Márcia Cristina Duarte

# Interação dos polimorfismos dos genes de reparo XRCC1 e XRCC3 com fatores ambientais e suscetibilidade ao câncer gástrico

unesp

1910001361

unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Genética

*Márcia Cristina Duarte*

# Interação dos polimorfismos dos genes de reparo *XRCC1* e *XRCC3* com fatores ambientais e suscetibilidade ao câncer gástrico

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
T. 1361/05

**Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em Genética.**

**Orientadora: Profª Drª Ana Elizabete Silva**

**São José do Rio Preto – SP**
**Janeiro de 2005**

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

616.33-036
D812i

04/03/2005
Doação
R$ 25,00
Autor(a)
076/2005
75/05

Duarte, Márcia Cristina.
Interação dos polimorfismos dos genes de reparo *XRCC1* e *XRCC3* com fatores ambientais e suscetibilidade ao câncer gástrico / Márcia Cristina Duarte – São José do Rio Preto : [s.n.], 2005
103 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Ana Elizabete Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Estômago - Câncer. 2. Estômago - Inflamação. 3. Ácido desoxirribonucleico - Reparos. 4. Câncer gástrico. 5. Reparo do DNA. 6. Polimorfismo (Genética) 7. Genes *XRCC1* e *XRCC3*. I. Silva, Ana Elizabete. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas . III. Título.

CDU – 616.33

**MÁRCIA CRISTINA DUARTE**

Interação dos polimorfismos dos genes de reparo *XRCC1* e *XRCC3* com fatores ambientais e suscetibilidade ao câncer gástrico

DISSERTAÇÃO APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

**COMISSÃO JULGADORA**

Presidente e Orientadora: .....

2° Examinador .....

3° Examinador .....

São José do Rio Preto, ____/_____/_____.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – SP, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, com Bolsa CAPES.

# AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho contou com a colaboração de várias pessoas. A todos, meus sinceros agradecimentos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Elizabete Silva, pela orientação segura, amizade e apoio ao longo de todos estes anos e pela oportunidade de realização deste sonho.

À Profa. Dra. Andréa Regina Baptista Rossit, pelo apoio dedicado em todas as etapas deste trabalho e pelas amostras de DNA disponibilizadas.

À Ms. Jucimara Colombo, pela sua disponibilidade em me ensinar as técnicas e conceder parte das amostras utilizadas neste trabalho.

Aos médicos Dr. Aldenis Albanese Borim e Dr. Alaor Caetano, por possibilitarem a coleta de amostras no Hospital de Base de São José do Rio Preto.

Ao médico Dr. Durval Renato Whonrath do Hospital de Câncer de Barretos, pela grande ajuda durante a coleta de amostras.

Aos membros que irão compor a banca examinadora, Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi e Profa. Dra. Paula Rahal Liberatore, pela disponibilidade e avaliação dessa dissertação.

Ao Prof. Dr. José Antonio Manzato pela valiosa orientação na análise estatística.

Aos professores da Pós-Graduação, por compartilhar seus conhecimentos e contribuir para minha formação, em especial ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, pelo incentivo, amizade e apoio, que muito me ajudaram nesta etapa.

À todos os pacientes e amigos que voluntariamente e desinteressadamente doaram sangue e tornaram este trabalho possível.

Ao técnico Josué Rodrigues dos Santos que me acompanhou desde os primeiros passos, pela amizade construída e apoio oferecidos.

À enfermeira Kikue Kaomi de Oliveira pela disposição e valiosa ajuda ao me ensinar a coleta de sangue.

À todos os funcionários do IBILCE que de algum modo tornaram este trabalho possível.

À direção deste Instituto, pela infra-estrutura de ensino e pesquisa.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos que muito me ajudou.

Aos colegas dos Laboratórios de Citogenética Humana, Biologia Molecular e Evolução Molecular, por tão agradável convivência e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos de graduação e pós-graduação, pela amizade e pelos momentos de descontração, que tornaram menos árduo este trabalho.

Aos amigos de Ribeiro dos Santos que contribuíram para finais de semana animados e de muito bate-papo, aliviando as tensões da semana.

Aos meus tios Conceição e Alaor, pela disposição e carinho com que me abrigaram em sua casa.

À minha família que sempre me apoiou.

À minha mãe Ilza, por todo amor, dedicação e apoio a mim conferidos e pela grande amizade que construímos.

Ao meu noivo Fernando que me acompanhou em todas as etapas deste trabalho, pelo amor, carinho e paciência, e por acreditar em nossos sonhos.

À Deus pelo mais sublime dos dons.... a vida!

