mainha, papai, kaká, Marcelo, Jacó, Glorinha, Pedro, Letícia, Tio Zé, Padrinho tony e agregados.

A tia Corrinha, por seder sua casa, vida, amor e maternidade neste tempo de mestrado. Gratidão.

Ao professor Mathias Weller, primeiramente por seu amor a ciência e sua dedicação a fazê-la com respeito e dignidade, em segundo, pela oportunidade de realizar esta pesquisa, por acreditar e por ser compassivo nas explicações e demonstrações do caminho e dos processos para levar a termo este estudo.

A professora Silvana pelo apoio científico e estrutural no Laboratório de genética.

A Priscila e Allysson por todo o apoio e dicas durante cada etapa da pesquisa.

A todo o grupo de pesquisa epidemiologia e genética de câncer, pela presença, risos e estímulos ao longo do caminho. Muito obrigada (de forma mais especial ainda, Steffany, Thereza, Brygyt), Raysla, Saionara, Millena, Kedma, Lorena, Tácila, Isabella, Adriana, Radmila, Eduardo, Thalita, Clarissa.

A todos os colegas de turma, que acompanharam toda a caminhada.

A turma de biologia evolutiva 2019.2 noite, grata pela oportunidade e crescimento vividos com vocês.

A professora Márcia e suas alunas de doutorado e pós doutorado Raizza e Luana pelo encorajamento e apoio, por estarem sempre de braços abertos, durante todos esses anos, e por serem exemplos de fidelidade a biologia molecular e laboratório de pesquisa.

Aos amigos, formadores comunitários e pessoais e autoridades, irmãos de célula comunitária e toda a comunidade e obra Shalom da Comunidade Católica Shalom, missão Campina Grande e Patos. Muito obrigada pelo dom da vida, unidade e carisma que nos torna um só corpo.

Aos de sempre, Alexasandra, Marília, Roberta, Elaine, Bruno, Thalita, Val, Tainá, Pedrinho, Niel, Priscyla, Mara, Valéria vocês são leveza e cuidado.

A CAPES, pela bolsa de estudo.

“A fé e a razão caminham juntas, mas a fé vai mais longe”.
Santo Agostinho

RESUMO

INTRODUÇÃO: As Glutathione S-Transferases (GSTs) é uma importante superfamília de isoenzimas antioxidantes metabólicas da fase II, estando envolvidas no processo de biotransformação de xenobióticos. Os genes *GSTM1* (Glutathione S-Transferase Mu 1) e *GSTT1* (Glutathione S-Transferase Teta-1) tem papel preponderante para detoxificação do corpo. Porém, a presença do polimorfismo por deleção alélica em homozigose (*GSTM1*0 GSTT1*0*) de ambos os genes, leva a perda total da função enzimática. A frequência do alelo *GSTM1*0 GSTT1*0* nulo é muito variável em diferentes populações, estando associado com o aumento do risco de câncer e outras doenças. Existem muitos estudos sobre as frequências dos alelos nulos em diferentes populações humanas, no entanto poucos que associaram a ancestralidade, aplicando marcadores moleculares a estas frequências. **OBJETIVO:** O presente estudo teve por objetivo analisar a frequência dos alelos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* e suas correspondentes ancestralidade Ameríndia, Africana e Europeia em uma população de idosos longevos residentes no sertão do Nordeste do Brasil. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A amostra foi composta de 72 idosos longevos, de 80a 102 anos de idade, residentes no município de Brejo dos Santos-Paraíba. Para determinação da ancestralidade foram utilizados de 10 a 41 Nucleotídeos de Polimorfismos Simples (SNP's) associados aos genes *GSTM1* e *GSTT1* da matriz *Affymetrix*, e a análise dos dados feita pelo *software Genotyping Console*. A determinação da frequência de genótipos nulos foi feita através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex e gel eletroforese. **RESULTADOS:** A frequência observada foi de 36.1% e 8.3% para alelos nulos de *GSTM1* e *GSTT1*, respectivamente. Para a ancestralidade dos genótipos nulos de *GSTM1*, 13.4% eram africanos, 82.7% europeus, e 3.9% ancestralidade nativo americanos. Para os genótipos nulos de *GSTT1*, 8.3% eram africanos, 66.7% europeia e 25.0% nativo americano. A distribuição da frequência do alelo de *GSTM1* e *GSTT1* não foi significativamente diferente entre os haplotipos africanos, europeus e ameríndios, com $p=0,389$ e $p=0,102$. O fato que a frequência do alelo nulo de *GSTM1* tenha sido maior que a do gene *GSTT1*, foi em concordância com a literatura publicada. Além disso, semelhante à estudos anteriores realizados em diferentes populações humanas, os alelos nulos de ambos os genes, foram mais frequentes associados à ancestralidade Europeia e menos com a ancestralidade Africana. **CONCLUSÃO:** Diante das evidências encontradas, sugerimos que a população estudada pode servir como modelo em estudos de caso-controle com o intuito de pesquisar associações dos alelos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* com diferentes tipos de câncer. Como a população de estudo foi muito homogênea esta aproximação pode contornar o problema que diferentes populações acumulam distintos fatores de risco que podem obscurecer diferenças genéticas.

Palavras-Chave: Glutathione S – Transferase. *GSTM1*. *GSTT1*. Ancestralidade. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

INTRODUCTION:the Glutathione S-transferases (GSTs) are an important superfamily of phase II metabolic antioxidant isoenzymes involved in the xenobiotic biotransformation process. The *GSTM1* (Glutathione S-Transferase Mu 1) and *GSTT1* (Glutathione S-Transferase Theta-1) genes have a preponderant role for the detoxification of the body. However, the presence of allelic deletion polymorphism in homozygosis (*GSTM1*0 GSTT1*0*) of both genes lead to total loss of the enzymatic function. The frequency of the null *GSTM1*0 GSTT1*0* allele is very variable in different populations, being associated with an increased risk of cancer and other diseases. There are many studies on the frequency of null alleles in different human populations of the world, but few studies that have associated ancestry, applying molecular markers, with these frequencies.**OBJECTIVE:** This study aimed to analyze the frequency of null alleles of *GSTM1* and *GSTT1* and their corresponding Amerindian, African and European ancestry, in a population of long-lived elders in the Northeast hinterlands of Brazil.**MATERIAL AND METHOD:** The sample was composed by 72 long-lived elders, of age between 80 and 102, living in the municipality of Brejo dos Santos-Paraíba. To determine the ancestry, it was used 10 and 41 Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) associated with the genes *GSTM1* and *GSTT1* of the *Affymetrix* array, and the data analysis was done by the *Genotyping console* software. The determination of null genotypes frequency was done by multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) and gel electrophoresis. **RESULTS:** The observed frequency was 36.1% and 8.3% for null alleles of *GSTM1* and *GSTT1* respectively. For ancestry of null genotypes of *GSTM1*, 13.4% were Africans, 82.7% European, and 3.9% of Native American ancestry. For the null genotypes of *GSTT1*, 8.3% were Africans, 66.7% European, and 25.0% Native American. The distribution frequency of *GSTM1* and *GSTT1* alleles was not significantly different between the African, European and Amerindian haplotypes, with $p=0,389$ and $p=0,102$. The fact that the frequency of the *GSTM1* null allele was higher than of the *GSTT1* gene was in agreement with the published literature. Besides, similar with previous studies carried out with different human populations, the null alleles of both genes were more frequently associated with the European ancestry and less with the African ancestry.**CONCLUSIONS:** In view of the evidence found, we suggest that the studied population can serve as a model in case-control studies with the aim of investigating associations between the null alleles of *GSTM1* and *GSTT1* with different types of cancer. As the study population was very homogeneous, this approach can overcome the problem that different populations accumulate different risk factors that can obscure genetic differences.

Keywords: Glutathione S-transferase. *GSTM1*. *GSTT1*. Ancestry, Genetic polymorphism.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classes das GST humanas e suas principais enzimas.....	15
Quadro 2 – Primers utilizados nos ensaios.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura das GST's.....	18
Figura 2 – Seqüência dos efeitos biológicos nas reações de biotransformação dos xenobióticos.....	19
Figura 3 – Distribuição de <i>GSTT1*0</i> e <i>GSTM1*0</i> em 57 países de acordo com PALM-CANO <i>et al.</i> , 2017.....	21
Figura 4 – Área geográfica onde há presença da tribo dos Ariú no Rio Grande do Norte.....	30
Figura 5 – divisão política. Mesorregiões da Mata, Agreste, Borborema e Sertão sentido Leste/Oeste.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELP	Aborto espontâneo antes de 12 semanas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
GST's	Glutathione S-Transferase
GSTM1	Glutathione S-Transferase Mu 1
GSTT1	Glutathione S-Transferase Teta-1
GSTM1*0	Deleção alélica em homozigose do gene Glutathione S-Transferase Mu 1
GSTT1*0	Deleção alélica em homozigose do gene Glutathione S-Transferase Teta-1
NEGE	Núcleo de Estudos em Genética e Educação
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
RPL	Três ou mais abortos espontâneos consecutivos do mesmo parceiro
OR	Odd Ratio
SABE	Saúde Bem – Estar e Envelhecimento
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 CLASSES E FUNÇÕES DAS GST´s.....	14
1.1.1 Estrutura e Principais Funções de GST.....	17
1.1.2 Frequência de <i>GSTM1*0</i> e <i>GSTT1*0</i> em Populações Humanas.....	20
1.1.3 Associação de <i>GSTM1*0</i> e <i>GSTT1*0</i> com doenças humanas.....	22
1.1.4 <i>GSTM1*0</i> e <i>GSTT1*0</i> e associação ao Câncer.....	24
1.2 Ancestralidade e Polimorfismos de Nucleotídeo Simples (SNP).....	26
1.2.1 Diversidade da espécie humana.....	27
1.2.2 Povoamento do Brasil.....	27
1.2.3 Povoamento do sertão paraibano.....	28
1.2.4 Município de Brejo dos Santos – PB	31
1.2.5 Possibilidades de estudos em populações triíbridas.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4. MÉTODOS.....	35
4.1 Local e Sujeitos da Pesquisa.....	35
4.2 Extração e Genotipagem do DNA.....	35
4.4 Técnica de Eletroforese em Gel.....	36
5. RESULTADOS.....	38
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
7. REFERÊNCIAS.....	62

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é parte de um conjunto de pesquisas desenvolvidas pelo grupo “Epidemiologia e Genética de Câncer”, vinculado ao programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), com vistas ao estudo de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP’s) e ancestralidade. O grupo tem se debruçado também na identificação de fatores de risco que possam vir a contribuir para o desenvolvimento de malignidades que afetam parcela significativa da população local e do mundo. Além disso, é também de interesse do grupo investigações quanto a atrasos, tanto por parte do paciente quanto por conta do sistema de saúde, naquilo que confere aos diagnósticos e início de tratamentos de câncer de mama em mulheres com atenção à população do nordeste brasileiro

Um estudo caso - controle elaborado em 2015 mostrou que menarca precoce, período reprodutivo superior a dez anos e baixa paridade contribuem para aumento do risco de câncer de mama (ALMEIDA, G. S. De *et al.*, 2015). Outro estudo subsequente, que se deu através de revisão integrativa da literatura em populações da América Latina, evidenciou condições como: obesidade, história familiar e curta duração da amamentação como sendo fatores de risco para câncer de mama (JERÔNIMO; FREITAS; WELLER, 2017).

Posteriormente, uma pesquisa do tipo caso-controle feita nos principais centros de referência para tratamento da malignidade citada acima, na Paraíba, realizada por Gomes (2019), elencou: uso de contraceptivos orais, histórico familiar e consumo de álcool como fatores responsáveis pelo aumento do risco de câncer de mama em mulheres pré e pós menopausadas. Todos estes estudos constituem alguns dos mais recentes panoramas a respeito do câncer de mama, bem como os principais fatores de risco comuns às populações do nordeste do Brasil.

Parte das pesquisas desenvolvidas por nosso grupo estão ligadas ao Núcleo de Estudo em Genética e Educação -NEGE, da UEPB, encabeçado pela professora doutora *Silvana Santos*, que há mais de uma década estuda doenças genéticas raras e uniões consanguíneas no interior dos estados da Paraíba e do Rio Grande do Norte (MACEDO-SOUZA *et al.*, 2005; SANTOS, S. C. *et al.*, 2008). Outros segmentos de pesquisa também são foco do NEGE. A exemplo disso temos o projeto SABE (Saúde, Bem Estar e Envelhecimento), que possibilitou a execução deste estudo de ancestralidade e frequência de alelos nulos de *GSTM1* e *GSTT1*, na população alvo composta, exclusivamente, de longevos.

Este é um estudo de genética, oriundo do projeto SABE, coordenado pela Organização Pan-Americana de Saúde, no qual se buscou avaliar condições de vida e saúde de pessoas

idosas, em sete centros urbanos da América Latina e Caribe, com delineamento de coorte longitudinal, no período compreendido desde outubro de 1999 até dezembro de 2000. A cidade de São Paulo forneceu as amostras brasileiras. Em 2006 a Universidade de São Paulo, apoiada pelo Ministério da Saúde e FAPESP, deu continuidade ao projeto, acrescentando novas coortes.

O projeto SABE, de São Paulo, estendeu seu alcance a outro estado brasileiro, possibilitando, assim, que a Paraíba se associasse e realizasse também a pesquisa. A cidade de Brejo dos Santos sediou o estudo sobre qualidade e condições de vida dos idosos, estabelecendo parceria entre a Secretaria Municipal de Saúde e a Universidade Estadual da Paraíba. A cidade está localizada na mesorregião do Sertão Paraibano e Microrregião de Catolé do Rocha - tem, segundo dados do IBGE, uma população estimada em 6.449 habitantes.

Estudos genéticos anteriores foram realizados em Brejo dos Santos, tendo Weller et al., (2012), constatado neles que 19.48% das uniões da população acontecem entre pares consanguíneos, cujo coeficiente de endogamia é de 0.00504. Deficiência intelectual, encontrada na enzima IMPA1, foi detectada em alguns moradores do município. Ao analisar as especificidades da cidade de Brejo dos Santos, sua localização e demais pesquisas nas regiões circunvizinhas, o grupo NEGE, tendo como responsável principal pela pesquisa a professora Silvana Santos, realizou, em maio de 2017, a coleta de dados, através de visitas pré-agendadas, mediadas pelos Agentes Comunitários de Saúde, preferencialmente, na casa dos participantes. Foram realizadas entrevistas e coleta de sangue venoso, com idosos do município. Vale salientar que parte do estudo foi feito em parceria com a Faculdade de Saúde Pública de São Paulo e também com o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo.

O presente trabalho, que se debruça, inclusive, em relação à temática da inferência de ancestralidade alélica da população do sertão nordestino, propôs a determinação da ancestralidade dos genes *GSTMI* e *GSTTI* pertencentes à superfamília das Glutathione S-Transferase: peças chave no processo de biotransformação de xenobióticos. Outra informação relevante é a de que genótipos nulos vêm sendo associados, com certa frequência, ao aumento do risco de cânceres e outras patologias relacionadas a grupos étnicos distintos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CLASSES E FAMÍLIAS DAS GST's

As Glutathione Transferases ou Glutathione S- Transferases são classificadas em três grandes famílias: a citosólica, mitocondrial e microssomal. Todas elas são vastamente distribuídas no meio natural, sendo as citosólicas as mais presentes no organismo humano. Há ainda, uma quarta família de GST's encontrada apenas em bactérias (ALLOCATI *et al.*, 2009; HAYES, J. D.; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

As enzimas GSTs citosólicas foram descritas, inicialmente, na década de 1960, através de experimentos realizados em fígado de ratos (BOOTH; BOYLAND; SIMS, 1961). Constituem uma das famílias mais importantes para a desintoxicação dos organismos. Descobertas científicas recentes têm demonstrado novas funções que fogem do papel toxicológico, a princípio, pormenorizado (CHATTERJEE; GUPTA, 2018; OAKLEY, 2011).

Tais enzimas são codificadas em cinco loci distintos, sendo eles α , μ , π , θ e γ , estando distribuídos em sete cromossomos. Além disso, ao menos 16 genes apontam como responsáveis pela codificação das enzimas GST's, localizadas no citoplasma celular e, no mínimo, mais 6 sintetizam as proteínas de membrana (STRANGE *et al.*, 2001).

As várias classes que compõem as GST's citosólicas são chamadas de: *Alpha*, *Mu*, *Kappa*, *Pi*, *Sigma*, *Theta*, *Ômega* e *Zeta*. Como se sabe, elas, aparecem fixadas nos cromossomos 6, cromossomo 1, *Kappa* de localização desconhecida, cromossomo 22, cromossomo 11, cromossomo 4, cromossomo 10 e por fim *Zeta* no cromossomo 14, respectivamente, no quadro observa-se as famílias, classes e principais enzimas (HAHOLU *et al.*, 2013; KLAASSEN, 2007). Importante dizer, ainda, que uma atenção especial é dada às classes *Mu* e *Theta*, devido à presença de polimorfismos nos genes que codificam respectivamente as enzimas GSTM1 e GSTT1 (HAYES, J. D.; STRANGE, 2000).

A família *Mu* possui cinco dos seus genes localizados no cromossomo 1p13.3, estando estes mesmos genes situados em tandem *GSTM4*, *GSTM2*, *GSTM1*, *GSTM5*, *GSTM3*. Já a família *Theta* possui 2 genes *GSTT1* e *GSTT2* no cromossomo 22 (XU *et al.*, 1998; STRANGE *et al.*, 2001). Destacam-se entre os genes citados acima: *GSTM1* e *GSTT1*. *GSTM1* na posição 1p13.3 (cromossomo 1p13.1), tendo 5,9 kb de DNA genômico, com 8 éxons; e o gene *GSTT1*, da classe *Theta*, na posição 22q11.2, possui 7,6 kb de DNA e 5 éxons (SÁ *et al.*, 2014).

Quadro 1: Classes das GST humanas e suas principais enzimas.