Dedico este trabalho

Aos meus pais Ilza e Zeca (*in memorian*) e

ao meu noivo Fernando

*"A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original."*

*Albert Einstein*

*"Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui. Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes. Assim, em cada lago a Lua toda brilha, porque alta vive."*

*Fernando Pessoa*

*"É preciso amar as pessoas como se não houvesse amanhã..."*

*Renato Russo*

**SUMÁRIO**

**I – INTRODUÇÃO**.....9

1. Polimorfismos em genes de reparo do DNA e carcinogênese.....10

2. Carcinogênese gástrica.....16

3. Objetivos.....21

**II – ARTIGO DE REVISÃO: MECANISMOS DE REPARO DO DNA E CÂNCER**....22

**III – SHORT COMMUNICATION: POLYMORPHISMS OF THE DNA REPAIR GENES *XRCC1* AND *XRCC3* IN A BRAZILIAN POPULATION**.....32

**IV – ARTIGO ORIGINAL: POLYMORPHISMS OF DNA REPAIR GENES *XRCC1* AND *XRCC3*, INTERACTION WITH ENVIRONMENTAL EXPOSURE AND RISK OF CHRONIC GASTRITIS AND GASTRIC CANCER**.....48

**V – DISCUSSÃO**.....75

**VI – CONCLUSÕES**.....82

**VII – RESUMO**.....84

**VIII – ABSTRACT**.....87

**IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.....90

**X – APÊNDICE A**.....102

# I - INTRODUÇÃO

# I- Introdução

## I.1. Polimorfismos em genes de reparo do DNA e carcinogênese

Apesar dos seres humanos compartilharem cerca de 99% do genoma, o 1% restante é crucial, uma vez que abriga as mudanças de base que estão associadas com o risco a doenças ou com a predisposição a estados patológicos (TARAMELLI; ACQUATI, 2004).

Knudson (1985) sugeriu que a população poderia ser dividida em quatro grupos ou oncodemes, dependendo da contribuição do ambiente e da genética no risco de câncer. O primeiro oncodeme abrigaria indivíduos que desenvolvem câncer devido a mutações ao acaso; no segundo, aqueles que desenvolvem câncer após exposição a carcinógenos ambientais; no terceiro, indivíduos com suscetibilidade genética a carcinógenos ambientais e no quarto, indivíduos em que a suscetibilidade genética é mais importante em relação aos eventos espontâneos ou induzidos ambientalmente.

Provavelmente, a grande maioria dos cânceres ocorre nos oncodemes dois e três, pois é impossível evitar a exposição a carcinógenos químicos. Deste modo, o câncer pode ser considerado um traço genético complexo, no qual genes e ambiente interagem, conferindo variabilidade de risco nos indivíduos que herdam alelos de predisposição (TARAMELLI; ACQUATI, 2004). Enquanto apenas 5% dos casos de câncer humano estão relacionados a genes raros, mas altamente penetrantes, como o *BRCA1* e o *BRCA2* no câncer de mama, genes polimórficos mais comuns, podem contribuir para uma grande proporção dos casos (CRAWFORD; SHIELDS, 2000). O polimorfismo é considerado como um traço mendeliano existente numa população em no mínimo dois fenótipos, nenhum dos quais ocorrendo em freqüência menor que 1% (FORD, 1940). Uma vez que estes polimorfismos podem modular a resposta individual a agentes que lesam o DNA derivados da dieta, cigarro,



bebida alcoólica e outros fatores ambientais, torna-se importante a avaliação do impacto destes genes sobre o risco individual de câncer, permitindo a caracterização de populações de alto risco e aplicação de estratégias de prevenção (HU et al., 2002).

Muitas proteínas envolvidas nos processos de metabolização de drogas e de reparo do DNA são polimórficas e podem influenciar a variabilidade interindividual na capacidade de ativar ou inativar compostos carcinogênicos ou genotóxicos e de reparar os danos no DNA por eles causados. A ativação e inativação de agentes genotóxicos potenciais ocorre através da ação das enzimas de metabolização de xenobióticos de Fase I e II. Muitas famílias de enzimas participam deste processo, incluindo citocromo P450 (CYPs), glutatião S-transferases (GSTs) e N-acetiltransferases (NATs). Como resultado do processo, são formados metabólitos inativos, rapidamente eliminados do organismo, mas também pode ocorrer a geração de compostos altamente reativos que podem ligar-se covalentemente ao DNA, RNA ou proteínas. Quando não eliminados pelo sistema de reparo do DNA, a formação de adutos com o DNA pode iniciar o processo que leva a mutações, transformação celular e câncer (SCHOKET et al., 2001).

A integridade do genoma é mantida por mecanismos capazes de reconhecer e reparar danos na molécula de DNA. Estes mecanismos são constituídos por complexos enzimáticos que monitoram os cromossomos corrigindo nucleotídeos danificados (WOOD et al., 2001). Muitas destas alterações são causadas por mutágenos endógenos, incluindo espécies de oxigênio reativos, bem como erros originados do processo de replicação, recombinação e do próprio reparo em si. Outras, entretanto, são o resultado da reação do DNA com uma variedade de compostos físicos, químicos e biológicos, muitos dos quais presentes no ambiente, e portanto, de exposição contínua ao homem (LINDAHL, 2000).