FAMILIA	CLASSE	GENE	ENZIMA
Citosólica	α	<i>GSTA1</i>	GSTA1-1
		<i>GSTA2</i>	GSTA2-2
		<i>GSTA3</i>	GSTA3-3
		<i>GSTA4</i>	GSTA4-4
		<i>GSTA5</i>	GSTA5-5
	μ	<i>GSTM1</i>	GSTM1-1
		<i>GSTM2</i>	GSTM2-2

	<i>GSTM3</i>	GSTM3-3
	<i>GSTM4</i>	GSTM4-4
	<i>GSTM5</i>	GSTM5-5
π	<i>GSTP1</i>	GSTP1-1
Σ	<i>PGDS</i>	GSTS-1
θ	<i>GSTT1</i>	GSTT1-1
	<i>GSTT2</i>	GSTT2-2
Z	<i>GSTZ1</i>	GSTZ1-1

	Ω	<i>GSTO1</i>	GSTO1-1
		<i>GSTO2</i>	GSTO2-2
Mitochondrial	<i>K</i>	<i>GSTK1</i>	GSTK1-1
Microsomal (MAPEGs)	gpI	<i>MGST2</i>	MGST2
		<i>ALOX5AP</i>	Flap
		<i>LTC4S</i>	LTC.S
	gpII	<i>MGST3</i>	MGST3

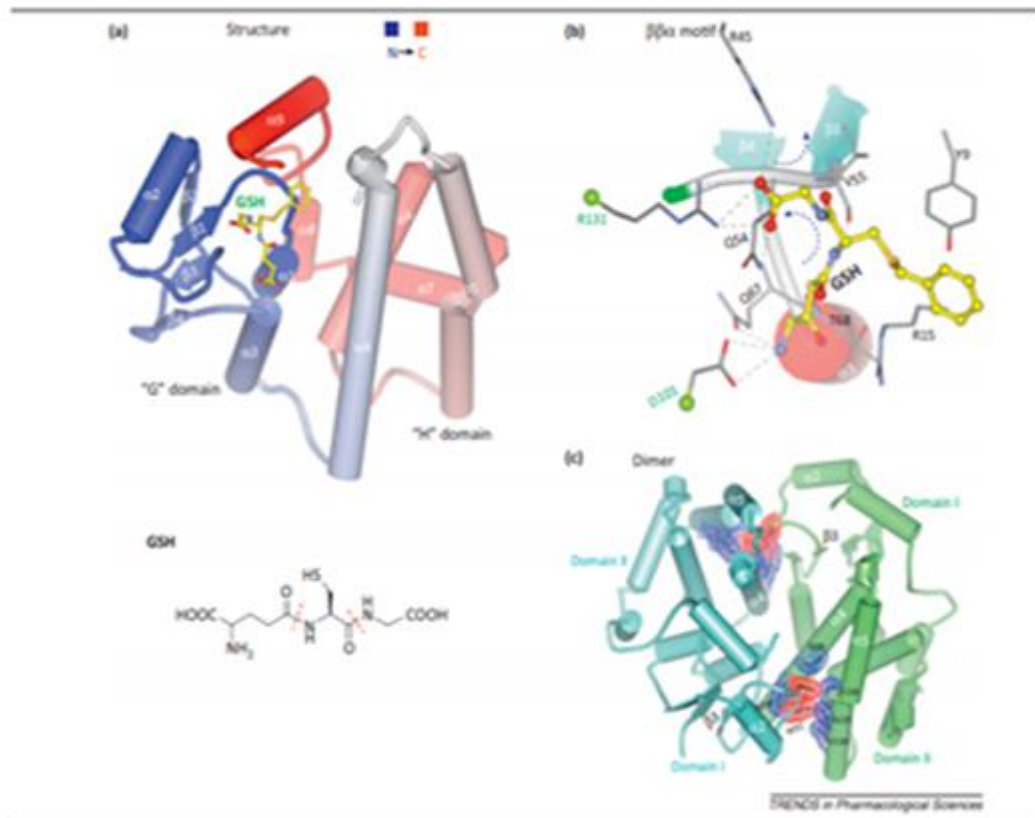
FONTE: Casarett&Doull's,2007.

1.1.1 Estrutura e principais funções de GST's

As GST's são moléculas complexas com subunidades secundárias e terciárias bem conservadas. Apresentam dois sítios ativados que independem um do outro. Cada sítio ativo representa regiões de ligação: uma específica para a glutatona e outra região para os eletrófilos substratos para a enzima (ALLOCATI *et al.*, 2018; WU; DONG, 2012). A região de domínio N-terminal, para ligação da Glutaciona, possui quatro filamentos do tipo beta-folha, semelhante à estrutura da tioredoxina. A região de domínio C – terminal, possui entre

cinco e seis hélices principais, sofrendo algumas modificações a depender da classe. As classes *Alpha*, *Theta* e *Ômega*, a exemplo, possuem uma hélice a mais α_9 , já a classe *um* e *Ômega*, possuem laço maior entre α_4 e α_5 , a Figura 1 descreve a estrutura enzimática (HAYES, J. D.; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; WU; DONG, 2012).

Figura 1: Estrutura de GST.



Fonte: We et al.,2012.

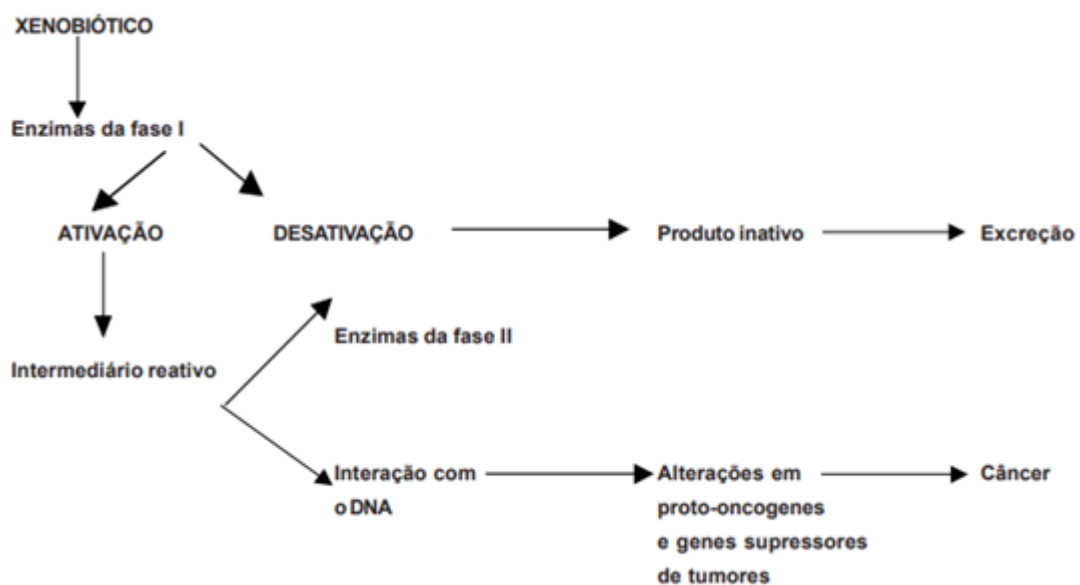
Inevitavelmente, os organismos estão expostos a diversos compostos naturais ou químicos que podem resultar em interações deletérias. Uma das funções mais bem descritas das GST's é a atuação, na fase II, do processo de biotransformação de xenobióticos que ocorre no tecido hepático. As enzimas desta fase catalisam a conjugação dos metabólitos com substratos endógenos como, por exemplo: glutathione, ácido glucurônico e glicina, a fim de torná-los mais solúveis em água. A conjugação xenobiótico e glutathione é a mais quantificada para os xenobióticos, isto porque grande quantidade de glutathione é encontrada no meio citoplasmático, após o processo de conjugação. O conjugado recém formado é levado ao meio intercelular por transportadores específicos, capazes de reconhecê-los, que foram, ali, clivados por ação de outras proteínas que pertencem ao complexo de biotransformação de fase III

(HAYES, P. C.; BOUCHIER; BECKETT, 1991; HUBER; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, D. E, 2008).

As GST's também atuam no metabolismo de substâncias endógenas como as dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, na conversão do ácido 13-*cis*-retinóico para ácido 13-*trans*-retinóico, sendo responsáveis também pela catabolização de metabólitos reativos do oxigênio, resultantes da respiração aeróbica como, por exemplo, radical hidroxila e o ânions superóxidos (CHEN; JUCHAU, 1998; GUENGERICH *et al.*, 2003). A classe *Alpha* está associada à síntese dos hormônios esteroides testosterona e progesterona a partir do colesterol (JOHANSSON; MANNERVIK, 2001). As GST's estão envolvidas no processo de sinalização celular, inferindo-se na síntese de prostaglandinas. Estipula-se o envolvimento das GST's na síntese e na inativação de eicosanoides desde o ácido araquidônico (HAYES, J. D.; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

As GST's catalisam uma série de substratos exógenos como: drogas, herbicidas, pesticidas, derivados da indústria, carcinógenos, epóxicos derivados da aflotoxinas B, antibióticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos- presentes na fumaça do cigarro - dentre outros. Vale destacar que alterações na funcionalidade destas enzimas ocasionam modificações na resposta à drogas e, além disso, uma maior susceptibilidade a danos celulares (HAMILTON *et al.*, 2003; HAYES, J. D.; PULFORD, 1995), conforme pode ser constatado na Figura 2.

Figura 2: Sequência dos efeitos biológicos nas reações de biotransformação dos xenobióticos.



Fonte: Losi-guembarovski., Cólus, 2001.

O gene *GSTM1* é polimórfico e apresenta, através de um alelo, atividade nula, ocasionada por uma grande deleção gênica (*GSTM1*0*). Há também outros dois genes funcionais: *GSTM1A* e *GSTM1B*. O *GSTT1* mostra, igualmente, genótipo nulo por deleção (*GSTT1*0*) o que para ambos os genes significa a perda total da atividade enzimática. Indivíduos que exibem este genótipo agrupam-se no fenótipo conjugador negativo, e isso ocorre por conta da ausência da enzima GSTM1 e GSTT1 (REBBECK TR 1997; GOLINI – BERTOLLO et al., 2006; NEBERT, 1991).

Um Estudo de metanálise feito a partir da investigação de 63 pesquisas evidenciou associação dos *GSTM1*0* e *GSTT1*0* ao aumento do risco de câncer de bexiga em diferentes populações ao redor do mundo. Deste total, 46 estudos incluíram 28,270 indivíduos, obtiveram *OR* de 1,36 (IC de 95%: 1,25-1,47, *P* <0,01) referente a *GSTT1*0*, já para *GSTM1*0* 54 estudos apontaram susceptibilidade ao risco de câncer de bexiga com *OR* de 1,13 (IC de 95%: 1,02-1,25, *P* <0,01), envolvendo 28.270 participantes.

Pesquisas como a que foi desenvolvida no Nordeste da Índia, onde o polimorfismo das GST's apareceu associado ao risco aumentado de câncer na cavidade oral e em outros tecidos da mesma região, bem como os estudos que mostravam a incidência de câncer de colo retal, em Taiwan, apontam a ligação destes alelos nulos ao aumento do risco de doenças (MONTAZERI-NAJAFABADY *et al.*, 2020; YU, et al., 2017; THOUDAM et al., 2010).

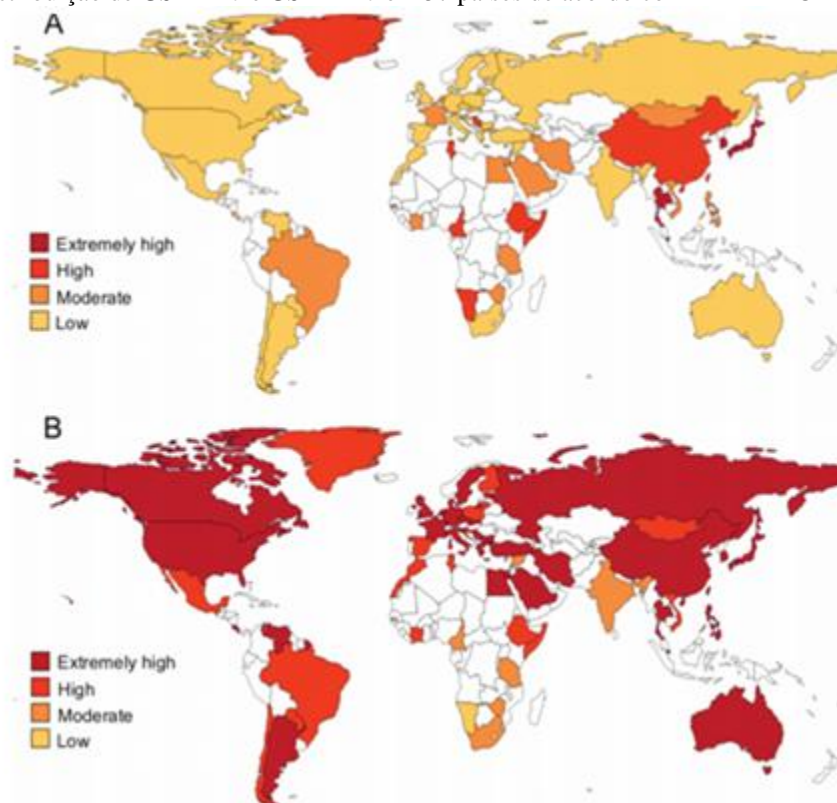
1.1.2 Frequência de *GSTM1*0* e *GSTT1*0* em populações humanas

As frequências de *GSTM1*0* e *GSTT1*0* mostram-se variantes em relação aos diferentes grupos étnicos. Tais variações podem modular o risco de diversos tipos de malignidades e outras patologias de acordo com a ancestralidade da população. Dessa forma, torna-se relevante, diante do pressuposto, descrever as frequências *GSTM1*0* e *GSTT1*0* em populações distintas (PALMA-CANO et al., 2017; PEMBLE *et al.*, 1994).

Em sua pesquisa, Palma-Cano e colaboradores (2017), analisou dados da genotipagem em 211 indivíduos de etnia ameríndia, oriundos do noroeste do México. As frequências obtidas foram 0,44 para *GSTM1*0* e 0,11 para *GSTT1*0*, evidenciando uma presença significativamente maior de *GSTM1*0* no grupo estudado. A mesma pesquisa também analisou a frequência de *GSTM1*0* e *GSTT1*0* em 57 países, na qual observou uma variação total de 0,11 a 0,67 para *GSTM1*0* e 0,10 a 0,51 para *GSTT1*0*. É possível constatar esses valores no mapa da Figura 3, em que estão pormenorizados os resultados da revisão

encontrados pelo autor, sendo considerado os seguintes valores para cada categoria: baixa:0,10–0,22; moderada:0,23–0,35; alta:0,36–0,48; extremamente alta: 0,48–0,67.

Figura 3- Distribuição de *GSTT1*0* e *GSTM1*0* em 57 países de acordo com PALMA-CANO *et al.*,2017.



Fonte:PALMA-CANO *et al.*, 2017.

Em seu estudo, Piacentini e colaboradores (2011), avaliaram populações de quatro países, sendo dois europeus e dois africanos. Na europa, Itália e Espanha aparecem com amostras de 120 e 94 participantes, respectivamente. Já no continente africano, temos: Etiópia e Camarões, totalizando, em sequência, amostras de 153 e 126 participantes, O estudo teve como objetivo, em todos os países, inferir a respeito das frequências de *GSTM1*0* e *GSTT1*0*.

Os autores observaram que o alelo *GSTM1*0* esteve mais frequente entre a população europeia, sendo 49,2% em Italianos e, 55,5% nos espanhóis. Já em relação às populações etíope e camaronesa, os números evidenciaram: 27,8% e 43,8%, respeitando a devida ordem. O alelo *GSTT1*0*, por sua vez, surge com maior incidência entre os povos africanos, sendo 46,8% em Camarões e, 37,3% na Etiópia. Esses números, quando comparados aos países europeus, apresentam: 28,3% para italianos e, 27,7% para espanhóis.

Uma pesquisa feita por Mansour *et al* (2015), em Turabah, Arábia Saudita, buscou identificar a presença de *GSTM1* e *GSTT1* em 164 indivíduos saudáveis com faixa etária entre

30 e 60 anos. Os valores obtidos foram: os 56,1% e 20,7% para *GSTM1*0* e *GSTT1*0*, respectivamente. Os autores ainda trazem uma comparação entre seus resultados e aqueles encontrados por Salem *et al* (2011), quando da pesquisa em populações de Bahrein, Líbano e Tunísia. Nesta ordem, o *GSTM1*0* teve, para cada país, as seguintes frequências: 49,7%, 52,5% e 52,5%. Já o *GSTT1*0*, na população libanesa, foi de 37,6%; 28,7% em Bahrein e 37,1% para os tunisianos.

Mansour *et al* (2015), concluiu que *GSTM1*0* apresentou frequência próxima à relatada em Bahrein, Líbano e Tunísia, enquanto *GSTT1*0* quando comparado aos dados encontrados no Líbano e Tunísia, mostrou significância estatística menor ($p= 0,0001$) para ambos os países.

Kassogue e colaboradores (2020), fizeram um estudo com 206 indivíduos saudáveis de Malian, com o objetivo de analisar a frequência genotípica e alélica de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*, nunca referida para esta população. A média de idade dos participantes da pesquisa ficou entre 30 e 65 anos, com variação estabelecida de 18 a 73 anos. Os resultados encontrados foram: *GSTM1*0* 24,3% e *GSTT1*0* 41,3%. Quando associados os genótipos nulos, o resultado apresentou 11,2%.

1.1.3 Associação de *GSTM1*0* e *GSTT1*0* com doenças humanas

Parte dos estudos sobre *GSTM1*0* e *GSTT1*0* foram realizados com base no contexto de associação junto a diferentes doenças e, somado a isso, tópicos pertinentes a fatores de risco tais como: desordens cardíacas, retinopatia diabética, catarata, infertilidade masculina, perda auditiva induzida por ruído, glaucoma primário de ângulo aberto, asma (Sireesha *et al.*, 2012; Salehi *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013). Os genótipos nulos de *GSTM1* estão associados à lesões cardíacas devido o estresse oxidativo, no qual as GST's desempenham função de eliminação de espécies reativas de oxigênio (SINGH, M. M. *et al.*, 2019).

O glaucoma primário de ângulo aberto é um dos tipos mais comuns, da doença, diagnosticados em todo o mundo. Apresenta múltiplos fatores causais como: danos mecânicos acarretados por alterações da pressão intraocular, bem como, efeitos tóxicos e estresse oxidativo, por sua vez, ocasionados a partir do surgimento de moléculas reativas de oxigênio (ASLAN *et al.*, 2008). As GST's apresentam importante papel no processo de metabolização de produtos reativos endógenos que são tóxicos para o organismo (HAYES *et al.*, 2005).

Um estudo de metanálise feito por Huang *et al* (2013), a partir dos principais bancos de dados existentes (PubMed, EMBASE, Web of Science e CBM databases), buscou esclarecer a relação entre os efeitos de *GSTM1*0*, *GSTT1*0* e o glaucoma primário de ângulo aberto, considerando pesquisas que atendiam os critérios de elegibilidade estabelecidos pelos autores, a saber: estudos de delineamento do tipo caso-controle .

Ainda sobre a metanálise de Huang e colaboradores (2013) 11 estudos do polimorfismo de *GSTM1*, constando neles o número de 1.339 casos e 1.412 controles. Além disso, 7 outros estudos de *GSTT1*0*, apresentaram um total de 958 casos e 1.003 controles. Das pesquisas selecionadas que tratavam de *GSTM1*0*, 5 delas direcionavam-se à populações caucasianas, 2 à cidadãos asiáticos e, em 4 delas, as populações contempladas eram mistas.

Neste caso, os dados mostraram significância estatística para pesquisas com *GSTM1*0* somente em asiáticos com *OR* de 1,61. Para as populações caucasianas e mistas os autores afirmaram não haver significância. Já em relação às populações cujos estudos atentaram para o *GSTT1*0*, temos: três investigações sobre caucasianos; outras três referiram-se à populações mistas e, apenas uma foi realizada em asiáticos. Vale salientar, ainda, duas importantes informações a respeito desses estudos: a primeira é que nenhum deles demonstrou associação entre o genótipo e o glaucoma primário de ângulo aberto; a outra, mostra que ao combinar *GSTM1*0* e *GSTT1*0* ocorreu significância estatística com *OR* de 1,90 (*OR* = 1,90; 95% CI, 1,15–3,13; *P* = 0,013) em comparação aos genótipos presentes (HUANG *et al.*, 2013).

Quando elaboraram uma metanálise de cinco estudos, com 3.583 indivíduos, a respeito da associação de *GSTM1*0* e *GSTT1*0* à retinopatia diabética, Sun, Zhang e Xiong, em 2015, concluíram que havia uma margem de risco aumentado, entre 1,69 e 1,59, de pacientes com os genótipos informados, desenvolverem a doença. A retinopatia diabética é causada por injúrias na microvasculatura da retina. Pacientes diabéticos correm alto risco de desenvolver retinopatias. Ao elencar causas para ambas as doenças retinopatias e diabetes o estresse oxidativo é apontado como um dos possíveis agentes causadores. Estes são complexos mecanismos que envolvem danos causados por reativos de oxigênio, que por sua vez, são conjugados à glutathione e, por conseguinte, inativados quando não metabolizados pela ausência enzimática de algumas desta isoformas, podendo, dessa maneira, modular o risco de retinopatia diabética (BROWNLLE *et al.*, 2005; KUMARI *et al.*, 2008; DATTA *et al.*, 2010). Todos os estudos foram realizados em populações de origem caucasiana e publicados entre os anos de 2005 e 2014. Os bancos de dados utilizados foram: PubMed, Embase e Wangfang Medicine.