A eficiência do processo de reparo do DNA varia entre os indivíduos, deste modo a capacidade de reparo reduzida pode constituir um fator de risco para vários tipos de

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

neoplasias. Isto pode ser devido a alelos que são encontrados em freqüências polimórficas na população geral e possuem penetrância incompleta (MOHRENWEISER; JONES, 1998). Vários polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas nas vias de reparo do DNA foram identificados, incluindo os dos genes *ERCC1, XPD, XPF, XPC, XRCC1*, *hOGG1, XRCC3*, dentre outros (SHEN; JONES; MOHRENWEISER, 1998; ISHIDA et al., 1999; CHAVANNE et al., 2000).

O gene X-Ray Repair Cross Complementing 1 *(XRCC1)*, localiza-se em 19q13.2-q13.3 e codifica a proteína XRCC1 envolvida no reparo de excisão de bases (BER) (THOMPSON et al., 1989). Este gene foi clonado graças a sua capacidade de complementar a linhagem celular mutante de ovário de hamster chinês (EM9) que apresenta hipersensibilidade a agentes alquilantes e raios X (THOMPSON et al., 1990). Estas linhagens exibem acúmulo de quebras de cadeia simples no DNA e elevados níveis de aberrações cromossômicas (THACKER; ZDZIENICKA, 2003).

O BER é responsável por identificar e remover danos ao DNA, como bases oxidadas ou alquiladas, surgidos espontaneamente na célula ou da exposição a agentes exógenos como a radiação ionizante e luz UV (CHRISTMANN et al., 2003). Resumidamente, o BER consiste da identificação e retirada do dano por uma glicosilase específica, reconhecimento de um sítio AP (apurínico-apirimidínico) e incisão 5' da cadeia de DNA por uma AP endonuclease, síntese de DNA por uma DNA polimerase e ligação da cadeia de DNA. Este caminho pode seguir duas vias: uma mais curta, na qual apenas um nucleotídeo é substituído e outra mais longa, com a substituição de até 13 nucleotídeos (para revisão DIANOV et al., 2003; DUARTE; CONFORTI; SILVA, 2004).

A proteína XRCC1 não tem atividade enzimática conhecida, mas forma um complexo com outras proteínas de reparo, atuando como uma ponte, interagindo e regulando as funções enzimáticas (THOMPSON; WEST, 2000). Em seu domínio N-terminal, a XRCC1

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

interage com a DNA polimerase β; nos domínios BRCT-I e BRCT-II interage, respectivamente, com PARP-1 (poli ADP-ribose polimerase) e DNA ligase III, além de interagir com APE1 (AP endonuclease – 1) e PNK (polinucleotídeo quinase) em outros sítios (CALDECOTT, 2003). Desta forma, a XRCC1 atua como facilitadora e coordenadora do processo de reparo de excisão de bases, sendo imprescindível na formação do complexo com as demais proteínas. Outras funções incluem: estimular a atividade da APE1 (VIDAL et al., 2001) e PNK; recrutar e promover a ligação da DNA polimerase β na fita de DNA a ser reparada; regular a atividade da PARP; estabilizar a DNA ligase III celular, protegendo-a contra a degradação proteossômica, bem como direcioná-la para os sítios de quebras do DNA; favorecer o reparo em fita simples específico da fase S do ciclo celular; detectar quebras produzidas por ação química, física ou enzimática e atuar como ponte para as interações entre as proteinases (para revisão CALDECOTT, 2003).

Três polimorfismos foram identificados nas regiões codificadoras do gene *XRCC1* envolvendo os códons 194 no éxon 6, 280 no éxon 9 e 399 no éxon 10, com freqüências de 0,25, 0,08 e 0,25, respectivamente. Estas substituições levam, respectivamente, a mudanças dos aminoácidos arginina (Arg) por triptofano (Trp), arginina (Arg) por histidina (His) e arginina (Arg) por glutamina (Gln). As variantes Arg194Trp e Arg280His ocorrem na região ligadora, que separa os domínios de ligação da DNA polimerase β e PARP, enquanto a substituição Arg399Gln reside no domínio BRCT-1 de ligação com a PARP (SHEN; JONES; MOHRENWEISER, 1998).

Vários estudos têm avaliado as freqüências destas variantes alélicas em lesões malíganas e pré-malígnas nas populações humanas. O polimorfismo do códon 194 foi associado aos cânceres colorretal (ABDEL-RAHMAN et al., 2000), cárdia gástrica (SHEN et al., 2000), cabeça e pescoço (OLSHAN et al., 2002), mama (SMITH et al., 2003) e carcinoma de célula escamosa de pele (HAN et al., 2004). A variante Arg399Gln é a mais freqüente,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

constituindo um possível marcador para diversas neoplasias como cabeça e pescoço (STURGIS et al., 1999), colorretal (ABDEL-RAHMAN et al., 2000), cárdia gástrica (SHEN et al., 2000), esôfago (YU et al., 2004), mama (DUELL et al., 2001) e pulmão (DIVINE et al., 2001; ZHOU et al., 2003), assim como cirrose alcoólica (ROSSIT et al., 2002). Outros estudos entretanto, tem encontrado resultados conflitantes, reforçando a importância de investigações destes polimorfismos na determinação de marcadores genéticos (DAVIDE-BEABES; LONDON, 2001; OLSHAN et al., 2002; RATNASINGHE et al., 2004).

O gene *XRCC3* (X-Ray Repair Cross Complementing – 3) está mapeado em 14q32.3 (TEBBS et al., 1995) e codifica a proteína XRCC3, envolvida no reparo de quebras de cadeia dupla no DNA (DSB). Este gene foi identificado na linhagem celular de hamster chinês irs1SF, sensível a uma variedade de compostos que lesam o DNA, principalmente agentes de ligação cruzada no DNA, como a mitomicina C. Estas células também apresentam instabilidade genética, especialmente freqüências elevadas de aberrações cromossômicas (FULLER; PAINTER, 1988). Em mamíferos, mutações no gene *XRCC3* reduzem a taxa de reparo induzido por DSB de 30 a 250 vezes (BRENNEMAN et al., 2000).

As DSBs são uma das formas mais severas de danos ao DNA, levando a quebras cromossômicas e eventos de rearranjos que podem causar tumorigênese. As células respondem a tais quebras induzindo a parada do ciclo celular, seguido de reparo do DNA e/ou morte celular por apoptose (CHRISTMANN et al., 2003; RAFII et al., 2003). Em células de mamíferos as DSBs podem ser reparadas por duas vias distintas, uma envolvendo a recombinação homóloga e outra a ligação direta das extremidades quebradas.

O sistema de reparo por recombinação homóloga (HRR), preserva a integridade cromossômica durante a replicação do DNA e contribui para a remoção de DSBs e ligações cruzadas de agentes exógenos (YAMADA et al., 2004).



Durante o HRR, os finais quebrados são processados e convertidos a filamentos de nucleoproteínas com a Rad51. Esta funciona como uma proteína de transferência (BAUMANN; WEST, 1997), permitindo que a outra molécula de DNA homóloga intacta seja deslocada para servir como molde na síntese de DNA. A montagem do filamento nucleoprotéico de Rad51 é facilitada por cinco parálogos de Rad51 (XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C e Rad51D), que apresentam homologia em suas sequências (para revisão CHRISTMANN et al., 2003; DUARTE; CONFORTI; SILVA, 2004). Vários estudos sugerem que XRCC3 interage com Rad51C e possivelmente com a Rad51 em si, sendo que o complexo Rad51C-XRCC3 liga-se ao DNA, com maior afinidade ao DNA fita simples (KURUMIZAKA et al., 2001; MASSON et al., 2001). Yamada et al. (2004), em estudo com células selvagens e mutantes para o gene *XRCC3,* verificaram que a XRCC3 provavelmente regula a formação e dissociação do complexo Rad51C-XRCC3, por meio da ligação e hidrólise de ATP, sendo ambos os processos essenciais para a participação do complexo no reparo por recombinação homóloga.

A proteína XRCC3 parece atuar tanto na fase inicial da recombinação homóloga, em que ocorre a procura por homologia na molécula não danificada e invasão da cadeia para a síntese de DNA (BISHOP et al., 1998), como também pode atuar nos últimos eventos de recombinação. Nesta fase, talvez auxiliando a estabilização do complexo de nucleoproteína e formação de DNA heteroduplex (BRENNEMAN et al., 2002).

No gene *XRCC3*, alguns polimorfismos genéticos foram identificados na região codificadora do éxon 7 (SHEN; JONES; MOHRENWEISER, 1998; RAFII et al., 2003). O mais comum, com freqüência alélica de 0,38, ocorre devido à substituição de timina por citosina no códon 241, levando a mudança do aminoácido treonina (Thr) por metionina (Met) (SHEN; JONES; MOHRENWEISER, 1998). Essa substituição de um aminoácido hidroxila para um sulfidrila, pode representar uma alteração substancial nas características da

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

proteína (WINSEY et al., 2000). Três outros polimorfismos nos códons 199, 213 e 241 no éxon 7 também foram caracterizados, promovendo a substituição de aminoácidos, mas com freqüências muito baixas (RAFII et al., 2003).

O polimorfismo Thr241Met do gene *XRCC3* tem sido associado com a exposição ambiental a aminas aromáticas, que são capazes de gerar adutos e induzir lesões no DNA (MATULLO et al., 2001b). Outros estudos têm relacionado esta variante com alguns tipos de câncer, como melanoma de pele (WINSEY et al., 2000), bexiga (MATULLO et al., 2001b), mama (SMITH et al., 2003) e pulmão (JACOBSEN et al., 2004). No entanto, os resultados são divergentes, pois alguns relatos não evidenciaram associação desta variante com um aumento da suscetibilidade ao câncer de pulmão (BUTKIEWICZ et al., 2001; DAVID-BEABES; LUNN; LONDON, 2001), melanoma de pele (DUAN et al., 2002; BERTRAM et al., 2004), mama (HAN et al., 2003), gástrico (SHEN et al., 2004) e bexiga (SANYAL et al., 2004).