Em sua publicação Nair *et al* (2013), realizaram simultaneamente uma metanálise e um estudo caso-controle na Índia, onde buscou associação entre *GSTM1*0* e *GSTT1*0* a situações de aborto, que envolviam tanto os casos de aborto espontâneo, antes de 12 semanas denominados de EPL, quanto aqueles casos pertinentes ao aborto recorrente, definido como 3 ou mais EPL consecutivos citados no estudo como RPL. Postula-se que *GSTM1*0* e *GSTT1*0* leva ao aumento do estresse oxidativo gerado na placenta que pode ocasionar ou não a rejeição do embrião. Referente ao estudo caso-controle, contou com 174 pacientes que tiveram perda precoce da gravidez, das quais 130 tiveram perdas recorrentes e 180 indivíduos que compuseram o grupo controle.

Não houve relevância estatística apontada no estudo caso-controle para *GSTM1*0*. Já, no que diz respeito ao *GSTT1*0*, os seguintes resultados foram obtidos: EPL com valores de OR 4,47 e $P = 0,004$, bem como e RPL com valores de OR 4,39 e $P = 0,006$, apareceram portanto, associados ao aumento do risco de ambos os casos de aborto. A frequência de *GSTT1*0* marcou o total de 10,92% em EPL e, em RPL, 10,77%. Nos controles, a frequência de *GSTT1*0*, aparece com 2,78%, e para *GSTM1*0* os controles tiveram frequência de 28,89%, quando associados *GSTM1*0* e *GSTT1*0* mostraram risco aumentado de 4,74 vezes e 5,76 vezes para EPL e RPL, respectivamente.

A metanálise de Nair *et al* (2013), baseou-se em oito estudos considerados elegíveis, apresentando o seguinte panorama em relação às populações observadas: duas de origem japonesa, uma nova-iorquina, uma holandesa, uma da Carolina do Norte, uma do norte da Índia, e uma outra do sul da Índia e, por último, uma da Itália. Nesse sentido, obteve-se a soma de: 1.071 casos e 1.205 controles. Ao investigar associações entre *GSTM1*0* e *GSTT1*0* à RPL, de acordo com as análises realizadas, houve um risco aumentado, quando combinados os genótipos ausentes. Quando analisados isoladamente, no que diz respeito à RPL, *GSTM1*0* mostrou significância estatística, já *GSTT1*0* não foi associado em análise geral, exceto na população indiana após a verificação por subgrupos. (NAIR; KHANNA; SINGH, K., 2013).

1.1.4 *GSTM1*0*, *GSTT1*0* e associação ao Câncer

O gene *GSTM1* é responsável pela codificação da enzima GSTM1, conforme citado anteriormente. Tal enzima é capaz de proteger o DNA celular contra moléculas nocivas, é sintetizada em órgãos como: fígado, rins, pulmão, intestino e baço (YU *et al.*, 2011). Associações entre *GSTM1*0* e câncer foram supostas por McWilliams *et al*, (1995). Em seu

estudo, McWilliams *et al.*, (1995) foram analisados 11 caso-controles pertinentes à literatura inglesa. Juntos, somaram um total de 1.593 casos de portadores de câncer de pulmão e 2.135 controles saudáveis, ambos realizados em indivíduos cujas origens são: caucasiana e japonesa. Segundo os autores, havia risco moderado para o desenvolvimento de câncer de pulmão nos sujeitos com os genótipos nulos de *OR* de 1,41e $p < 0.0001$, estimando, ainda, que 17% dos casos de câncer de pulmão podem ser associados à deficiência da enzima GSTM1.

Huang *et al* (2006) desenvolveram um estudo caso-controle no estado da Carolina do Norte, localizado na região sudeste dos Estados Unidos, que incluiu uma amostra de 554 indivíduos no grupo casos e 874 no grupo controle, nos quais observou que as alterações polimórficas de *GSTM1*0* e *GSTT1*0* ligadas à base populacional de afro-americanos e brancos, autorreferidas, bem como a relação entre o câncer de cólon e outras variáveis como, por exemplo, o tabagismo, resultaram no risco aumentado em 1,43 vezes mais chances de desenvolver tumor para o *GSTM1*0* quando comparados ao grupo controle. Foi observado que em indivíduos negros, o risco de aumento marcou 1,19 vezes mais chances de desenvolver câncer de cólon quando comparados à população de brancos e ao grupo controle. Em relação ao *GSTT1*0*, houve uma inversão associada ao risco para ambos os grupos populacionais estudados.

No Brasil, são poucos os estudos que investigam os polimorfismos nulos em bases populacionais genéticas, ou mesmo autorreferidas, por se tratar de um país de elevada heterogeneidade étnica sendo composta por: indígenas, imigrantes europeus, africanos e também asiáticos (ALVES, A. A. *et al.*, 2019; Gattás e Soares-Vieira 2000; GUEMBAROVSKI; DE SYLLOS CÓLUS, 2001; HATAGIMA *et al.*, 2004; HIRAGI *et al.*, 2007; MAGNO *et al.*, 2009), o que dificulta a identificação genotípica da população para os genes nulos *GST*.

Rodrigues-Flemengs *et al* (2018), fizeram uma pesquisa do tipo “caso controle”, a fim de analisar tanto a associação de *GSTM1*0* e *GSTT1*0* ao risco de câncer colorretal esporádico, como também a progressão da malignidade e sobrevida dos pacientes, ali, mobilizados. O estudo foi composto por 970 participantes da população brasileira mista, moradores do estado de São Paulo. Dentro desse primeiro grande número, 232 pacientes apresentavam diagnóstico de câncer colorretal, e os demais 738 participantes eram saudáveis e fizeram parte do grupo “controle”.

De acordo com os autores, o *GSTM1*0* foi associado ao risco de desenvolvimento do câncer (*OR* de 1,45; IC 95%: 1,06-2,00; $P = 0,022$) e, quando isolados, os valores de *GSTT1*0* foram reduzido para o grupo de casos. Além disso, combinados *GSTM1*0* e

GSTT1, apresentava-se uma significância estatística de 1,50 vezes o aumento do risco. Ainda sobre a pesquisa, aparecem as combinações de *GSTT1* e *GSTM1*0*, e mais, um terceiro polimorfismo estudado: o *GSTP1 Val** que resultou em 1,85 no aumento de risco para a doença.

1.2 Ancestralidade e Polimorfismos de Nucleotídeo Simples (SNP)

O estudo das diversas populações humanas e seus movimentos migratórios têm sido um constante desafio para a ciência, e alvo de estudos de diversas áreas do conhecimento, a saber: arqueologia, história e genética (BAMSHAD *et al.*, 2004). A genética tem demonstrado interesse e analisado como processos de evolução e variações no material genético influenciam nas populações modernas. Estudos têm elucidado melhor os processos de miscigenação, através das técnicas de sequenciamento de genomas e exomas completos e como consequência, análises de ancestralidade com maior riqueza de detalhes (BONILLA *et al.*, 2004).

Com base em marcadores moleculares distintos é possível inferir a história de uma população. Estudos clássicos de matrilinearidade, se dão por meio de haplogrupos e haplótipos de DNA mitocondrial, já as pesquisas que se debruçam sobre questões de patrilinearidade, levam em conta as genotipagens de marcadores na região não recombinante do cromossomo Y. Estes marcadores uniparentais como o cromossomo Y, bem como o DNA da mitocôndria, são importantes para determinar a história genética paterna ou materna das populações, mas não são eficientes em estimar a ancestralidade individual. Recentemente, através de novas metodologias de determinação de genótipos em SNPs autossômicos, utilizando arrays e sequenciamento de nova geração, é possível, portanto, obter informações de regiões gênicas e extragênicas (CONSORTIUM; THE INTERNATIONAL HAPMAP 3 CONSORTIUM, 2010).

As mutações dão origem às variações genéticas, podendo ser em larga escala, a exemplo das trissomias e monossomias, assim como também é o caso das duplicações de milhares de pares de base e extensas deleções. As variações mais simples que compreendem polimorfismos de base única SNPs (*single nucleotide polymorphism*), são substituições de nucleotídeos. Permitem análise da ancestralidade dos indivíduos, inferindo as parcelas das contribuições diversas a partir dos blocos ancestrais (HENN *et al.*, 2010; NIEVERGELT; LIBIGER; SCHORK, 2005).

1.2.1 Diversidade da espécie humana

A origem do *Homo sapiens* moderno, mais aceita data de 300 a 200 anos atrás, considerando uma população situada no leste africano, ou por novas postulações, no Sul da África (HENN *et al.*, 2011). Há cerca de 100 mil anos deu-se início ao processo migratório que colonizou todo o globo terrestre o modelo *Out of Africa* que gerou consequências na diversidade genética da espécie atual (STONEKING, 2008; ZHIVOTOVSKY; ROSENBERG, Noah A.; FELDMAN, Marcus W., 2003).

De acordo com análises de genética populacional, as variações humanas estão correlacionadas a aspectos geográficos, visto que, a heterozigosidade diminui conforme afastamento da África, e em contrapartida, o desequilíbrio de ligação aumenta conforme se distancia da África. Por último, também diminui a frequência de alelos ancestrais conforme distanciamento africano, sendo os alelos derivados mais comuns conforme mais afastado do referido continente (DEGIORGIO; JAKOBSSON; ROSENBERG, N. A., 2009; LI *et al.*, 2008).

1.2.2 Povoamento do Brasil

Cerca de 12 mil anos antes da chegada dos primeiros europeus no Brasil, a América do Sul já era povoada, tendo inúmeras lacunas na exatidão do tempo em que o primeiro homem entrou nas Américas, havendo, aproximadamente 2,5 milhões de nativos americanos, em sua grande maioria de tronco tupi. Essas pessoas viviam em diversas aldeias cujo o número de habitantes variava entre 300 e 2000 indivíduos (RIBEIRO, 1995). Dois grandes grupos indígenas ocupavam uma vasta região: os Tupi (Guarani) e os Macro-Jê (Kaingang e Xokleng).

Os guaranis dominavam extensas florestas que, hoje, correspondem aos territórios dos estados do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina, do Paraná e de Misiones, na Argentina. Além disso, os povos guaranis também ocupavam florestas tropicais em: São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraguai e Bolívia (NOELLI, 2003; OLIVEIRA SCHIAVETTO, DE, 2003). Já outros povos guaranis como os Nandeva, Kaiowá e M'Byá, viviam na região central do país (OLIVEIRA SCHIAVETTO, DE, 2003). A queda drástica do número de indígenas se deu por conta de conflitos travados com portugueses e, ainda, pela disseminação de doenças infecciosas como: sarampo, peste bubônica, gripe, entre outras, até então, desconhecidas pelos nativos americanos (OLIVEIRA SCHIAVETTO, DE, 2003).

Com a chegada dos europeus no Brasil, houve a entrada de aproximadamente 500 mil homens portugueses. Somente nos primeiros dois séculos de colonização, desembarcavam cerca de 500 imigrantes, anualmente. Na primeira metade do século XX, a maior entrada de colonizadores ocorreu entre 1901 e 1930, chegando a somar mais de 25 mil pessoas a cada ano (IBGE, 2007; PENA et al., 2000).

A entrada dos africanos no país, trazidos na condição de pessoas escravizadas para trabalhar, inicialmente, nas lavouras, em seguida nas minas de ouro e diamantes, além das plantações de café, ocorreu entre 1502 e 1860. Estima-se que mais de 9,5 milhões de indivíduos, correspondendo a 38% de todos os transportados para as Américas, vieram para o Brasil, destinadas a Salvador, Recife e Rio de Janeiro (ALVES-SILVA *et al.*, 2000; AFSHARI; BHOPAL, 2010).

Os três grupos mencionados anteriormente (europeus, africanos, indígenas), deram origem à população brasileira, que é, portanto, considerada triíbrida. A partir do século XIX, os portos foram abertos aos países aliados, o que favoreceu a entrada de outros povos. Entre os anos de 1872 e 1975, aproximadamente, 5,5 milhões de imigrantes desembarcaram, no país, vindos de países europeus. Predominavam nesta entrada pessoas vindas da Itália, da Alemanha e da Espanha.

Importante pontuar que, também desembarcaram no Brasil, além de africanos e europeus, indivíduos de origem asiática, como é o caso dos japoneses, além de libaneses, sírios entre outros. Pode-se considerar que no Brasil houve um ponto de encontro entre os povos ameríndios, europeus, africanos e asiáticos (PENA, S. D. J. *et al.*, 2009; SALZANO; BORTOLINI, 2001).

Como resultado dos diversos movimentos de migração, o processo de miscigenação ocorreu de diferentes formas, dadas as singularidades de cada região do país. Aspectos geográficos, políticos, históricos e socioculturais implicaram na distribuição, totalmente irregular, dos grupos básicos de formação da população brasileira espalhados nos territórios do Brasil. Estudos com marcadores genéticos de informação evidenciam discretas, mas importantes diferenças no que tange à origem genética da população (CALLEGARI-JACQUES *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2008).

1.2.3 Povoamento do Sertão Paraibano

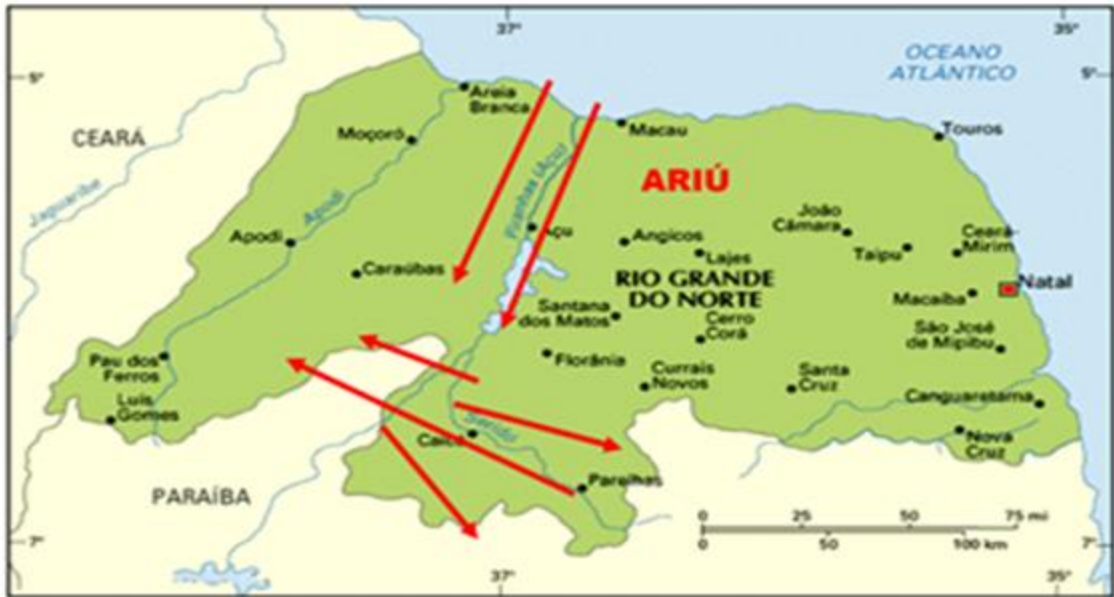
Estima-se, de acordo com dados arqueológicos, que, no mínimo, há 200.00 a 290.00 mil anos AP ameríndios vem ocupando as terras que correspondem, hoje, aos estados do

nordeste brasileiro. Sítios arqueológicos como o da Pedra do Alexandre, localizado no município de Carnaúba dos Dantas, semiárido do estado Rio Grande do Norte, compõem importantes achados (BUENO; DIAS; STEELE, 2013; MARTIN, 1993). Os povos indígenas que viviam na região do litoral e sertão nordestino, dividem-se em dois grandes grupos de acordo com seu tronco linguístico, são eles: os Tupis e os não tupis. Estes últimos possuíam língua própria, específica, e também ficaram conhecidos como Cariris. Os outros, que também possuíam sua língua, falavam todos em tupi. Concentravam-se na parte mais litorânea do território (PUNTONI, P, 1997; MUTZENBERG; SILVA MUTZENBERG, DA; MATOS, DE, 2015).

Sobre o povoamento do Nordeste, a região dos sertões é formada pelo bioma caatinga que recobre mais de 900 mil quilômetros quadrados, 11% de todo o território brasileiro, e, se estende da Região Nordeste até o norte de Minas Gerais. Com o fim do período de chuvas, a água torna-se escassa, a vegetação seca e adquire aparência acinzentada. Com exceção de pouquíssimas plantas que perduram sua coloração verde, a terra fissa e a água dos reservatórios evapora-se (BRASIL *et al.*, 2017; FILHO *et al.*, 2017). Os nativos americanos apropriaram-se, inclusive, do uso das diversas espécies de plantas, utilizadas como alimento, enquanto buscavam de manter distância daquelas que não lhes traziam benefícios, conforme é verificado nos estudos arqueológicos da Serra da Capivara (SANTOS., 2009).

O povo Ariú, também chamado de *Pega, Ariá, Ária, Areias e Uriú*, pertencentes aos Tapuias, localizavam-se entre o Vale do Açu e o Seridó, no estado do Rio Grande do Norte, sempre às margens do rio Piranhas e Assu. Os Ariús adentravam também à Paraíba, na Serra de João do Vale, deslocando-se desde Pombal à Catolé do Rocha, além de Brejo dos Santos, conforme figura 4.

Figura 4: Área geográfica onde há presença da tribo dos Ariú no Rio Grande do Norte.



Fonte: Santos., 2008.

De acordo com Santos (2009), desde o início da colonização, os portugueses adentraram a caatinga com o regime de sesmarias. Houve a criação das capitanias e, por conseguinte, o surgimento de latifundiários que perduraram nestas terras por muito tempo. Apesar dos canaviais superabundantes que se espalhavam pelo litoral, os portugueses tomaram a caatinga dos não Tupis, dizimando os povos, ali, existentes com o objetivo de criar de gado, fomentar culturas de exportação, bens de subsistência, alterando consideravelmente o bioma, através de queimadas e implantação de novas espécies da flora que favorecem pastagens como, por exemplo, a algaroba.

A interiorização da Paraíba se deu de duas formas: uma rota seguia pelo litoral - via agreste - e a outra pelo sertão, através do curso dos rios. O sertão da Paraíba é uma extensa área. Ela ocupa as mesorregiões do Agreste, Borborema e Sertão, localizando-se dentro do polígono das secas, conforme ilustração da Figura 5.

Figura 5: Divisão política. Mesorregiões da Mata, Agreste, Borborema e Sertão -sentido Leste/Oeste.



Fonte: Santos., 2008.

1.2.4 Município de Brejo dos Santos – PB

O Município de Brejo dos Santos está localizado no Estado da Paraíba, na região geográfica imediata à Catolé do Rocha-São Bento e mesorregião do sertão paraibano. Possui população de 6.449 habitantes, de acordo com o último censo (IBGE, 2010). A colonização de Brejo dos Santos, se deu juntamente a colonização iniciada no município vizinho de Catolé do Rocha, no ano de 1774, através do tenente-coronel Francisco da Rocha Oliveira. Os primeiros moradores de Brejo dos Santos, foram os irmãos Antônio e José Paixão. Ali, iniciaram a produção de agricultura e a criação de gado. Suas terras, vermelhas e férteis, atraíram novos habitantes e, às margens do Rio Sabão as primeiras casas de Taipa foram construídas (IBGE, 2010). A emancipação política do município aconteceu em 1965.