Dada a complexidade da atuação das proteínas XRCC1 e XRCC3 no sistema de reparo do DNA, são necessários estudos adicionais que avaliem o significado funcional dos polimorfismos moleculares destes genes e de suas conseqüências na suscetibilidade ao câncer.

### I.2. Carcinogênese Gástrica

O câncer gástrico é a segunda causa de mortalidade por câncer mundialmente, responsável por 9,9% dos casos e 12,1% de todas as mortes por câncer (PARKIN; PISANI; FERLAY, 1999). Segundo as Estimativas de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil, estão previstos cerca de 23 mil casos novos de câncer de estômago em 2005, ocupando o quarto lugar (INCA, 2004). A incidência do câncer gástrico apresenta grande variação

geográfica, com as taxas mais elevadas ocorrendo nos países asiáticos, como Japão e China e países em desenvolvimento, principalmente na América do Sul (PARKIN; PISANI; FERLAY, 1999; TERRY; GAUDER; GAMMON, 2002).

Esta neoplasia é duas vezes mais comum em homens do que em mulheres, principalmente entre idosos. Sua freqüência é relativamente baixa aos 40 anos, aumentando progressivamente com a idade e atingindo sua incidência mais elevada por volta dos 70 anos (COTRAN, 1999).

Durante os últimos 50 anos, a incidência e mortalidade de câncer gástrico tem diminuído mundialmente, principalmente em países desenvolvidos, como Estados Unidos e Inglaterra, devido principalmente a melhoria nas condições de vida e aumento do consumo de frutas e vegetais frescos, do que pelos progressos no tratamento. Esta redução ocorre principalmente em tumores na região proximal ou cárdia, enquanto os tumores distais têm, atualmente, dobrado de incidência (HOHENBERGER; GRETSCHEL, 2003).

Aproximadamente 90% dos cânceres gástricos são adenocarcinomas. Fenotipicamente podem ser divididos em duas entidades histomorfológicas denominadas "intestinal" e "difuso", segundo a classificação de Lauren de 1965. Estes tipos histológicos diferem em epidemiologia, patologia, conseqüência clínica e perfil genético. O tipo intestinal (ou bem diferenciado) é o resultado final de um processo multipasso que começa com uma gastrite crônica, geralmente decorrente da infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* e progride para atrofia, metaplasia intestinal e displasia (para revisão CORREA, 2004). Este tipo de tumor gástrico é mais freqüente em países com altas taxas de incidência da doença como o Japão e a China, afetando mais homens idosos. O tipo difuso (ou indiferenciado) não apresenta lesões histológicas precursoras conhecidas. Este tipo pode levar a metástases precoces e mostra um curso clínico mais agressivo que o tipo intestinal. A incidência do tipo difuso é similarmente alta na maioria das populações, ocorrendo mais freqüentemente em

mulheres mais jovens, tendo um prognóstico menos favorável (BEVAN; HOULSTON, 1999; STADTLANDER; WATERBOR, 1999; NARDONE, 2003).

A etiologia do câncer gástrico é bastante complexa, com a participação de muitos fatores, incluindo compostos genotóxicos provenientes da dieta (KOBAYASHI et al., 2002) e do ambiente (SASAZUKI; SASAKI; TSUGANE, 2002), fatores genéticos (TAHARA, 2004), agentes infecciosos como a bactéria *Helicobacter pylori* (WU et al., 2003) e lesões gástricas benignas (GENTA, 1998).

O consumo elevado de alimentos ricos em sal e nitratos, parecem ser os responsáveis pela incidência aumentada de câncer gástrico nos países asiáticos. O consumo de sal em excesso irrita a mucosa do estômago, provocando gastrite atrófica e aumentando o efeito mutagênico de alimentos nitrogenados, que formam compostos N-nitrosos, altamente carcinogênicos. Alimentos defumados, enlatados, alta ingestão de carboidratos e baixa ingestão de vegetais, frutas e leite, também aumentam os riscos de carcinoma gástrico (para revisão STADTLANDER; WATERBOR, 1999). O consumo excessivo de álcool e cigarro também têm sido associado com o aumento do risco de neoplasia gástrica (MUNÕZ et al., 2001). De modo contrário, antioxidantes como o ácido ascórbico e a vitamina E, carotenóides e selenio na dieta parecem exercer um papel importante na prevenção desta doença (KELLEY; DUGGAN, 2003).

A gastrite é a lesão mais freqüentemente encontrada no estômago e caracteriza-se pela inflamação da mucosa gástrica. A gastrite crônica pode aparecer como um processo inflamatório superficial, podendo progredir para a atrofia do epitélio gástrico em que ocorre a perda progressiva de glândulas, e pode estar associada a metaplasia intestinal. Neste tipo de lesão, as glândulas perdidas são substituídas por células epiteliais com fenótipo intestinal (CORREA, 2004). Cerca de 10% dos pacientes com atrofia gástrica desenvolvem

adenocarcinoma em um período de 15 anos (CHELI; GIACOSA, 1983), sendo por isso, considerada uma lesão pré-maligna (GENTA, 1998).