1.2.5 Possibilidades de estudos em populações triíbridas

Tendo em vista a determinação da formação triíbrida da população brasileira e, de maneira mais específica, populações do Nordeste do Brasil, é possível alavancar possibilidades e, ainda, vantagens de estudos de ancestralidade nestas populações. Para GUEMBAROVSKI; DE SYLLOS CÓLUS (2001), a elaboração de estudos de frequência de $GSTM1^{*0}$ e $GSTT1^{*0}$, em populações mistas, possibilita uma descrição melhor detalhada desta distribuição, já que ocorrem variações de acordo com a base populacional. A inferência

da ancestralidade de polimorfismos em populações miscigenadas, susceptíveis à doenças como câncer, podem esclarecer, de modo mais satisfatório, as principais diferenças genéticas entre populações, uma vez que já é determinada preponderantes variações entre as populações de todo o mundo, atribuídas também ao meio externo (OAK *et al.*, 2020).

Poucos estudos inferiram marcadores de ancestralidade, o que tornaria mais assertiva a origem da população (SUAREZ-KURTZ *et al.*, 2007), servindo como melhor modelo para estudos de delineamento caso-controle, considerando a diminuição de vieses relacionados a estilo de vida e autorreferência étnica. Nesse sentido, seria possível fornecer dados mais precisos em relação à comparação com outras populações como na grande maioria dos estudos, exceto relatados auto-inferência da cor da pele ou categorização por grupos étnicos (HATAGIMA *et al.*, 2004; HIRAGI *et al.*, 2007; MAGNO *et al.*, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, observa-se um crescimento significativo e rápido da população idosa, acima de 80 anos, no Brasil e no mundo. Estima-se que ao final de 2020 esse grupo some mais de 4.400.000 mil indivíduos. Pensando mais a frente, no ano de 2043, tal população corresponderá a cerca de 1/4 de toda população brasileira. Portanto, esta parcela da população configura-se como modelo de longevidade interessante aos estudo da inferência da ancestralidade e determinação da ausência ou presença dos polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1*, visto que podem levar a uma maior susceptibilidade de doenças como cânceres, além de representarem possíveis fatores protetivos à diversas doenças (NOLEN *et al.*, 2017; BITAFAN *et al.*, 2017; GORBHEL *et al.*, 2017).

A população brasileira caracteriza-se por um alto grau de miscigenação, tendo como base para sua composição genética contribuições de diferentes populações ameríndias, europeias e africanas. Estas composições variam entre as regiões do país, e, portanto, se faz necessário um estudo de ancestralidade genética capaz de inferir, com maior precisão, a origem da população e, por conseguinte, sua susceptibilidade ou não ao acometimento de doenças (MYCHALECKYJ *et al.*, 2017; ALVES SILVA *et al.*, 2000).

A presente pesquisa teve como principal objetivo a determinação da frequência dos alelos nulos *GSTM1*0* e *GSTT1*0*, fazendo correlação com inferências da ancestralidade em uma população de longevos do Nordeste do Brasil. Além disso, foi observado se os haplótipos ancestrais variaram de acordo com estes genes. Poucos trabalhos realizados no Brasil tiveram este enfoque (SUAREZ-KURTZ *et al.*, 2007), portanto, esta pesquisa tem um caráter pioneiro naquilo que diz respeito tanto ao estudo da ancestralidade quanto à região delimitada para tal pesquisa.

A população escolhida/selecionada apresenta alto coeficiente de endogamia, devido a elevados índices de casamentos consanguíneos (WELLER *et al.*, 2012) e possui grande parte de sua população composta por idosos. Os dados de ancestralidade e determinação das frequências dos polimorfismos de GST's abrem possibilidades de estudos de coortes ou caso-controles, o que permite, também, comparar os resultados encontrados na presente pesquisa com outras populações.

3OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Associar a ancestralidade Nativa Americana, Africana e Europeia com a frequência de *GSTM1*0* e *GSTT1*0* dos alelos de *GSTM1* e *GSTT1*, numa população de longevos do interior da Paraíba.

3.2 Objetivos específico

- Inferir a ancestralidade de *GSTM1* e *GSTT1* dos indivíduos longevos.
- Determinar a presença de *GSTM1*0* e *GSTT1*0* e dos alelos de *GSTM1* e *GSTT1*.
- Averiguar se a frequência de alelos nulos variam entre *GSTM1* e *GSTT1* na população em estudo.
- Associar as frequências dos alelos nulos e dos alelos a com ancestralidade ameríndia, europeia e africana.
- Investigar se a frequência entre *GSTM1* e *GSTT1* varia em relação a origem ancestral.
- Realizar uma revisão da literatura e comparar a frequência dos alelos nulos identificados com daquela de outras populações do mundo.

4 MÉTODOS

4.1 Local e sujeitos da pesquisa

Este estudo foi realizado com 73 indivíduos, sendo 35 homens e 38 mulheres longevos (de 80 a 103 anos), oriundos da cidade de Brejo dos Santos, Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, residentes tanto em zonas rurais quanto urbanas. O período de coleta foi de 2014 a 2015. A amostra foi de 72 indivíduos longevos. Todos fazem parte do Projeto SABE Nordeste (Saúde, Bem estar e Envelhecimento), que busca analisar a qualidade de vida e o envelhecimento de idosos, inicialmente, em diferentes centros urbanos e estendeu-se para o interior do Nordeste. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e as informações foram obtidas por meio de um questionário padronizado, incluindo dados sobre hábitos sociais e problemas de saúde. O município de Brejo dos Santos, localizada no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Brejo dos Santos é uma comunidade com 6449 habitantes (IBGE, 2010), localizada no interior a cerca de 360 km, respectivamente, a 404 km de Natal e João Pessoa, as capitais dos estados da Paraíba e do Rio Grande do Norte, ambas localizadas na costa atlântica. Conforme relatado em um estudo anterior, na comunidade Brejo dos Santos 171 (19,48%) dos 878 casais tinham antecedentes consanguíneos e o coeficiente de endogamia era 0,00504 (WELLER et al., 2012).

4.2 Extração e genotipagem do DNA

A extração do DNA com fenol-clorofórmio foi baseada em amostras de sangue de 5 ml de cada indivíduo. A quantidade e a qualidade do DNA foram verificadas por eletroforese em gel e pelo espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific, Massachusetts , EUA). A matriz LAT 1 Axiom® para todo o genoma (Affymetrix , EUA) foi usada para genotipagem de todos os 72 indivíduos, seguindo as instruções do fabricante. A matriz abrange 800.000 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs).

Com base nos arquivos t (. Cel e. Arr) obtidos dos microarranjos de cada um dos 73 indivíduos do Brejo dos Santos, a análise dos SNPs foi realizada com o software *Genotyping Console*TM (Versão 4.2; Affymetrix Inc.). Os seguintes filtros foram utilizados para controle de qualidade: DQC (Controle de qualidade da antena) $\geq 0,82$, QC (Controle de qualidade) taxa de chamada ≥ 92 , Taxa média de chamada para passagem ≥ 97 e Menor alelo cortado ≥ 2 .

Para os genes, foi aplicada uma taxa de chamada SNP > 97% e um equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de $p > 0,05$.

Após a extração do DNA a presença dos polimorfismos nulos de GSTM1 e GSTT1 foram identificados por meio da amplificação do DNA genômico através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Multiplex, utilizando primers de iniciadores com sequência específica (Quadro 3). O ensaio inclui 3 pares de primers, sendo 2 pares referentes ao gene GSTM1 com 215 pb e GSTT1 de 480 pb e o terceiro como controle positivo Beta-globina de 268 pb. A seguinte mistura foi elaborada com o kit Taq Platinum Invitrogen (Canadá), buffer 10x 5µl, 10 dNTPs 5µl, Primer iniciador e reverso com concentração de 10µM, 2.0µl de cada, a quantidade de enzima Taq DNA Polymerase foi de 0,5µl com concentração de 5 units/µl e por fim, 1µl de DNA molde. Conforme indicado por Bertollo e companheiros.

Quadro 2: Primers utilizados no ensaio.

GSTM1	5'-TTCCTTACTGGTCCTC TC-3'	5'-TCACCGGATCATGGA-3'
GSTT1	5'-GAACTCCCTGAAAAGCC-3'	5'-GTT GGGCTC AAA TAT ACG GTG G-3
B - Globin	5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3	5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'

4.3 Técnica de eletroforese em gel

A eletroforese em gel de agarose, é um método que permite a separação de moléculas de DNA, as moléculas são separadas através da migração de partículas no gel, onde o peso molecular, previamente estabelecido é comparado com um marcador, isto é possível com a aplicação de um potencial elétrico. A velocidade de migração está diretamente ligada a massa da molécula. Para que o resultado possa ser analisado, após a corrida em gel, as amostras deverão ser levadas a um equipamento adequado que devido a adição de corante fluorescente (brometo de etídio ou sybr®), que se intercala entre as bases do DNA, e o uso de radiação ultravioleta permitirá a visualização e avaliação dos resultados (AZEVEDO, et al.2003). Para

o estudo, a PCR foi-se carregada em gel de agarose a 2.0% e a eletroforese em gel foi realizada a 90 Volts durante 60 a 90 minutos.

5 RESULTADOS

Artigo a ser submetido à revista: Cancer Epidemiology

Ancestry and frequency of Glutathione S-transferase M1 and T1 null alleles in A trihybrid population of Northeast Brazil.

Sônia Carmem Morais Leite, Mathias Weller.

Abstract

Background: The *GSTM1* and *GSTT1* genes play a key role in the detoxification of toxic compounds. Both genes show deletion polymorphisms (null genotype) with variable frequencies in different human populations. The present study addressed on ancestry of the null genotype in an admixed Brazilian population.

Methods: Microarray derived SNPs were applied to determine the gene- bank data based Native American, African and European ancestry of *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes, respectively alleles, among 72 individuals. Results were compared with established data of literature about null genotype frequencies in different populations.

Results: Of the 52 null genotypes of the *GSTM1* gene, 2 (3.9%) had Native American 7 (13.4%) had African and 43 (82.7%) European ancestry. Of the 12 null genotypes of the *GSTT1* gene, one (8.3%) had African eight (66.7%) had European and three (25.0%) had Native American ancestry. The frequency of the null genotype of the *GSTM1* gene was 22.2%, 28.0% and 39.1% for Native American, African and European ancestry. The frequency of the null genotype of the *GSTT1* gene was 23.1%, 3.6% and 7.8% for Native American, African and European ancestry. African, Native American and European ancestry were not significant differentially associated with null genotypes of *GSTM1*, respectively *GSTT1* ($p= 0.389$; $p= 0.102$).

Conclusions: In agreement with most previous studies the null genotype of the *GSTM1* gene was more frequent compared to that one of the *GSTT1* gene. The null genotype of both genes was not significant differentially associated with one of the three ancestries among individuals of the population. Similar to most previous studies, null genotypes were stronger associated with European ancestry, compared to African ancestry.

Introduction

Glutathione S- transferases (GSTs) are phase II detoxification enzymes that play a key role in the detoxification of toxic, potentially carcinogenic compounds [1,2], [3]. The GST's comprise at least 8 classes of isoenzymes in humans and each class is encoded by an independent gene or family of genes: The cytosolic alpha (α), mu (μ), omega (Ω), pi (π), sigma (σ), theta (θ), and zeta (ζ) class and the mitochondrial kappa (κ) class [1,4,5]. The mu (μ) and theta (θ) class consist of five and two genes that are localized on chromosomes 1p13.3 and 22q11.23 [5].

The *GSTM1* gene of the mu (μ) class and the *GSTT1* gene of the theta (θ) class are of special interest, because both show deletion polymorphisms, resulting in a null genotype (*GSTM1*0* and *GSTT1*0*), which cause the absence of expression and loss of enzyme activity [6–8]. There exist an overwhelming number of case-control studies and meta- analysis, showing that *GSTM1*0* and *GSTT1*0* increase risk of different types of cancer [5,9]. Recent meta- analysis of breast, bladder and prostate cancer risk indicated that single effects of *GSTM1*0* and *GSTT1*0* and also combined effects of double null genotypes are important for development of disease [2,10,11]. Furthermore the effects of *GSTM1*0* and *GSTT1*0* depend on the population of the study: Increased risk of breast cancer was in all populations associated with *GSTM1*0*, whereas the combined effect of the double null genotype increased the risk of breast cancer among postmenopausal, respectively, women of European origin [11]. In the case of bladder cancer, *GSTM1*0* was associated with increased risk in European and Asians, while *GSTT1*0* was associated with increased risk of European [10]. The double-null genotype in contrast, was associated with increased risk of bladder cancer in European, Asians, and Africans [10]. Similar, in a recent meta- analysis the double- null genotype increased risk of esophageal carcinoma in many different populations, but the increase was more pronounced in studies of East Asian populations [11].

Despite these population- specific differences there exist only very few studies that associated the frequencies of *GSTM1*0* and *GSTT1*0* directly with ancestry markers of single individuals [12]. Individuals of a single admixed population that live in comparable socio-economic conditions can have similar risk factors of cancer. Therefore, studies that associate ancestry and frequencies of null genotypes could help not only to explain differences of cancer incidence, prognosis and therapeutic responses among populations, but also to differentiate more efficient between true biological and life style related effects that can obscure results of comparison among distinct populations.

The populations of Brazil are characterized by a genetic background of African, Native Amerindian and European ancestry with a high degree of admixture [13,14]. The genetic contribution of each of these three groups varies in different regions of Brazil and additional to their European and Native American ancestry, the population of the Northeast region is considered to have the highest degree of African ancestry among all Brazilian populations [15,16]. In the present study we assessed on the question of *GSTM1**0 and *GSTT1**0 frequencies and their associations with African, Native American and European ancestry in an admixed population of the Brazilian Northeast region. Microarray derived SNPs were applied to determine Native American, African and European haplotype ancestry of *GSTM1* and *GSTT1* genes, respectively corresponding null genotypes.

Methods

Study population

The sample consisted of 72 unrelated individuals, who 35 were men and 38 women aged between 80 and 102 years. No one of these individuals had a diagnosis of cancer, during or before sampling collection. The elderly sampling was part of the longitudinal cohort study "Health, Wellbeing and Aging ("SABE project") [17],[18]; which began in 2000 in São Paulo [19], and was extended as a census-based research for the elderly aged more than 60 from consanguineous communities in Northeast Brazil backlands. Nowadays, the SABE - São Paulo cohort presents exomic variants of 609 elderly Brazilians available in ABraOM (Online Archive of Brazilian Mutations), a public variant repository [20]

The samples were collected in the municipality of Brejo dos Santos in backlands of the state of Paraíba, Brazil. The Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE)[21] estimated its population at 6198 inhabitants, 876 were aged 60 or over (415 males and 461 females). Our sample represents ~10% of the total elderly individuals aged 60 or over living in Brejo dos Santos. The small community is localized about 360km of Natal and 404km of João Pessoa, far away from the capitals of the respective states Paraíba and Rio Grande do Norte, both situated at the Atlantic coast. As reported in a previous study, in the community Brejo dos Santos 171 (19.48%) out of 878 unions had a consanguineous background and the coefficient of endogamy was 0.00504 [22].

All participating individuals have given written consent to the study. The protocol of data sampling and the consent procedure was reviewed and approved by the National Committee for Ethics in Research [23] and is registered under the protocol number 0359.0.133.000-11.

DNA extraction and genotyping

The extraction of DNA was based on 5ml peripheral blood samples from each individual using phenol-chloroform method. Quantity and quality of DNA were checked by gel electrophoresis and the spectrophotometer Nanodrop ND-1000 (*Thermo Scientific, Massachusetts, EUA*). The *Axiom® Genome-Wide LAT 1 Array* (*Affymetrix, USA*) was used for genotyping of all 73 longevous individuals, following the manufacturer's instructions. The array presents 813,551 single nucleotide polymorphisms (SNPs).

Before the analysis, the raw archives of the 72 genotyped individuals were downloaded from Thermo Fisher cloud. The identification of SNPs was performed with the software *Genotyping Console™* (Version 4.2; Affymetrix Inc.). Following filters were used for quality control: DQC (dish quality control) ≥ 0.82 , QC (quality control) call rate ≥ 92 , Average call rate for passing ≥ 97 and minor allele cut off ≥ 2 . Also, a SNP call rate of $>97\%$ and a Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) of $p > 0.05$ was applied. The total of SNPs after filtering was 805,712.

The allelic frequency between diverse populations was estimated using the European (N = 1006), African (N = 1322) and admixed Native American (N = 694) reference populations in the deep catalog of human genetic variation - *1000 Genomes Project* [24] present in dbSNP (database of Single Nucleotide Polymorphisms) using GRCh37/hg19 as human genome reference. The public archive of human genetic variants and interpretations of their significance to disease *Clinvar* [25] enabled to search of physical position (hg19), genetic function, classification and clinical significance of SNPs [26].

From the total of 805,712 SNPs, the number of polymorphisms harbouring the cancer genes in LAT array was 2,948, of which 90 SNPs were selected for the analysis, and classified based on Ensembl genome browser predict consequence as intronic variant, upstream and downstream variants, untranslated regions (3'-UTR; 5'-UTR), synonymous or nonsynonymous variants. No cancer susceptibility variants in LAT array were identified in *MC1R* and *MITF* remaining 17 genes for allele frequency analysis. **Ancestry of SNP loci**

To derive ancestry of *GSTM1* and *GSTT1* alleles and null genotypes, 10 respectively, 41 gene-associated SNPs were analysed. The SNPs associated with the *GSTM1* gene had

following positions: The first SNP rs1056806 of *GSTM1* was localized at position 110233147 within exon seven and the second SNP, rs2239892, at 110234286 in an intronic sequence. All the other SNPs were localized at the 3'-flanking region of the *GSTM1* gene, between rs12061448 at 110246775 and rs1758109 at 110253130. The SNPs associated with the *GSTT1* gene had following positions: One group of SNPs was localized between rs200467 at position 24241533 and rs8138555, at position 24400360 in the 5'-flanking region of the *GSTT1* gene. The second group of SNPs was localized between rs138227558 at position 24340940 and rs422674 at position 24406778, embracing a segment of the 3'-flanking region of the *GSTT1* gene.

Amplification of GSTM1 and GSTT1

A triplex-PCR assay was used to amplify *GSTM1* and *GSTT1* and an internal control. The primers used to amplify *GSTM1* were 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3' and 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'. The expected fragment of *GSTM1* had a length of 215bp (Figure 1A and 1D). The primers used to amplify *GSTT1* were 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3' and 5'-TTCCTTACTGGTCCTCAATCTC-3'. The expected fragment of *GSTT1* had a length of 480pb (Figure 1B and 1D). As an internal control the β -globin gene was used. The primers to amplify 5'-CAACTTCATCCACGTTTCACC-3' were 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'. The expected length of the fragment of the control PCR was 268 pb (Figure 1C and 1D). Following PCR mix was used: Buffer 10x 5 μ l; dNTP's 10nmoles 5 μ l; primer forward and reverse 2.0 μ l, Taq DNA polymerase 0,5U/ μ l, 1 μ l of template e water nuclease free to 50 μ l reaction. Amplification of the DNA sequence of interest was obtained in 40 cycles that included DNA denaturing steps at 94°C for 5 minutes, annealing of reaction-initiator sequences (primers) at 57°C for 1 minute, and DNA chain extension by nucleotide addition at 72°C for 2 minutes. The PCR was loaded on a 2.0% agarose gel and gel electrophoresis was performed at 90 Volt during 60- 90 minutes (Figure 1). SNPs was localized between rs200467 at position 24241533 and rs8138555, at position 24400360 in the 5'-flanking region of the *GSTT1* gene. The second group of SNPs was localized between rs138227558 at position 24340940 and rs422674 at position 24406778, embracing a segment of the 3'-flanking region of the *GSTT1* gene.

Amplification of GSTM1 and GSTT1

A triplex- PCR assay was used to amplify *GSTM1* and *GSTT1* and an internal control. The primers used to amplify *GSTM1* were 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3' and 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'. The expected fragment of *GSTM1* had a length of 215bp (Figure 1A and 1D). The primers used to amplify *GSTT1* were 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3' and 5'-TTCCTTACTGGTCCTCAATCTC-3. The expected fragment of *GSTT1* had a length of 480pb (Figure 1B and 1D). As an internal control the β -globin gene was used. The primers to amplify 5'-CAACTTCATCCACGTTTCACC-3 were 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'. The expected length of the fragment of the control PCR was 268 pb (Figure 1C and 1D). Following PCR mix was used: Buffer 10x 5 μ l; dNTP's 10nmoles 5 μ l; primer forward and reverse 2.0 μ l, Taq DNA polymerase 0,5U/ μ l, 1 μ l of template e water nuclease free to 50 μ l reaction. Amplification of the DNA sequence of interest was obtained in 40 cycles that included DNA denaturing steps at 94°C for 5 minutes, annealing of reaction-initiator sequences (primers) at 57°C for 1 minute, and DNA chain extension by nucleotide addition at 72°C for 2 minutes. The PCR was loaded on a 2.0% agarose gel and gel electrophoresis was performed at 90 Volt during 60- 90 minutes (Figure 1).

Figure 1

Figure 1A

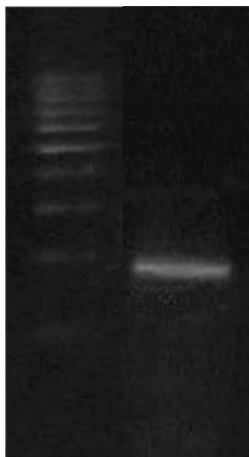


Figure 1B

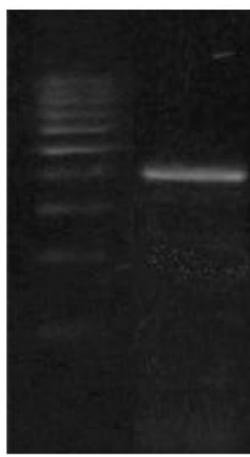


Figure 1C

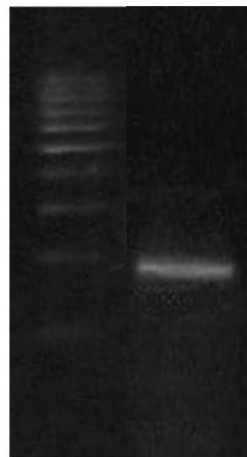


Figure 1: Figure 1A, *GSTM1* gene with 215 pb.
 Figure 1B, *GSTT1* gene 480 pb.
 Figure 1C, β -globin 268 pb.

Revision of literature

To compare own results about with published articles about *GSTM1*0* and *GSTT1*0* frequencies of different populations around the world literature search was performed. and The operational steps of literature search were conducted as followed: Definition of exclusion and inclusion criteria and database; selection of studies; extraction of information and categorization. The search was conducted in the *National Library of Medicine (MEDLINE)*, *PubMed* database. Abbreviations “*GSTM1*”, “*GSTT1*”, in combination with the term “*cancer*” were used to identify literature. The search was conducted in June 2020. Application of search terms “*GSTM1*” and “*cancer*” led to the identification of 2215 articles. Application of search terms “*GSTT1*” and “*cancer*” led to the identification of 1633 articles. Meta- analysis and literature revisions were excluded and only original articles were used for further analysis. Articles that did not describe frequencies of *GSTM1*0* and *GSTT1** were also excluded. Furthermore, articles that aimed exclusively on cancer- associations of *GSTM1*0* and *GSTT1*0*, other ones than incidence, like prognosis, survival rates and chemotherapy, were also excluded. To identify articles that met selective criteria, title and abstract and result section were analysed. Several Latina- American studies that aimed on *GSTM1*0* and *GSTT1*0* frequencies, but not on their association with cancer incidence were included for comparison with own data. All together, 55 studies about *GSTM1*0* and *GSTT1*0* frequencies of different populations were identified.

Statistical analysis

Fisher’s exact test and Pearson’s chi-square (χ^2) test were performed with SPSS STATISTICS™ software (SPSS; IBM company; version 24).

Results

*GSTM1*0* and *GSTT1*0* were identified in the case of 52 (72.2%) and 12 (16.7%) individuals, respectively. Of the 72 individuals 42 (58.3%) had alleles of both genes (*GSTM1+/GSTT1+*), 24 (33.3%) had *GSTM1*0* and an allele of the *GSTT1* gene (*GSTM1*0/GSTT1+*), four (5.6%) had a *GSTM1* allele and *GSTT1*0* and two (2.8%) had a null genotype of both genes (*GSTM1*0/GSTT1*0*). There was no recombinant haplotype detected and ancestry was always identical for the SNPs spanning the whole region from the 5’ to the 3’ end of each gene. Of all 25 African and 110 European haplotypes linked with the *GSTM1* gene, seven (28.0%), respectively 43 (39.1%) were associated with the *GSTM1*0* (Figure 2). Additionally, of nine Native American haplotypes two (22.2%) were also associated with *GSTM1*0* (Figure 2). Of all 28 African and 103 European haplotypes linked with the *GSTT1* gene, one (3.6%) and eight (7.8%) were associated with *GSTT1*0* (Figure 2). Furthermore, three (23.1%) out of 13 Native American haplotypes were associated with *GSTT1*0* (Figure 2).

Figure 2.

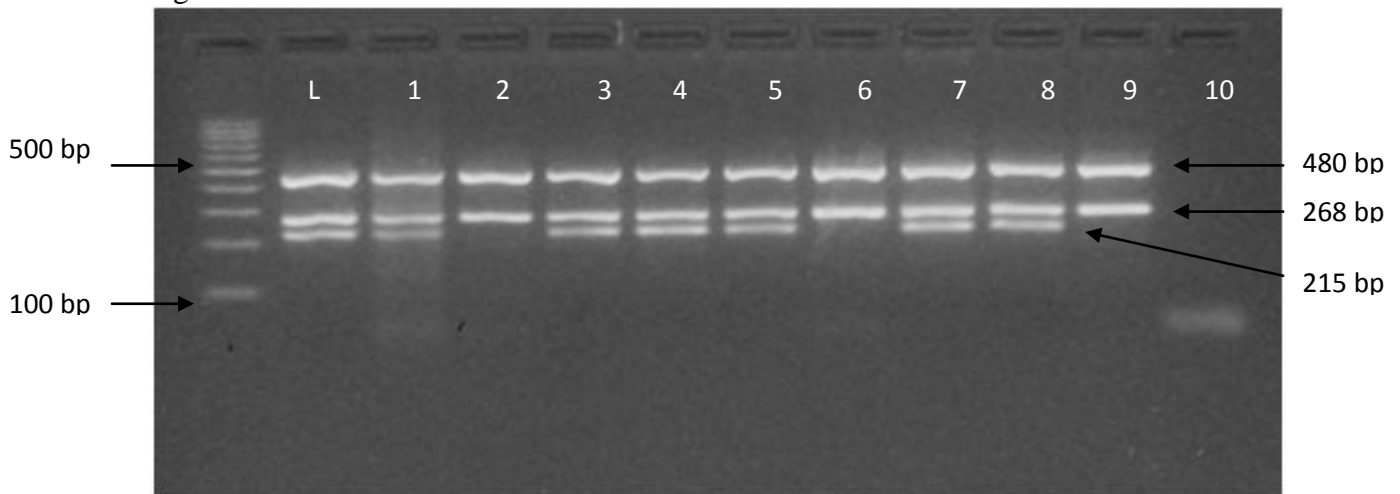


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of the multiplex PCR for *GSTT1* and *GSTM1* genotyping. The figure depicts an example of one 2% agarose gel electrophoresis, used to determine the *GSTT1* and *GSTM1* genotypes by multiplex PCR. Lanes 1, 2, 4, 5, 6, 8 and 9: *GSTM1* present/*GSTT1* present; Lanes 3, 7 and 10: *GSTT1* present/*GSTM1* null; Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10: *GSTT1* present. B Globin, was used as a positive control of the reaction. The negative control contains the reaction mix except the model DNA.

Frequencies of null genotypes and their corresponding ancestries were summarized in Table 1. Of the 52 null genotypes of the *GSTM1* gene, 7 (13.4%) had African, 43 (82.7%) European and 2 (3.9%) had Native American ancestry (Table 1). Of the 12 null genotypes of the *GSTT1* gene, one (8.3%) had African eight (66.7%) had European and three (25.0%) had Native American ancestry (Table 1). Frequencies of *GSTT1**0 and *GSTM1**0 were not significant different distributed among African, European and Native American ancestry ($p=0.389$; $p=0.102$; Table 1). Native American ancestry was more often associated with *GSTT1**0, compared to *GSTM1**0 ($p=0.047$; Table 1). Furthermore, also the alleles of *GSTM1* and *GSTT1* were similar distributed among single ancestry haplotypes of both genes ($p=0.987$). The alleles of the *GSTT1* gene and *GSTT1**0 had a heterogeneous distribution among haplotype combinations: A *GSTT1* allele was present in the case of 2 (3.1%), 21 (31.8%), respectively 8 (12.0%) haplotypes of African/African, African/European and Native American/European ancestry, without any *GSTT1**0 for these combined haplotypes ($p=0.005$; Table 1). In the case of the *GSTM1* gene in contrast, the alleles and *GSTM1**0 were not heterogeneously distributed, among haplotype combinations ($p=0.280$; Table 1). The distribution of alleles and null genotypes was not different between the haplotype combinations of the *GSTM1* and the *GSTT1* genes ($p=0.476$; $p=0.124$).

Table 1. Ancestry of single haplotypes (N= 144) and haplotype combinations (N= 72) of 5' and 3' flanking regions of the *GSTM1* and *GSTT1* gene are shown for null genotypes and alleles.

Single haplotypes	Null genotype	Allele	P
<i>GSTM1</i>			
African 28.0%	7 (13.4%)	18 (19.6%)	0.389
European 39.1%	43 (82.7%)	67 (72.8%)	

Nat. American 22.2%	2 (3.9%)	7 (7.6%)	
Haplotype combinations			
African/African	0	4 (8.7%)	0.280
African/ European	6 (23.0%)	9 (19.6%)	
African/Nat. American	1 (3.9%)	1 (2.2%)	
European / European	18 (69.2%)	25 (54.3%)	
European /Nat. American	1 (3.9%)	7 (15.2%)	
	<i>GSTT1</i>		
Single haplotypes			
African 3.6%	1 (8.3%)	27 (20.4%)	0.102
European 7.8%	8 (66.7%)	95 (72.0%)	
Nat. American 23.1%	3 (25.0%)	10 (7.6%)	
Haplotype combinations			
African/African	0	2 (3.1%)	0.005
African/ European	0	21 (31.8%)	
African/Nat. American	1 (16.7%)	2 (3.1%)	
European / European	4 (66.6%)	33 (50.0%)	
European /Nat. American	0	8 (12.0%)	
Nat. American/ Nat. American	1 (16.7%)	0	

Discussion

Despite the overwhelming number of studies in different populations, there exist only few studies that associated ancestry derived molecular markers with frequencies of *GSTM1**0 and *GSTT1**0 [12]. In the present study, socio- demographic background and life- style related risk factors of the 72 individuals of the same small community, were very similar. The advantage of such an admixed trihybrid population might be that real biological effects of null genotypes on cancer incidence and etiology, are not obscured by life- style related risk factors and environmental differences of distinct human populations. Therefore we think that the present admixed trihybrid population could serve as an interesting model in future case control studies of cancer to identify ancestry specific differences associated with frequencies of

*GSTM1**0 and *GSTT1**0.

*GSTM1**0 and *GSTT1**0 were not heterogeneously distributed among haplotypes of African, Native American and Caucasian ancestry. Therefore present results did not support the idea that the null genotype of both genotypes segregates preferentially with one of the three

ancestries. However, *GSTM1*0* and *GSTT1*0* were stronger associated with European ancestry, compared to African ancestry. In the case of *GSTM1*0*, this finding is in agreement with a previous study of 335 Brazilian individuals [12]. In this study authors applied insertion/deletion polymorphisms as ancestry informative markers and showed that the chance of having *GSTM1*0*, decreased with African ancestry [12].

*GSTM1*0* was more frequent if compared to *GSTT1*0*. This finding is in agreement with most previous studies summarized in Table 2. However, there exist for example studies from Cameroon, Somalia, China and Brazil in which the frequency *GSTT1*0* was higher compared to the frequency of *GSTM1*0* [27–31] (Table 2).

The frequency of *GSTM1*0* varied from 22.2% for Native American to 39.1% for European ancestry. In previous Brazilian studies of populations with undefined ancestry it varied from 42.6 to 72.4% (Table 2); [32–34]. The frequency of *GSTT1*0* varied from 3.6% and 23.1% for African and Native American ancestry. In previous Brazilian studies of populations with undefined ancestry in contrast, it varied from 12.2% to 96.0% (additional 1.) [31,35].

Of all haplotypes with African ancestry, 28.0% were associated with *GSTM1*0*. An identical frequency of 27.8% for *GSTM1*0* was determined in a previous study performed in Cameroon (additional 1). [28]. Other studies performed in Tanzania and the Ivory Coast identified higher frequencies of 33.0% and 36.0%, 36.1%, respectively (Table 2; [28,36,37]. In a study embracing five Afro- Brazilian populations the frequency of the *GSTM1*0* varied from 17.0% to 35% [38] additional 1. Of the 28 African haplotypes of the *GSTT1* gene, only one (3.6%) was associated with *GSTT1*0*. Previous studies of African populations identified higher frequencies from 25.0% to 47.0% for *GSTT1*0* [36,37] (Table 2). In Afro Brazilian populations also higher frequencies, ranging between 22.0% and 44.0%, were determined [38] Table 2.

In the present study 39.1% and 7.8% of all European haplotypes were associated with *GSTM1*0* and *GSTT1*0*. Magno and colleagues (2009) identified in a Brazilian European population a similar frequency of 37.9% for *GSTM1*0*, but a higher frequency of 27.6% for *GSTT1*0* (Table 2). In literature, based on data obtained from European populations, the frequency of null genotypes were generally higher than in the present study (Table 2): In the case of *GSTM1*0* it varied from 45.0% in populations from Argentine, Croatia and Poland to 57.6.0% in a Spanish study additional 1; [39–42]. Among populations of the Middle East and North Africa, frequency of *GSTM1*0* varied from 22.7% to 55.5% for populations from Syria and Egypt (Table 2). In Asia it varied from 20.0% in an Indian population to 60.0% 59.7% in Thailand (Pakakasama et al, 2005; Senthilkumar, 2012). Data obtained from European populations indicated a frequency of *GSTT1*0* between 14.0% and 28.3% for studies performed in Denmark and Italy [27,28]. Among populations of the Middle East and North Africa, it varied from 16.7% to 49.0% 48.2% for populations from Syria and Tunisia (additional 1). In Asia the frequency of *GSTT1*0* varied from 15.5% in an Indian population to 50.5% in Han Chinese and Korean populations [43–45].

In the present study the Native American haplotypes were less frequent compared to African and European ones. Furthermore, the Native American haplotypes were the unique one that was associated with a very similar frequency of about 20.0% with the null genotype of both genes. The unique homozygote Native American haplotype was associated with the *GSTT1*0*. Previous studies from Mexico, Venezuela and Brazil revealed very heterogeneous frequencies of null genotypes among Native American populations: It varied from 0.0% to 47.0% and from 0.0% to 30.3% for *GSTM1*0* and *GSTT1*0* [46–48] additional 1. This high variability together with complete absence of null genotype in several studies may reflect high degrees of endogamy among individuals of single Native American populations.

The low number of *GSTT1*0* may have contributed to the heterogeneous distribution of haplotype combinations. However, it remains difficult to explain why of all 22 heterozygous

African/European haplotypes no one was linked to the null genotype. The population of the present study had a high degree of endogamy. One possibility is that the low number of *GSTT1*0* and the heterogeneous distribution of haplotype combinations among alleles and *GSTT1*0* is the result of an endogamic effect. Alternatively, it could be a sampling bias due to the low number of data in this study.

The most severe limitation of this study was the low number of data. This may have led to a low resolution and obscure relations of haplotype ancestry and their relations to null genotypes. The 73 individuals of the present study were all ≥ 80 years old and did not have chronic diseases. Furthermore, the present population has a high degree of endogamy. Therefore, present results cannot be extrapolated to any other population and may represent just what was found in this population.

Table 2: Frequency of the null allele of the *GSTM1* and *GSTT1* gene in different studies and populations of the world.

Country	Sampling size	Frequency (%)		Reference
		<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>	
Sub-Saharan Africa				
Cameroon	126	27.8	46.8	Piacentini et al., 2011 ²⁸
Ivory coast	133	36.1	33.1	Santovito et al., 2010 ³⁷
Tanzania	220	33.0	25.0	Dandara et al., 2002 ³⁶
Mali	206	24.3	41.3	Kassogue et al., 2019 ⁵¹
Brazil	274	17- 35	22-44	Hiragi et al., 2007 ³⁸
Brazil	96	35.0	36.0	Hatagima et al., 2004 ³³
Asia				
China (Guangzhou)	412	47.1	48.1	Zhang et al., 2011 ²⁹
China		0.25	0.31	Chang, 2019
China (Han-Chinese)	212	50.9	49.5	Song et al., 2009 ⁴⁶

Korea	1699	54.3	50.5	Piao et al., 2009 ⁴⁵ .
Japan	320	57.5	42.6	Niwa et al., 2005 ⁵² .
Thailand	320	59.7	38.1	Pakakasama et al, 2005 ⁵³ .
Vietnam	100	42.0	30.0	Agusa et al., 2010 ⁵⁴ .
Philippines	127	59.0	25.0	Baclig et al., 2011 ⁵⁵ .
India (Gujarat)	504	20.0	35.5	Senthilkumar, 2012 ⁵⁶ .
Iranian (Tehran)	336	28.0	20.8	Safarinejad et al., 2011 ⁵⁷ .
India	251	37.5	15.5	Dunna et al., 2013 ⁴⁷ .
Latin America				
Brazil	602	50.3	38.2	Alves et al., 2019 ³⁰ .
Brazil	267	42.6	19.8	Pinheiro et al., 2013 ³² .
Brazil	203	37.9	27.6	Magno et al., 2009 ⁵⁸ .
Brazil	235	49.0	18.2	Godoy et al., 2014 ⁵⁹ .
Brazil	442	72.4	65.5	Rodrigues et al., 2015 ³⁴ .
Brazil	23	57.0	96.0	Costa et al., 2016 ³¹ .
Brazil	132	48.4	17.4	Pinheiro et al., 2017 ⁶⁰ .
Brazil	245	42.9	12.2	Brito et al., 2014 ³⁵ .
Brazil	138	47.0	19.0	Hatagima et al., 2004 ³³ .
México	211	44.0	11.0	Palma-Cano et al., 2017 ⁵⁰ .

Chile	253	36.3	11.1	Roco et al., 2012 ⁶¹ .
Venezuelan	120	51.0	11.0	Chiurillo et al., 2013 ⁴⁹ .
Paraguay	67	35.8	17.9	Gaspar et al., 2002 ⁴⁸
Middle East and North of Africa				
Pakistan	151	57.0	23.2	Zakiullah et al., 2015 ⁶² .
Egypt	200	55.5	29.5	Hamdy et al., 2003 ⁶³ .
Tunisian	261	54.4	48.2	Raffa et al., 2013 ⁴⁴ .
Saudi Arabia	654	47.4	20.6	Almoshabeck et al., 2016 ⁶⁴ .
Bahrain	167	49.7	28.7	Salem et al et al., 2011 ⁶⁵ .
Syria	172	22.7	16.7	Al-Achkar et al.,2014 ⁴³ .
Iran	169	50.9	20.7	Moasser et al., 2012 ⁶⁶ .
Ethiopia	153	43.8	37.3	Piacentini et al., 2011 ²⁸ .
Somalia	100	40.0	44.0	Buchard et al., 2007 ²⁷ .
Europe and North America				
Argentina	609	45.0	17.0	Weich., 2017 ⁴² .
Turkey	231	53.6	18.6	Ada et al., 2012 ⁶⁷ .
Croatia	60	45.0	22.0	Zuntar et al.,2014 ⁴¹
Denmark	200	52.5	14.0	Burchard et al., 2007 ²⁷ .