A gastrite crônica é freqüentemente precedida pela infecção com *Helicobacter pylori*, uma bactéria Gram-negativa, determinada como causa definitiva de câncer gástrico pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 1994). Vários mecanismos foram propostos para a carcinogênese associada à *H. pylori*, dentre os quais estão a desregulação do ciclo celular das células epiteliais gástricas, formação de adutos de DNA, geração de radicais livres e compostos N-nitrosos, alterações na secreção de fatores de crescimento e citoquinas e diminuição das secreções gástricas (HEAVEY; ROWLAND, 2004). Fatores de virulência da bactéria como a citotoxina cagA que é injetada no citoplasma das células hospedeiras, e a toxina vacuolizante polimórfica vacA, bem como fatores genéticos do hospedeiro, também foram apontados como responsáveis pelo desenvolvimento de neoplasia gástrica (para revisão CORREA, 2004). A infecção pela *H. pylori* está associada com dano significante às células epiteliais e aumento da taxa de apoptose, resultando em atrofia glandular (GENTA, 1998; HEAVEY; ROWLAND, 2004).

Alterações genéticas e epigenéticas múltiplas em oncogenes, genes supressores de tumor, reguladores do ciclo celular, moléculas de adesão, genes de reparo do DNA e instabilidade genética, estão envolvidos no processo de múltiplas etapas da carcinogênese gástrica (TAHARA, 2004).

Estudos sobre o padrão de expressão gênica em tumores gástricos, têm destacado expressão aumentada dos genes *Ciclina E1*, *c-ERBB-2*, *AXIN2*, *β-catenina* e *EPHB2*, e uma baixa expressão dos genes *MUC, TTF1* e *CDKN1C*, que poderiam servir como marcadores da tumorigênese gástrica (CHEN et al., 2003). Entretanto, combinações particulares de alterações gênicas diferem nos dois tipos histológicos de tumores gástricos,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

indicando que os adenocarcinomas intestinal e difuso diferem quanto aos processos que levam a tumorigênese.

No processo de múltiplas etapas do câncer gástrico tipo intestinal, a infecção pela *H. pylori* pode desencadear a hiperplasia de células-tronco (com atividade da telomerase) na metaplasia intestinal, levando à instabilidade genética, erros de replicação e hipermetilação de alguns genes, em cerca de 30% dos casos de metaplasia intestinal. Além disso, mutação e perda de heterozigosidade (LOH) de *TP53*, expressão reduzida de *p23*, expressão de *Ciclina E* e *c-met*, permite a transformação maligna das lesões pré-cancerosas para adenocarcinoma gástrico tipo intestinal. Nos estágios mais avançados da doença, estão associados a perda de *DCC* e *p27*, LOH de 1q, mutações em *APC*, expressão reduzida de *TGF-β* e *nm23* e amplificação do gene *c-ERBB-2* (TAHARA, 2004).

No tipo difuso ou pouco diferenciado de câncer gástrico destaca-se a LOH no cromossomo 17p, mutação ou LOH de *TP53,* mutação ou perda de *E-caderina* e cateninas. Enquanto a amplificação dos genes K-*sam* e *c-met*, perda de *p27* e expressão reduzida de nm23, conferem progressão, metástase e fibrose difusa (TAHARA, 2004).

Devido a grande complexidade na carcinogênese gástrica, em que ocorre forte interação entre fatores genéticos e ambientais, ainda há muitos processos a serem esclarecidos quanto às vias moleculares envolvidas no desenvolvimento da doença, possibilitando, futuramente, a utilização de estratégias de prevenção e o tratamento mais direcionado das pessoas afetadas.

Os estudos moleculares têm evidenciado genes específicos que encontram-se alterados, participando de diferentes etapas da carcinogênese do estômago. Contudo outras classes de genes relevantes, como os genes de reparo do DNA têm um importante papel na manutenção da integridade celular, sendo que a presença de polimorfismos genéticos pode constituir um fator de risco para a suscetibilidade individual ao câncer. Deste modo, tornam-

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

se necessários estudos epidemiológicos, em diferentes populações, que avaliem as conseqüências destes polimorfismos e a sua interação com fatores ambientais no processo carcinogênico. Assim, permitindo estimar os riscos de desenvolvimento de cânceres específicos a partir da interação genótipo-ambiente.