Italy	546	50.4	16.7	Palli et al.,2010 ⁶⁸ .
Lithuania	543	47.0	15.4	Danileviciute et al., 2012 ⁶⁹ .
Poland	365	45.2	21.1	Reszka et al.,2014 ⁴⁰ .
Italy	113	49.2	28.3	Piacentini et al., 2011 ²⁸ .
Spain	94	55.3	27.7	Piacentini et al., 2011 ²⁸ .
EUA	1802	52.0	21.0	Gates, et al 2008 ⁷⁰ .
Canada	304	51.3	17.2	Krajnovic et al.,1999 ⁷¹ .
Spain	132	57.6	21.6	Ruano-Ravina et al., 2013 ³⁹ .
Serbia	50	56.0	40.0	Stosic et al.,2014 ⁷² .
Slovenia	386	50.3	20.7	Petrovic and Peterlin.. 2014 ⁷³ .
Portugal (Covilha)	102	40.2	17.6	Ramalhinho et al., 2011 ⁷⁴ .

Conclusions

In the present study of 72 individuals, Native American, African and European ancestry, was not differentially associated with the frequency of *GSTMI*0* and *GSTTI*0*. Similar to previous studies, *GSTMI*0* was more frequent compared to *GSTTI*0* and null genotypes of both genes were more often associated with European than with African ancestry. Studies that associated null genotypes with ancestry markers are rare. Future case- control studies could help to identify ancestry specific effects of null genotypes of both genes in single trihybrid admixed populations.

REFERÊNCIAS

- [1] J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey, GLUTATHIONE TRANSFERASES, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 45 (2005) 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.
- [2] D. Liu, Y. Liu, L. Ran, H. Shang, D. Li, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and prostate cancer risk in Asians: a systematic review and meta-analysis, *Tumor Biology*. 34 (2013) 2539–2544. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0778-z>.
- [3] R. Udomsinprasert, S. Pongjaroenkit, J. Wongsantichon, A.J. Oakley, L.-A. Prapanthadara, M.C.J. Wilce, A.J. Ketterman, Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme, *Biochemical Journal*. 388 (2005) 763–771. <https://doi.org/10.1042/bj20042015>.
- [4] Y.-P. Luo, H.-C. Chen, M.A. Khan, F.-Z. Chen, X.-X. Wan, B. Tan, F.-D. Ou-Yang, D.-Z. Zhang, Genetic polymorphisms of metabolic enzymes—CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1, and gastric carcinoma susceptibility, *Tumor Biology*. 32 (2011) 215–222. <https://doi.org/10.1007/s13277-010-0115-8>.
- [5] A. Chatterjee, S. Gupta, The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer, *Cancer Lett*. 433 (2018) 33–42.
- [6] J. Seidegard, W.R. Vorachek, R.W. Pero, W.R. Pearson, Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 85 (1988) 7293–7297. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.19.7293>.
- [7] S. Pemble, K.R. Schroeder, S.R. Spencer, D.J. Meyer, E. Hallier, H.M. Bolt, B. Ketterer, J.B. Taylor, Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism, *Biochemical Journal*. 300 (1994) 271–276. <https://doi.org/10.1042/bj3000271>.
- [8] J.D. Hayes, R.C. Strange, Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences, *Pharmacology*. 61 (2000) 154–166.
- [9] G.D. Pietro, G. Di Pietro, L.A.V. Magno, F. Rios-Santos, Glutathione S-transferases: an overview in cancer research, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 6 (2010) 153–170. <https://doi.org/10.1517/17425250903427980>.
- [10] C. Yu, C. Hequn, L. Longfei, W. Long, C. Zhi, Z. Feng, C. Jinbo, L. Chao, Z. Xiongbing, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms are associated with increased bladder cancer risk: Evidence from updated meta-analysis, *Oncotarget*. 8 (2017) 3246–3258. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13702>.
- [11] L.-F. Miao, X.-H. Ye, X.-F. He, Individual and combined effects of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms on breast cancer risk: A meta-analysis and re-analysis of systematic meta-analyses, *PLoS One*. 15 (2020) e0216147.
- [12] G. Suarez-Kurtz, D.D. Vargens, C.J. Struchiner, L. Bastos-Rodrigues, S.D.J. Pena, Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of GST polymorphisms, *Pharmacogenet. Genomics*. 17 (2007) 765–771.
- [13] F.M. Salzano, M. Sans, Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations, *Genet. Mol. Biol.* 37 (2014) 151–170.
- [14] J.C. Mychaleckyj, A. Havt, U. Nayak, R. Pinkerton, E. Farber, P. Concannon, A.A. Lima, R.L. Guerrant, Genome-Wide Analysis in Brazilians Reveals Highly Differentiated Native American Genome Regions, *Mol. Biol. Evol.* 34 (2017) 559–574.
- [15] J. Alves-Silva, M. da Silva Santos, P.E.M. Guimarães, A.C.S. Ferreira, H.-J. Bandelt, S.D.J. Pena, V.F. Prado, The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages, *The American Journal of Human Genetics*. 67 (2000) 444–461. <https://doi.org/10.1086/303004>.

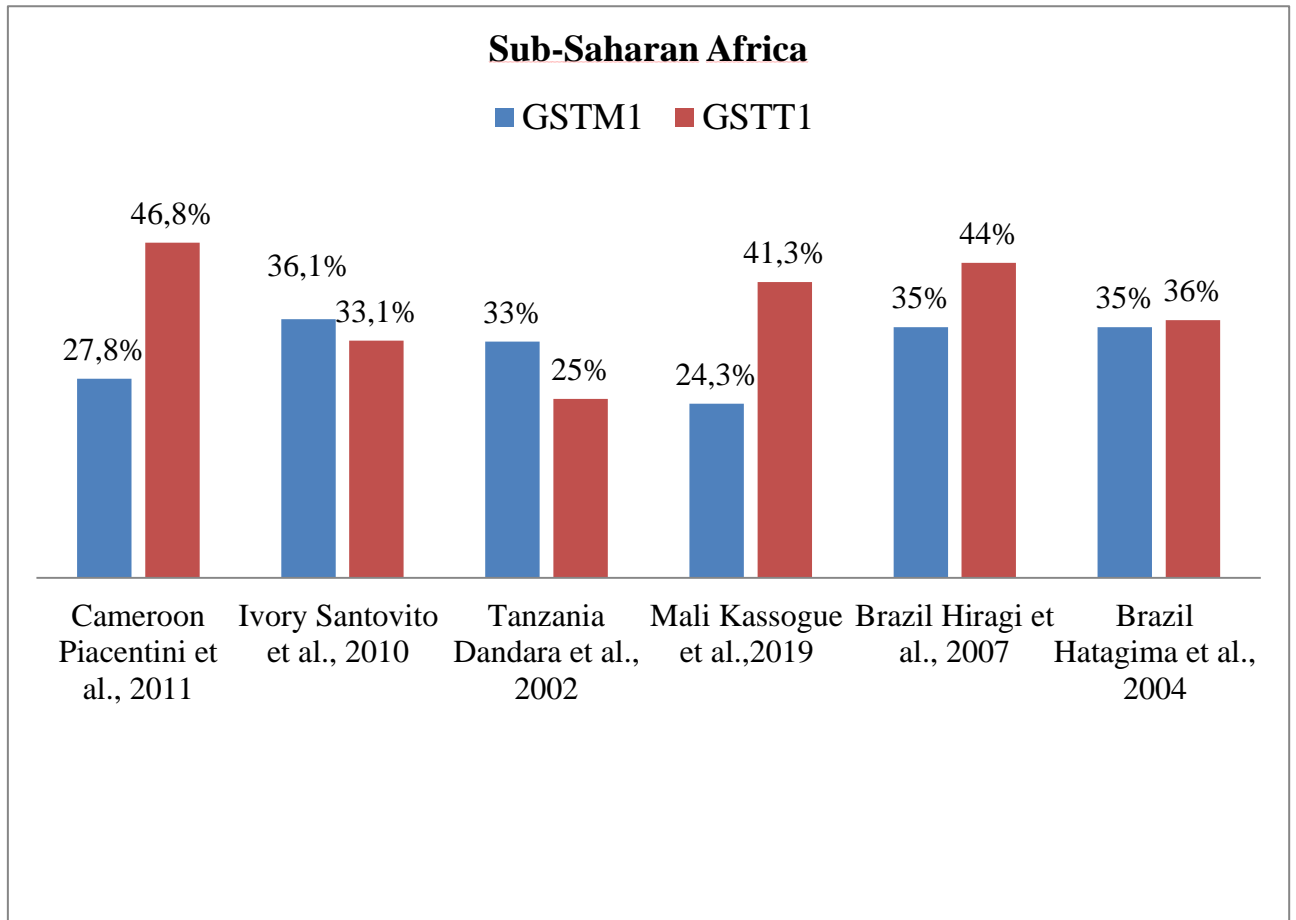
- [16] F.C. Parra, R.C. Amado, J.R. Lambertucci, J. Rocha, C.M. Antunes, S.D.J. Pena, Color and genomic ancestry in Brazilians, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100 (2003) 177–182. <https://doi.org/10.1073/pnas.0126614100>.
- [17] Website, (n.d.). <http://hygeia3.fsp.usp.br/sabe> (accessed August 17, 2020).
- [18] M.L. Lebrão, R. Laurenti, Saúde, bem-estar e envelhecimento: o estudo SABE no Município de São Paulo, *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 8 (2005) 127–141. <https://doi.org/10.1590/s1415-790x2005000200005>.
- [19] M.L. Lebrão, Y.A. de O. Duarte, J.L.F. Santos, N.N. da Silva, 10 Years of SABE Study: background, methodology and organization of the study, *Rev. Bras. Epidemiol.* 21Suppl 02 (2019) e180002.
- [20] M.S. Naslavsky, G.L. Yamamoto, T.F. de Almeida, S.A.M. Ezquina, D.Y. Sunaga, N. Pho, D. Bozoklian, T.O.M. Sandberg, L.A. Brito, M. Lazar, D.V. Bernardo, E. Amaro Jr, Y.A.O. Duarte, M.L. Lebrão, M.R. Passos-Bueno, M. Zatz, Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database, *Hum. Mutat.* 38 (2017) 751–763.
- [21] Brejo dos Santos, (n.d.). <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/pb/brejo-dos-santos.html> (accessed August 17, 2020).
- [22] M. Weller, M. Tanieri, J.C. Pereira, E. Dos Santos Almeida, F. Kok, S. Santos, Consanguineous unions and the burden of disability: A population-based study in communities of Northeastern Brazil, *American Journal of Human Biology*. 24 (2012) 835–840. <https://doi.org/10.1002/ajhb.22328>.
- [23] Website, (n.d.). (CONEP; http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/index.html; Brazil) (accessed August 17, 2020).
- [24] T. 1000 G.P. Consortium, The 1000 Genomes Project Consortium, An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes, *Nature*. 491 (2012) 56–65. <https://doi.org/10.1038/nature11632>.
- [25] ClinVar, ClinVar, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> (accessed August 17, 2020).
- [26] M.J. Landrum, J.M. Lee, M. Benson, G. Brown, C. Chao, S. Chitipiralla, B. Gu, J. Hart, D. Hoffman, J. Hoover, W. Jang, K. Katz, M. Ovetsky, G. Riley, A. Sethi, R. Tully, R. Villamarin-Salomon, W. Rubinstein, D.R. Maglott, ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) D862–8.
- [27] A. Buchard, J.J. Sanchez, K. Dalhoff, N. Morling, Multiplex PCR detection of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 gene variants: simultaneously detecting GSTM1 and GSTT1 gene copy number and the allelic status of the GSTP1 Ile105Val genetic variant, *J. Mol. Diagn.* 9 (2007) 612–617.
- [28] S. Piacentini, R. Polimanti, F. Porreca, C. Martínez-Labarga, G.F. De Stefano, M. Fuciarelli, GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms in European and African populations, *Mol. Biol. Rep.* 38 (2011) 1225–1230.
- [29] A.-P. Zhang, B.-H. Liu, L. Wang, Y. Gao, F. Li, S.-X. Sun, Glutathione S-transferase gene polymorphisms and risk of gastric cancer in a Chinese population, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 12 (2011) 3421–3425.
- [30] A.A. Alves, F.C. Franco, F.R. Godoy, J.S.A. Ramos, H.F. Nunes, T.N. Soares, D. de Melo e Silva, The importance of understanding the distribution of GSTM1 and GSTT1 genotypes and haplotypes in a region with intense agriculture activity, *Heliyon*. 5 (2019) e02815. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02815>.
- [31] I.R. Costa, R.S. Mascarenhas, J.F. Corrêa, F.R.B. Oliveira, S.G. Fernandes, F.O. Souza, G.M. Dos Reis, A. de P R Júnior, D.A. Rodrigues, J.V.M. Martins, K.S.F. E Silva, K.K.V.O. Moura, Analysis of the prevalence of polymorphisms in the glutathione S transferase gene (GST) in cataract patients from Goiânia, *Genet. Mol. Res.* 15 (2016). <https://doi.org/10.4238/gmr.15038050>.

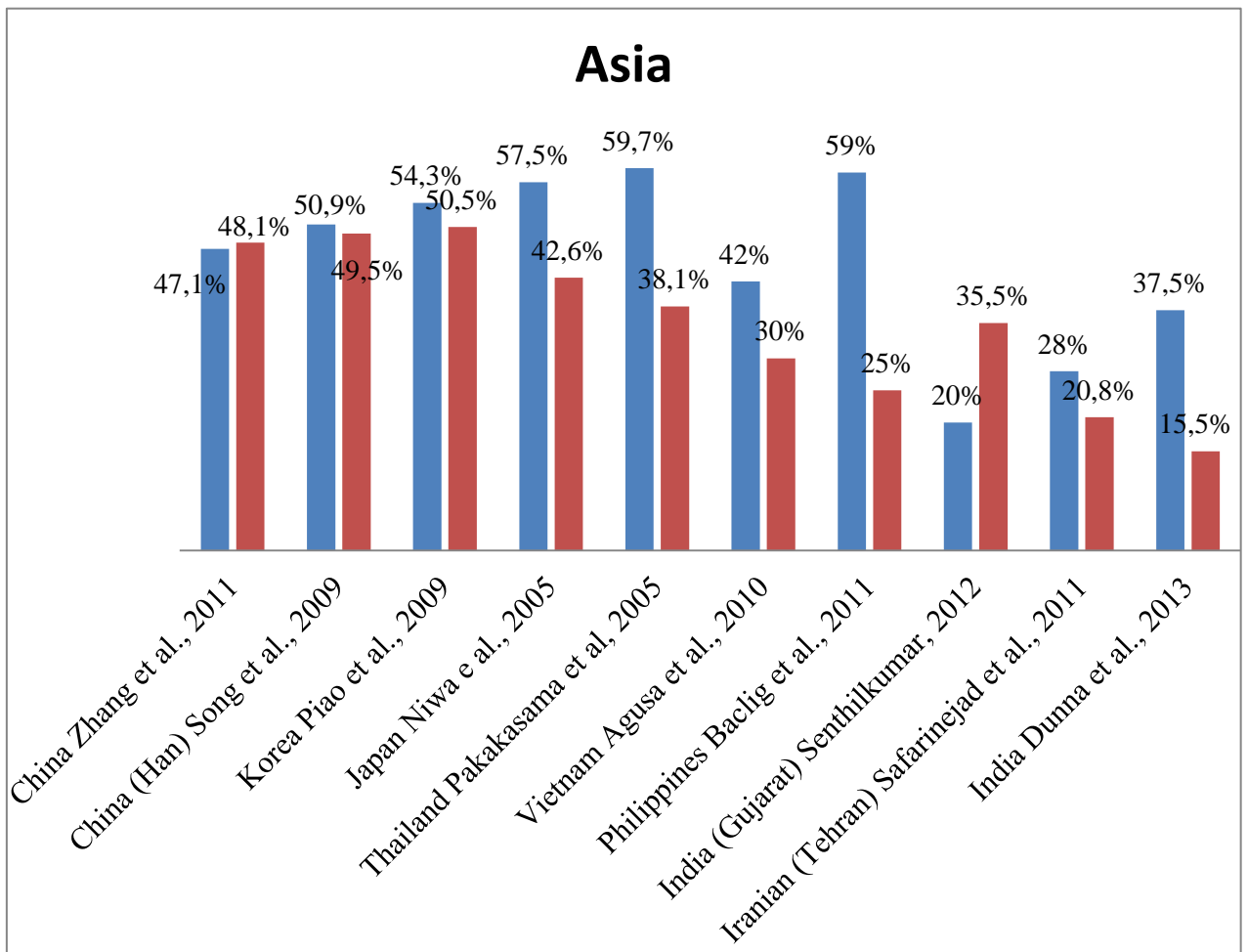
- [32] D.S. Pinheiro, C.R. Rocha Filho, C.A. Mundim, P. de M. Júnior, C.J. Ulhoa, A.A.S. Reis, P.C. Ghedini, Evaluation of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk, *PLoS One*. 8 (2013) e76262.
- [33] A. Hatagima, C.F.S. Marques, H. Krieger, M.F. Feitosa, Glutathione S-Transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) Polymorphisms in a Brazilian Mixed Population, *Human Biology*. 76 (2004) 937–942. <https://doi.org/10.1353/hub.2005.0018>.
- [34] D.A. Rodrigues, I.R. Costa, J.V.M. Martins, K.S. E, K K V, Polymorphisms of GSTM1, GSTT1, and p53 in Goiânia, Goiás, *Genetics and Molecular Research*. 14 (2015) 17358–17365. <https://doi.org/10.4238/2015.december.21.4>.
- [35] T.C. Brito, L.G. Possuelo, A.R.M. Valim, P.F. Todendi, A.W. Ribeiro, T.S. Gregianini, C.A. Jarczewski, M.H. Hutz, M.L.R. Rossetti, A. Zaha, Polymorphisms in CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 and anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity, *An. Acad. Bras. Cienc.* 86 (2014) 855–865.
- [36] C. Dandara, J. Sayi, C.M. Masimirembwa, A. Magimba, S. Kaaya, K. De Sommers, J.R. Snyman, J.A. Hasler, Genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1 (Cyp1A1) and glutathione transferases (M1, T1 and P1) among Africans, *Clin. Chem. Lab. Med.* 40 (2002) 952–957.
- [37] A. Santovito, C. Burgarello, P. Cervella, M. Delpero, Polymorphisms of cytochrome P450 1A1, glutathione s-transferases M1 and T1 genes in Ouangolodougou (Northern Ivory Coast), *Genet. Mol. Biol.* 33 (2010) 434–437.
- [38] C. de O. Hiragi, S.F. de Oliveira, A. Hatagima, L.B. Ferreira, C.K. Grisolia, M. de N. Klautau-Guimarães, Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms in Brazilian African descendants, *Hum. Biol.* 79 (2007) 131–140.
- [39] A. Ruano-Ravina, A.L. García-Basteiro, M. Pérez-Ríos, A. Gómez-Mosquera, S. Cerdeira-Caramés, J.M. Barros-Dios, Lung cancer survival and deletion of GSTM1 and GSTT1 genes. A case-series from Spain, *Tumori*. 99 (2013) 445–451.
- [40] E. Reszka, Z. Jablonowski, E. Wiczorek, E. Jablonska, M.B. Krol, J. Gromadzinska, A. Grzegorzczuk, M. Sosnowski, W. Wasowicz, Polymorphisms of NRF2 and NRF2 target genes in urinary bladder cancer patients, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 140 (2014) 1723–1731.
- [41] I. Zuntar, R. Petlevski, S. Dodig, S. Popović-Grle, GSTP1, GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and total serum GST concentration in stable male COPD, *Acta Pharm.* 64 (2014) 117–129.
- [42] N. Weich, A. Roisman, B. Cerliani, H.V. Araújo, L. Chertkoff, S.M. Richard, I. Slavutsky, I.B. Larripa, A.F. Fundia, Gene polymorphism profiles of drug-metabolising enzymes GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in an Argentinian population, *Annals of Human Biology*. 44 (2017) 379–383. <https://doi.org/10.1080/03014460.2016.1259429>.
- [43] J.-M. Piao, M.-H. Shin, S.-S. Kweon, H.N. Kim, J.-S. Choi, W.-K. Bae, H.-J. Shim, H.-R. Kim, Y.-K. Park, Y.-D. Choi, S.-H. Kim, Glutathione-S-transferase (GSTM1, GSTT1) and the risk of gastrointestinal cancer in a Korean population, *World Journal of Gastroenterology*. 15 (2009) 5716. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.5716>.
- [44] D.-K. Song, D.-L. Xing, L.-R. Zhang, Z.-X. Li, J. Liu, B.-P. Qiao, Association of NAT2, GSTM1, GSTT1, CYP2A6, and CYP2A13 gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of bladder cancer in Central China, *Cancer Detect. Prev.* 32 (2009) 416–423.
- [45] N.R. Dunna, S. Vure, K. Sailaja, D. Surekha, D. Raghunadharao, S. Rajappa, S. Vishnupriya, Deletion of GSTM1 and T1 genes as a risk factor for development of acute leukemia, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14 (2013) 2221–2224.
- [46] P.A. Gaspar, M.H. Hutz, F.M. Salzano, K. Hill, A.M. Hurtado, M.L. Petzl-Erler, L.T. Tsuneto, T.A. Weimer, Polymorphisms of CYP1a1, CYP2e1, GSTM1, GSTT1, and TP53 genes in Amerindians, *Am. J. Phys. Anthropol.* 119 (2002) 249–256.