### I.3. Objetivos

De acordo com o exposto acima e, levando-se em conta a escassez de estudos que avaliem o papel de polimorfismos em genes de reparo do DNA na carcinogênese gástrica e sua interação com fatores ambientais envolvidos na etiologia desta doença, este trabalho teve por objetivos:

a) determinar as freqüências alélicas dos polimorfismos para os códons 194 e 399 do gene de reparo de excisão de bases *XRCC1* e do códon 241 do gene de reparo homólogo *XRCC3* em indivíduos saudáveis;

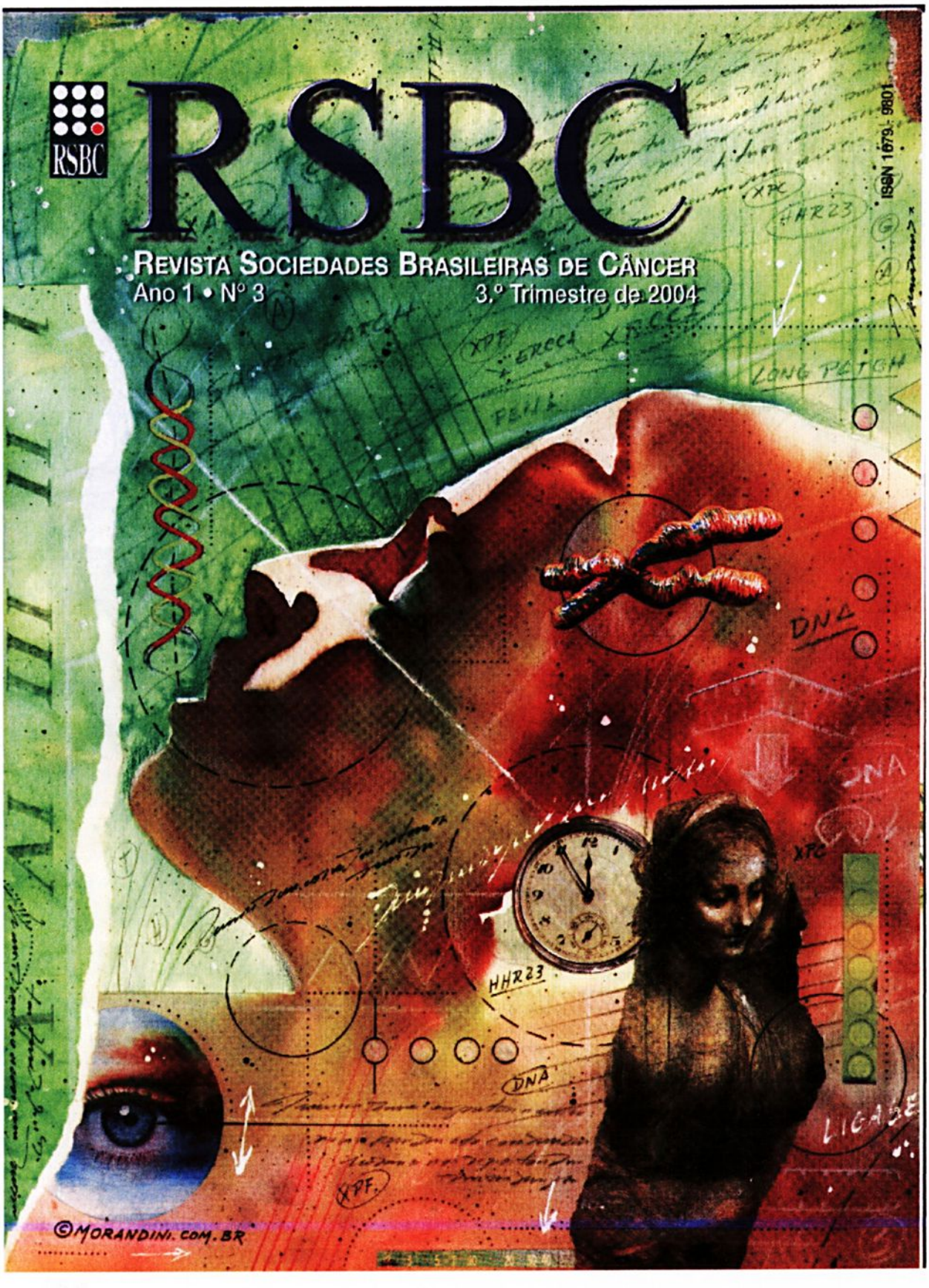
b) determinar estes mesmos parâmetros em indivíduos com adenocarcinoma gástrico e gastrite crônica e verificar a ocorrência de associação destes polimorfismos com estas lesões;

c) avaliar a interação dos polimorfismos observados nos diferentes grupos com fatores ambientais, como tabagismo, etilismo e infecção pela *H. pylori*, que estão envolvidos na etiologia do câncer gástrico.

# I I- ARTIGO DE REVISÃO:

# MECANISMOS DE REPARO DO DNA E CÂNCER

*Revista Sociedades Brasileiras de Câncer, ano 1, nº3, p.36-46, 2004*


RSBC
RSBC
REVISTA SOCIEDADES BRASILEIRAS DE CÂNCER
Ano 1 • Nº 3
3.º Trimestre de 2004
ISSN 1679-9801
DNA
HHR23
XPF
LIGASE
©MORANDINI.COM.BR