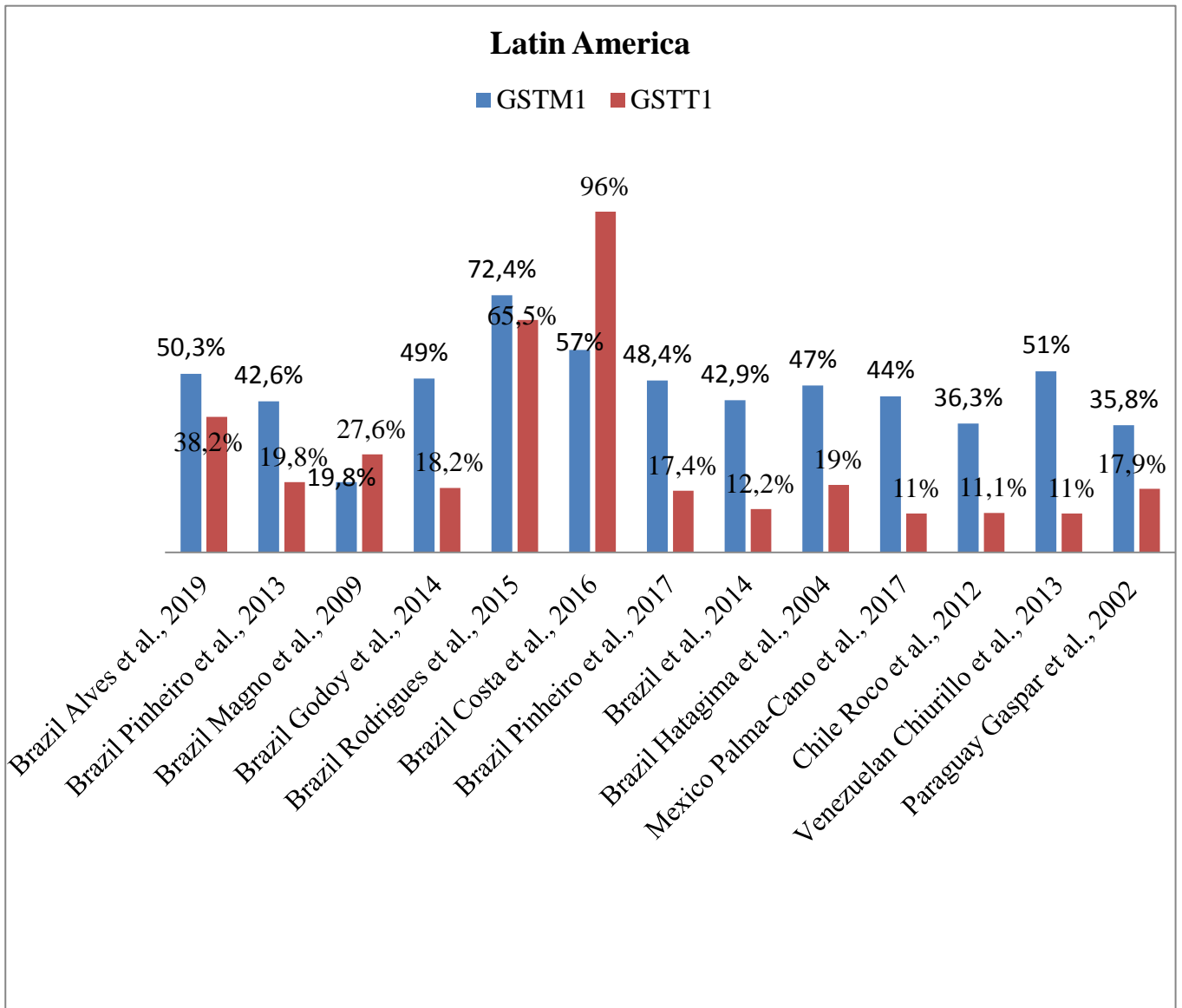
- [47] M.A. Chiurillo, P. Griman, L. Santiago, K. Torres, Y. Moran, L. Borjas, Distribution of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and TP53 disease-associated gene variants in native and urban Venezuelan populations, *Gene*. 531 (2013) 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.055>.
- [48] L.E. Palma-Cano, E.J. Córdova, L. Orozco, A. Martínez-Hernández, M. Cid, I. Leal-Berumen, A. Licón-Trillo, R. Lechuga-Valles, M. González-Ponce, E. González-Rodríguez, V. Moreno-Brito, GSTT1 and GSTM1 null variants in Mestizo and Amerindian populations from northwestern Mexico and a literature review, *Genetics and Molecular Biology*. 40 (2017) 727–735. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0142>.
- [49] Y. Kassogue, B. Diakite, O. Kassogue, I. Konate, K. Tamboura, Z. Diarra, H. Dehbi, S. Nadifi, C.B. Traore, S. Dao, S. Doumbia, G. Dolo, Genetic polymorphism of drug metabolism enzymes (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) in the healthy Malian population, *Mol. Biol. Rep.* 47 (2020) 393–400.
- [50] Y. Niwa, K. Hirose, T. Nakanishi, A. Nawa, K. Kuzuya, K. Tajima, N. Hamajima, Association of the NAD(P)H: quinone oxidoreductase C609T polymorphism and the risk of cervical cancer in Japanese subjects, *Gynecol. Oncol.* 96 (2005) 423–429.
- [51] S. Pakakasama, E. Mukda, W. Sasanakul, P. Kadegasem, U. Udomsubpayakul, A. Thithapandha, S. Hongeng, Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Am. J. Hematol.* 79 (2005) 202–205.
- [52] T. Agusa, H. Iwata, J. Fujihara, T. Kunito, H. Takeshita, T.B. Minh, P.T.K. Trang, P.H. Viet, S. Tanabe, Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase (GST) superfamily and arsenic metabolism in residents of the Red River Delta, Vietnam, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242 (2010) 352–362.
- [53] M.O. Baclig, M.R. Alvarez, X.M.R. Lozada, C.A. Mapua, J.P. Lozano-Kühne, M.P.S. Dimamay, F.F. Natividad, J. Gopez-Cervantes, R.R. Matias, Association of glutathione S-transferase T1 and M1 genotypes with chronic liver diseases among Filipinos, *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 3 (2012) 153–159.
- [54] K.P. Senthilkumar, R. Thirumurugan, GSTM1 and GSTT1 allele frequencies among various Indian and non-Indian ethnic groups, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13 (2012) 6263–6267.
- [55] M.R. Safarinejad, N. Shafiei, S.H. Safarinejad, Glutathione S-transferase gene polymorphisms (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and prostate cancer: a case-control study in Tehran, Iran, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 14 (2011) 105–113.
- [56] D.S. Pinheiro, R. da S. Santos, R.B. de Brito, A.H. da S. Cruz, P.C. Ghedini, A.A.S. Reis, GSTM1/GSTT1 double-null genotype increases risk of treatment-resistant schizophrenia: A genetic association study in Brazilian patients, *PLoS One*. 12 (2017) e0183812.
- [57] L.A.V. Magno, J. Talbot, T. Talbot, A.M.B. Santos, R.P. Souza, L.J. Marin, M.L. Moreli, P.R.S. de Melo, R.X. Corrêa, F.R. Santos, G. Di Pietro, Glutathione S-Transferase Variants in a Brazilian Population, *Pharmacology*. 83 (2009) 231–236. <https://doi.org/10.1159/000205823>.
- [58] F.R. Godoy, E.O.A. Costa, A.A. da Silva Reis, M.P. Batista, A.V. de Melo, M.W. Gonçalves, A.S. Cruz, C.O. de Araújo Melo, L.B. Minasi, C.L. Ribeiro, A.D. da Cruz, D. de Melo E Silva, Do GSTT1 and GSTM1 polymorphisms influence intoxication events in individuals occupationally exposed to pesticides?, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21 (2014) 3706–3712.
- [59] A. Roco, L. Quiñones, J.A.G. Agúndez, E. García-Martín, V. Squicciarini, C. Miranda, J. Garay, N. Farfán, I. Saavedra, D. Cáceres, C. Ibarra, N. Varela, Frequencies of 23 functionally significant variant alleles related with metabolism of antineoplastic drugs in the Chilean population: comparison with caucasian and asian populations, *Front. Genet.* 3 (2012) 229.
- [60] Zakiullah, Ahmadullah, M. Khisroon, M. Saeed, A. Khan, F. Khuda, S. Ali, N. Javed, M. Ovais, N. Masood, N.K. Khalil, M. Ismail, Genetic susceptibility to oral cancer due to

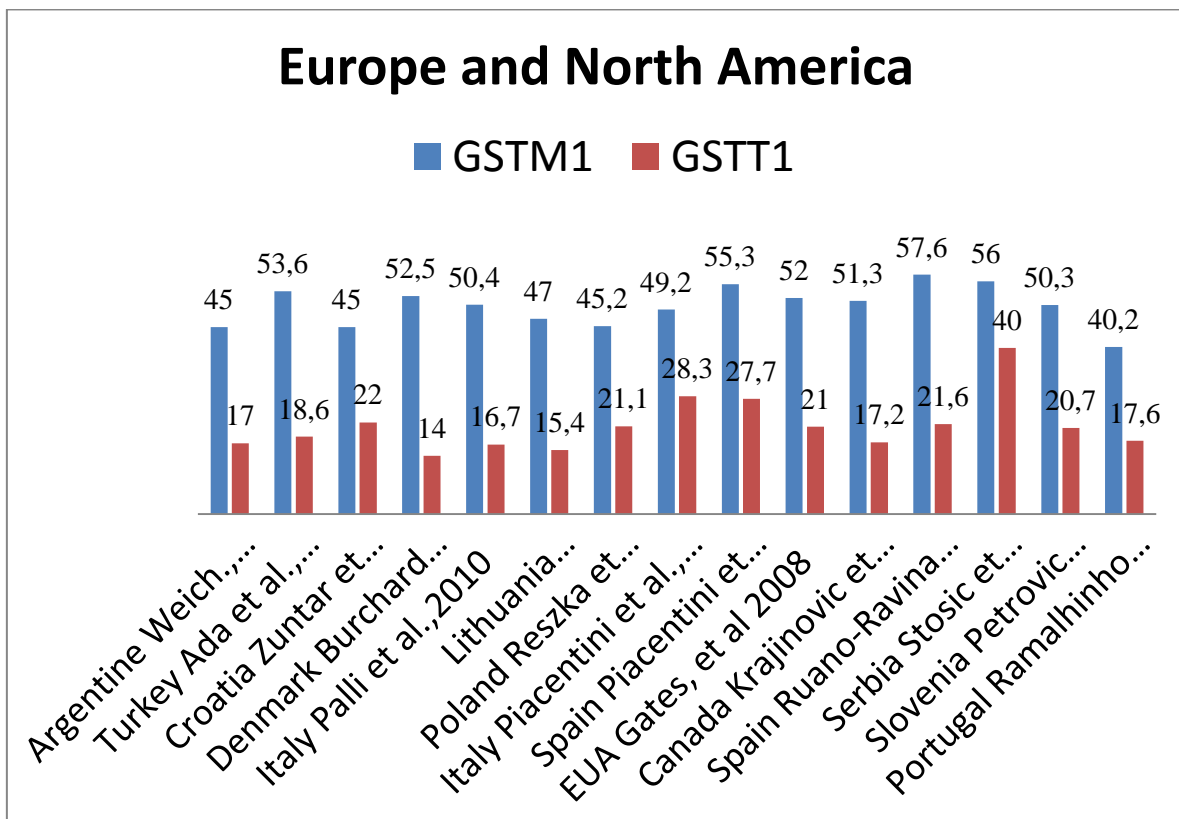
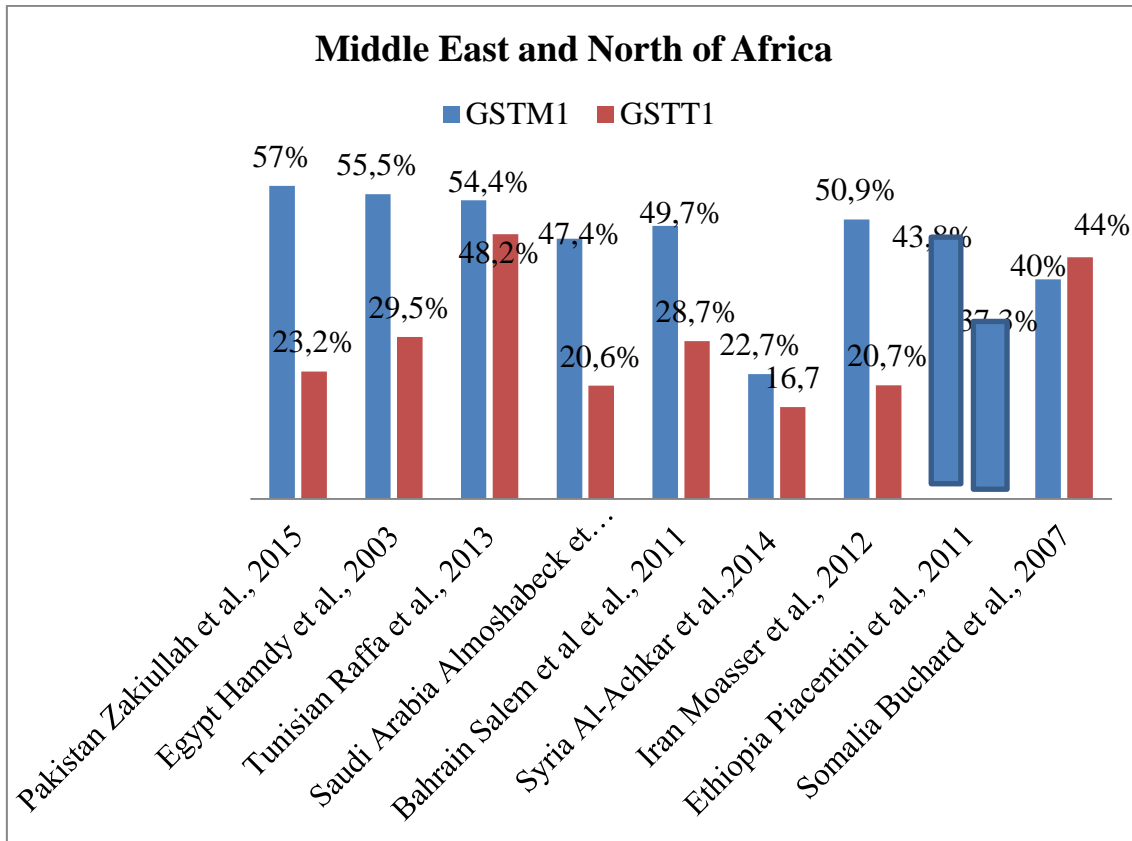
- combined effects of GSTT1, GSTM1 and CYP1A1 gene variants in tobacco addicted patients of Pashtun ethnicity of Khyber Pakhtunkhwa province of Pakistan, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 16 (2015) 1145–1150.
- [61] S.I. Hamdy, M. Hiratsuka, K. Narahara, N. Endo, M. El-Enany, N. Moursi, M.S.-E. Ahmed, M. Mizugaki, Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SUL1A1 and MDR-1 in the Egyptian population, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 55 (2003) 560–569.
- [62] H.A. Almoshabek, M. Mustafa, M.M. Al-Asmari, T.K. Alajmi, A.K. Al-Asmari, Association of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms with obesity and their relationship with body mass index, lipoprotein and hypertension among young age Saudis, *JRSM Cardiovascular Disease.* 5 (2016) 204800401666964. <https://doi.org/10.1177/2048004016669645>.
- [63] A.H. Salem, A. Yaqoob, M. Ali, S. Handu, R. Fadel, M. Abu-Hijleh, W. Almawi, Genetic polymorphism of the glutathione S-transferase M1 and T1 genes in three distinct Arab populations, *Dis. Markers.* 31 (2011) 311–316.
- [64] A.O. Ada, S.C. Kunak, F. Hancer, E. Soydas, S. Alpar, M. Gulhan, M. Iscan, Association between GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and lung cancer risk in a Turkish population, *Molecular Biology Reports.* 39 (2012) 5985–5993. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1411-0>.
- [65] D. Palli, S. Polidoro, M. D’Errico, C. Saieva, S. Guarrera, A.S. Calcagnile, F. Sera, A. Allione, S. Gemma, I. Zanna, A. Filomena, E. Testai, S. Caini, R. Moretti, M.-J. Gomez-Miguel, G. Nesi, I. Luzzi, L. Ottini, G. Masala, G. Matullo, E. Dogliotti, Polymorphic DNA repair and metabolic genes: a multigenic study on gastric cancer, *Mutagenesis.* 25 (2010) 569–575. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq042>.
- [66] A. Danileviciute, R. Grazuleviciene, A. Paulauskas, R. Nadisauskiene, M.J. Nieuwenhuijsen, Low level maternal smoking and infant birthweight reduction: genetic contributions of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms, *BMC Pregnancy Childbirth.* 12 (2012) 161.
- [67] M.A. Gates, S.S. Tworoger, K.L. Terry, L. Titus-Ernstoff, B. Rosner, I. De Vivo, D.W. Cramer, S.E. Hankinson, Talc use, variants of the GSTM1, GSTT1, and NAT2 genes, and risk of epithelial ovarian cancer, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17 (2008) 2436–2444.
- [68] M. Krajinovic, D. Labuda, C. Richer, S. Karimi, D. Sinnett, Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms, *Blood.* 93 (1999) 1496–1501.
- [69] I. Stosic, D. Grujicic, S. Arsenijevic, M. Brkic, O. Milosevic-Djordjevic, Glutathione S-transferase T1 and M1 polymorphisms and risk of uterine cervical lesions in women from central Serbia, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15 (2014) 3201–3205.
- [70] D. Petrovič, B. Peterlin, GSTM1-null and GSTT1-null genotypes are associated with essential arterial hypertension in patients with type 2 diabetes, *Clin. Biochem.* 47 (2014) 574–577.
- [71] A.C. Ramalhinho, J.A. Fonseca-Moutinho, L. Breitenfeld, Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and breast cancer risk: a study in a Portuguese population, *Molecular and Cellular Biochemistry.* 355 (2011) 265–271. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0863-9>.

Figure 3: Supplementary figure Revision of literature









6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A miscigenação da população brasileira, o elevado acometimento de doenças crônicas não transmissíveis, as condições da população sertaneja, seus hábitos e perfis genéticos, constituem desafios a serem mobilizados por diversas áreas de conhecimento. Ao passo que a genética tenta decifrar origens e abre caminhos para novos meios de resoluções de problemas de saúde pública, novos horizontes podem ser traçados.

O presente estudo, cuja maior questão seria averiguar a frequência de genótipos nulos de GST's, do qual a ausência implica em alterações dos processos de biotransformação de xenobióticos, podendo estar associados ao aumento do risco de malignidades e outras patologias, correlacionando a determinação da frequência dos genótipos nulos destes indivíduos sem histórico de câncer e com acúmulo de anos considerável a ancestralidade Africana, Ameríndia e Europeia, nos fez concluir que em relação a frequência, pouco mais de 50% dos participantes possuíam ambos os alelos presentes. Denotada a ancestralidade, traçamos a relação entre ela e os genótipos nulos. A predominância dos haplótipos europeu, de *GSTM1*, quando associada a genótipos nulos de *GSTM1*, apresentou o total de 39,1%, já a ancestralidade africana associada ao genótipo nulo, marcou 28,8%. No caso dos haplótipos de nativos americanos, tivemos 22,2% associados aos haplótipos nulos.

De acordo com nossas análises, o genótipo nulo de *GSTM1* esteve mais associado à ancestralidade europeia. Já em relação ao *GSTT1*, dos 103 haplótipos europeu, 7.8% foram associados ao genótipo nulo, enquanto nos haplótipos africanos a frequência foi de 3.6% - quando associados aos genótipos nulos. Se estabelecida a comparação entre frequência de *GSTM1*0* e frequência de *GSTT1*0*, é constatável maior quantidade de *GSTM1*0*. Podendo isso ser verificado em estudos anteriores no Brasil e em todo o mundo.

Algumas perguntas iniciais como a frequência dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em dada população do sertão, bem como sua ancestralidade, foram respondidas, no entanto, especificidades comuns relativas ao tamanho da amostra estudada, endogamia elevada, tornam-se limitações do trabalho.

7. REFERÊNCIAS

ALLOCATI, Nerino et al. Glutathione transferases in bacteria .**FEBS Journal**. v. 06743, p.1742-4658.2009.

ALMEIDA, Gibran Sarmento De et al. Reproductive Risk Factors Differ Among Breast Cancer Patients and Controls in a Public Hospital of Paraiba, Northeast Brazil .**Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**.v. 16, p.2959, 2015.

ALVES-SILVA, J. *et al.***The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. The American Journal of Human Genetics**. v.67, p.444-461. 2000.
Analysis in Brazilians Reveals Highly Differentiated Native American Genome

BOOTH, J.; BOYLAND, E.; SIMS, P. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. **Biochemical Journal** v. 79, n. 3, p. 516–524 , jun. 1961.

BRASIL, José et al.**INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS DAS CHUVAS NA INTERCEPTAÇÃO DA CAATINGA** . [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18068/iiisbrns2017.mbhs573>. , 2017.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615–1625, 2005.

BUENO, Lucas; DIAS, Adriana Schmidt; STEELE, James. The Late Pleistocene/Early Holocene archaeological record in Brazil: A geo-referenced database .**Quaternary International**. V. 301, p. 74-93. 2013.

CALLEGARI-JACQUES, Sidia M. et al.Historical genetics: Spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population .**American Journal of Human Biology**. v.15(6), p. 824-34. 2003.

CHATTERJEE, Anupam; GUPTA, Sanjay. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. **Cancer letters** v. 433, p. 33–42 , 1 out. 2018.

CHATTERJEE, Anupam; GUPTA, Sanjay. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. **Cancerletters** v. 433, p. 33–42 , 1 out. 2018.

CHEN, H.; JUCHAU, M. R. Recombinant human glutathione S-transferasescatalyseeenzymic isomerization of 13-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid in vitro. **Biochemical Journal** v. 336, p. 223–226 , 15 nov. 1998.

CONSORTIUM, The International Hapmap 3.; THE INTERNATIONAL HAPMAP 3 CONSORTIUM. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. V. 467, p. 52-58. **Nature**. Doi.org/10.1038/nature09298. 2010.

DATTA, S. K.; KUMAR, V.; PATHAK, R.; et al. Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphism with oxidative stress in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease. **Renal failure**, v. 32, n. 10, p. 1189–1195, 2010.

DE OLIVEIRA SCHIAVETTO, Solange Nunes. **A arqueologia guarani: construção e desconstrução da identidade indígena**. Annablume. p.138. 2003.

DEGIORGIO, M.; JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. Explaining worldwide patterns of human genetic variation using a coalescent-based serial founder model of migration outward from Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 106. P. 16057–16062. 2009. .

FARBER.; P. CONCANNON.; A. A. LIMA; R. LGUERRANT. “Genome-Wide
FILHO, Jacques Ribeiro et al. **RELAÇÃO CHUVA-DEFLÚVIO EM UMA MICROBACIA NO BIOMA CAATINGA**. Disponível em: Doi.org/10.18068/iiisbrns2017.mbhs518. 2017.

FRARE, A. B. et al. **GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in endometriosis in women from Goiás, Brazil**. **Genetics and molecular research: GMR** v. 12, n. 3, p. 2764–2770 . 2013.

GUEMBAROVSKI, Roberta Losi; DE SYLLOS CÓLUS, Ilce Mara. Glutathione S-transferase M1 (GSTM-1): distribuição étnica e relação com câncer. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v.22, p.3-9. 2001.

GUENGERICH, F. Peter et al. Analysis of the Kinetic Mechanism of Haloalkane Conjugation by Mammalian θ -Class Glutathione Transferases. **Chemical Research in Toxicology**. v. 16, n11, p.1493–1499. 2003.

HAMILTON, Diana S. et al. Mechanism of the Glutathione Transferase-Catalyzed Conversion of Antitumor 2-Crotonylloxymethyl-2-cycloalkenones to GSH Adducts. **Journal of the American Chemical Society**. V.125. P. 15049-15058 . 2003

HATAGIMA, Ana et al. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) polymorphisms in a Brazilian mixed population. **Human biology** v. 76, n. 6, p. 937–942 ,dez. 2004.

HAYES, John D.; FLANAGAN, Jack U.; JOWSEY, Ian R. Glutathione transferases. **Annual review of pharmacology and toxicology** v. 45, p. 51–88 , 2005.

HAYES, John D.; FLANAGAN, Jack U.; JOWSEY, Ian R. Glutathione transferases. **Annual review of pharmacology and toxicology** v. 45, p. 51–88 , 2005.

HAYES, John D.; PULFORD, David J. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part II. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. V.30.p.445-600. 1995.

HAYES, John D.; STRANGE, Richard C. Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences. **Pharmacology**. V. 61. p.154-66. 2000.

HAYES, P. C.; BOUCHIER, I. A.; BECKETT, G. J. Glutathione S-transferase in humans in health and disease. **Gut**. Doi.org/10.1136/gut.32.7.813. 1991.

HENN, B. M. et al. Fine-scale population structure and the era of next-generation sequencing. **Human Molecular Genetics**. v. 19. p. 221-226. 2010

HENN, B. M.; GIGNOUX, C. R.; JOBIN, M.; et al. Hunter-gatherer genomic diversity suggests a southern African origin for modern humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 13, p. 5154–5162, 2011.

HIRAGI, Cássia de Oliveira et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms in Brazilian African descendants. **Humanbiology** v. 79, n. 1, p. 131–140, fev. 2007.

HUANG, K.; SANDLER, R. S.; MILLIKAN, R. C.; et al. GSTM1 and GSTT1 polymorphisms, cigarette smoking, and risk of colon cancer: a population-based case-control study in North Carolina (United States). **Cancer causes & control: CCC**, v. 17, n. 4, p. 385–394, 2006.

HUANG, W.; WANG, W.; ZHOU, M.; CHEN, S.; ZHANG, X. Association of glutathione S-transferase polymorphisms (GSTM1 and GSTT1) with primary open-angle glaucoma: an evidence-based meta-analysis. **Gene**, v. 526, n. 2, p. 80–86, 2013.

HUBER, Paula C.; ALMEIDA, Wanda P.; DE FÁTIMA, Ângelo. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**. 2008

IBGE. IBGE | Brasil: 500 anos de povoamento | território brasileiro e povoamento | portugueses. Disponível em: <<https://brasil500anos.ibge.gov.br/territorio-brasileiro-e-povoamento/portugueses.html>>. Acesso em: 14 jun. 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Brasil, 500 anos de povoamento. **IBGE, Centro de Documentação e Disseminação de Informações**. Oak et al. (2020) Rio de Janeiro : IBGE, 232 p. 2007.

JERÔNIMO, Aline Ferreira de Araújo; FREITAS, Ângela Gabrielly Quirino; WELLER, Mathias. Risk factors of breast cancer and knowledge about the disease: an integrative revision of Latin American studies. **Ciência & saúde coletiva** v. 22, n. 1, p. 135–149, jan. 2017.

JOHANSSON, Ann-Sofie; MANNERVIK, Bengt. Human Glutathione Transferase A3-3, a Highly Efficient Catalyst of Double-bond Isomerization in the Biosynthetic Pathway of Steroid Hormones. **Journal of Biological Chemistry**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m104539200>>. , 2001

JOURENKOVA-MIRONOVA, N.; WIKMAN, H.; BOUCHARDY, C.; et al. Role of glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes in modulating susceptibility to smoking-related lung cancer. **Pharmacogenetics**, v. 81, p. 44–48, 1999.

KASSOGUE, Y.; DIAKITE, B.; KASSOGUE, O. Genetic polymorphism of drug metabolism enzymes (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) in the healthy Malian population. **Molecular biology reports**, v. 47, n. 1, p. 393–400, 2020.

KUMARI, S.; PANDA, S.; MANGARAJ, M.; MANDAL, M. K.; MAHAPATRA, P. C. Plasma MDA and antioxidant vitamins in diabetic retinopathy. **Indian journal of clinical biochemistry: IJCB**, v. 23, n. 2, p. 158–162, 2008.

LEITE, Fabio P. N. et al. Y-STR analysis in Brazilian and South Amerindian populations. **American journal of human biology: the official journal of the Human Biology Council** v. 20, n. 3, p. 359–363, maio 2008.

LI, Jun Z. et al. Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. **Science** v. 319, n. 5866, p. 1100–1104, 2008.

MACEDO-SOUZA, Lucia I. et al. Spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy is linked to chromosome 11q13. **Annals of Neurology**. v.57, p.730–737, 2005.

MACEDO-SOUZA, Lucia I. et al. Spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy is linked to chromosome 11q13. **Annals of Neurology**. v.57p.730-7. 2005.

MAGNO, Luiz Alexandre V. et al. Glutathione S-Transferase Variants in a Brazilian Population. **Pharmacology**. v.83.p.2009.

MANSOUR, A. A.; SALEH, O. M.; ASKAR, T.; SALIM, A. M.; MERGANI, A. Frequency of glutathione-S-transferase null-M1 and null-T1 genotypes among the Turabah population in Saudi Arabia. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 14, n. 4, p. 16863–16871, 2015.

MARTIN, Gabriela. A pré-história do Brasil no século do descobrimento. **Revista de Arqueologia**. v.7.p.91.1993.

MCWILLIAMS, J. E.; SANDERSON, B. J.; HARRIS, E. L.; RICHERT-BOE, K. E.; HENNER, W. D. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 4, n. 6, p. 589–594, 1995.

MONTAZERI-NAJAFABADY, Nima et al. The impact of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on susceptibility to gestational diabetes in Iranian population. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians** p. 1–6, 28 abr. 2020.

MUTZENBERG, Demétrio da Silva; DA SILVA MUTZENBERG, Demétrio; DE MATOS, Francisco de Assis Soares. Padrões gráficos das representações antropomórficas pré-históricas na microrregião do cariri ocidental paraibano: definições e correlações. **CLIO – Arqueológica**. v.30. p.67-99. 2015.

MYCHALECKYJ, JOSYF C., A. HAVT.; U. NAYAK.; R. PINKERTON.; E. NAIR, Rohini R.; KHANNA, Anuradha; SINGH, Kiran. Association of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms with early pregnancy loss in an Indian population and a meta-analysis. **Reproductive BioMedicine Online**. v.26.p.312-322.2013.

NEBERT, Daniel W. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v. 247. P.267-281.1991.

NIEVERGELT, Caroline M.; LIBIGER, Ondrej; SCHORK, Nik J. Generalized Analysis of Molecular Variance. **PLoS Genetics**. v. 3.p.467-478.2005.

NIWA, Yoshimitsu et al. Association of the NAD(P)H: quinone oxidoreductase C609T polymorphism and the risk of cervical cancer in Japanese subjects. **Gynecologic Oncology**. V.96. p.423–429.2005.

NOELLI, Francisco Silva. A Arqueologia Guarani: construção e desconstrução da identidade indígena. **Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia**. 2003

OAK, N.; CHERNIACK, A. D.; MASHL, R. J.; et al. Ancestry-specific predisposing germline variants in cancer. **Genome medicine**, v. 12, n. 1, p. 51, 2020.

OAKLEY, Aaron. Glutathione transferases: a structural perspective. **Drug metabolism reviews** v. 43, n. 2, p. 138–151 ,maio 2011.

PEMBLE, S. et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. **Biochemical Journal**. v.300. p.271-276. 1994.

PENA, S. D. J. et al. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**., V. 42(10)p.870-876.2009.
Regions.” **Molecular Biology and Evolution** v.34 (3).p 559–74.2017.

RODRIGUES-FLEMING, G. H.; FERNANDES, G. M. DE M.; RUSSO, A.; et al. Molecular evaluation of glutathione S transferase family genes in patients with sporadic colorectal cancer. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 24, n. 39, p. 4462–4471, 2018.

SÁ, Renata Almeida De et al. Human glutathione S-transferase polymorphisms associated with prostate cancer in the Brazilian population. **International braz j urol**. V. 40 (4):p.463-473.2014.

SALEHI, Z.; GHOLIZADEH, L.; VAZIRI, H.; MADANI, A. H. Analysis of GSTM1, GSTT1, and CYP1A1 in idiopathic male infertility. **Reproductive sciences** , v. 19, n. 1, p. 81–85, 2012.

SALZANO, Francisco M.; BORTOLINI, Maria C. The Evolution and Genetics of Latin American Populations.v.79.p. 2001

SANTOS, J. S. Cariri e Tarairiú?: culturas tapuias nos sertões da Paraíba. 2009.

Santos, Juvandi de Souza Cariri e Tarairiú ? : culturas tapuias nos sertões da Paraíba / Juvandi de Souza Santos. Porto Alegre, 2009.

SANTOS, S. C.; E. PARDONO.; M. I, F, COSTA.; A. N, MELO.; Z. GRACIANI.; A. C, A, S.; K. L.; R. S, R, T, AGUIAR.; R. C, MINGRONI-NETTO.; J. M, OPITZ.; F. KOK.; P. A, OTTO. A previously undescribed syndrome combining fibular agenesis/hypoplasia, oligodactylous clubfeet, anonychia/ungual hypoplasia, and other defects. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v. 146, p. 3126-3131, 2008.

SANTOS, S. C.; E. PARDONO.; M. I, F, COSTA.; A. N, MELO.; Z. GRACIANI.; A. C, A, S.; K. L.; R. S, R, T, AGUIAR.; R. C, MINGRONI-NETTO.; J. M, OPITZ.; F. KOK.; P. A, OTTO. A previously undescribed syndrome combining fibular agenesis/hypoplasia, oligodactylous clubfeet, anonychia/ungual hypoplasia, and other defects. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v. 146, p. 3126-3131, 2008.

SENTHILKUMAR, K. P.; THIRUMURUGAN, R. GSTM1 and GSTT1 allele frequencies among various Indian and non-Indian ethnic groups. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP** v. 13, n. 12, p. 6263–6267, 2012.

SINGH, Mable Mishaet al. Association of GSTT1/GSTM1 and ApoE variants with left ventricular diastolic dysfunction in thalassaemia major patients. **Hematology** v. 24, n. 1, p. 20–25, dez. 2019.

SIREESHA, R.; LAXMI, S. G. B.; MAMATA, M.; et al. Total activity of glutathione-S-transferase (GST) and polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 genes conferring risk for the development of age related cataracts. **Experimental eye research**, v. 98, p. 67–74, 2012.

STONEKING, Mark. Human origins. **EMBO reports**. v.9.p.S46-S50.2008.

STRANGE, Richard C. et al. Glutathione-S-transferase family of enzymes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0027-5107\(01\)00206-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0027-5107(01)00206-8)>. , 2001

STRANGE, Richard C. et al. Glutathione-S-transferase family of enzymes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v.482.p.21-26.2001.

STRANGE, Richard C. et al. Glutathione-S-transferase family of enzymes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v.482. p.21–26.2001.

SUAREZ-KURTZ, Guilherme et al. Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of GST polymorphisms. **Pharmacogenetics and genomics** v. 17, n. 9, p. 765–771, set. 2007.

SUN, Li; ZHANG, Yu; XIONG, Yitong. GSTM1 and GSTT1 null genotype and diabetic retinopathy: a meta-analysis. **International journal of clinical and experimental medicine** v. 8, n. 2, p. 1677–1683, 15 fev. 2015.

SUTHAR, P. C.; PURKAIT, P.; UTTARAVALLI, K.; et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotype frequency distribution among four tribal populations of western India. **Journal of genetics**, v. 97, n. 1, p. 11–24, 2018.

TANG, Hua et al. Reconstructing Genetic Ancestry Blocks in Admixed Individuals. **The American Journal of Human Genetics**. v. 79. p. 1-7. 2006.

TENG, L.-S.; ZHENG, Y.; WANG, H.-H. BRCA1/2 associated hereditary breast cancer. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 9, n. 2, p. 85–89, fev. 2008.

THOUDAM, Regina Devi et al. Distribution of glutathione S-transferase T1 and M1 genes polymorphisms in North East Indians: a potential report. **Genetic testing and molecular biomarkers** v. 14, n. 2, p. 163–169, abr. 2010.

WU, Baojian; DONG, Dong. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**. , V. 33, N. 12, p. 656 -668. 2012.

XU, Shi-Jie et al. Characterization of the Human Class Mu Glutathione S-Transferase Gene Cluster and the GSTM1 Deletion. **Journal of Biological Chemistry**. v. 273 p. 3517-3527. 1998.

YU, Lei et al. GST polymorphisms are associated with hepatocellular carcinoma risk in Chinese population. **World journal of gastroenterology: WJG** v. 17, n. 27, p. 3248-3256, 21 jul. 2011.

ZHANG, J.; LIU, Y. HER2 over-expression and response to different chemotherapy regimens in breast cancer. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 9, p. 5-9. 2008.

ZHIVOTOVSKY, Lev A.; ROSENBERG, Noah A.; FELDMAN, Marcus W. Features of evolution and expansion of modern humans, inferred from genomewide microsatellite markers. **American journal of human genetics** v. 72, n. 5, p. 1171-1186, maio 2003.

ZHOU S.; WANG R.; ZHOU J.; et al. [Association of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms with noise-induced hearing loss: a meta-analysis]. *Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi = Zhonghua laodong weisheng zhiyebing zazhi = Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases*, v. 32, n. 2, p. 123-125, 2014.