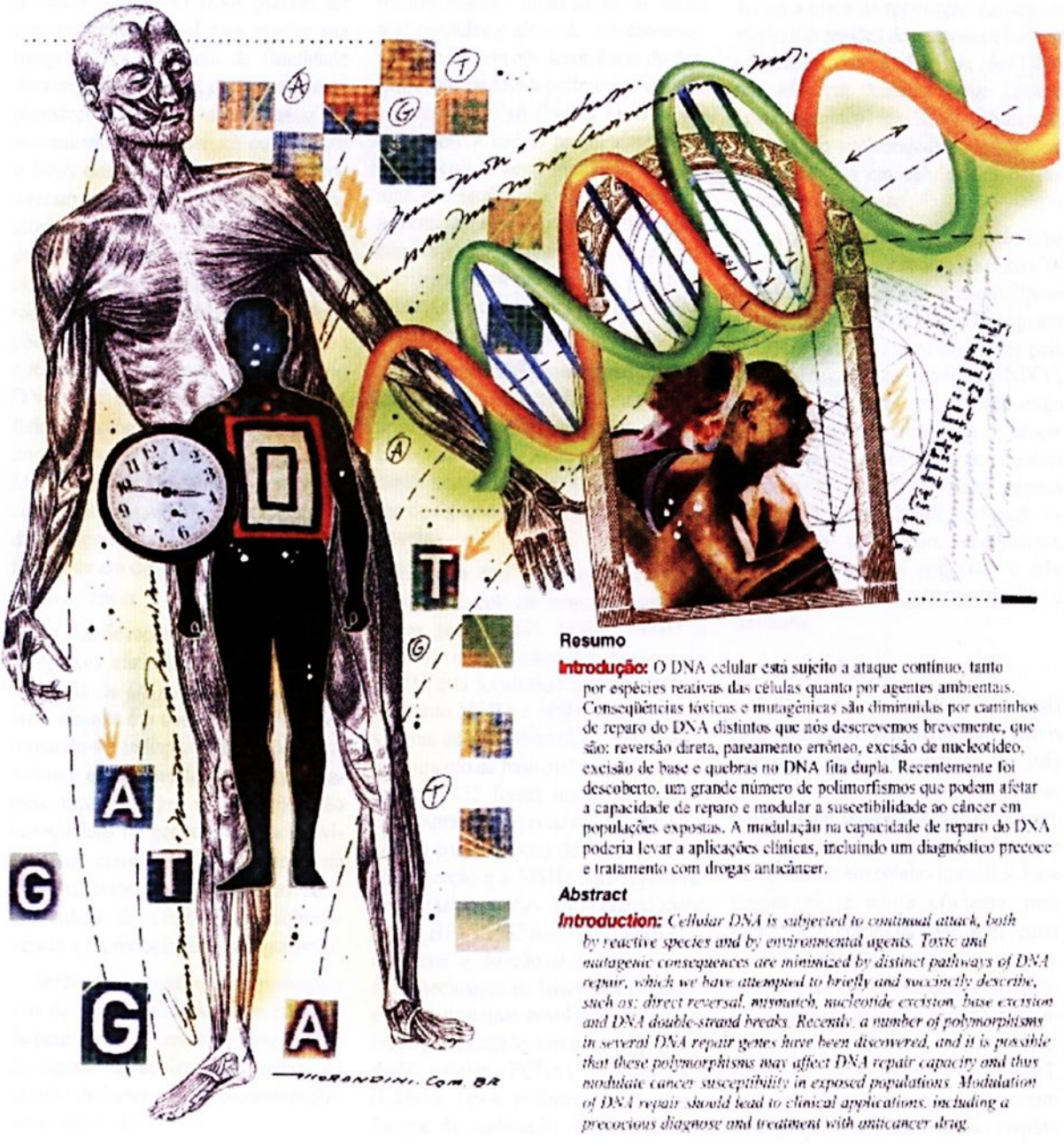
Ciência Básica

SPOC/GBOC

# Mecanismos de Reparo do DNA e Câncer

## DNA Repair Mechanisms and Cancer

Duarte, M.C.; Conforti, N.C.; Silva, A. E.




**Resumo**

**Introdução:** O DNA celular está sujeito a ataque contínuo, tanto por espécies reativas das células quanto por agentes ambientais. Conseqüências tóxicas e mutagênicas são diminuídas por caminhos de reparo do DNA distintos que nós descrevemos brevemente, que são: reversão direta, pareamento errôneo, excisão de nucleotídeo, excisão de base e quebras no DNA fita dupla. Recentemente foi descoberto, um grande número de polimorfismos que podem afetar a capacidade de reparo e modular a suscetibilidade ao câncer em populações expostas. A modulação na capacidade de reparo do DNA poderia levar a aplicações clínicas, incluindo um diagnóstico precoce e tratamento com drogas anticâncer.

**Abstract**

***Introduction:*** *Cellular DNA is subjected to continual attack, both by reactive species and by environmental agents. Toxic and mutagenic consequences are minimized by distinct pathways of DNA repair, which we have attempted to briefly and succinctly describe, such as: direct reversal, mismatch, nucleotide excision, base excision and DNA double-strand breaks. Recently, a number of polymorphisms in several DNA repair genes have been discovered, and it is possible that these polymorphisms may affect DNA repair capacity and thus modulate cancer susceptibility in exposed populations. Modulation of DNA repair should lead to clinical applications, including a precocious diagnose and treatment with anticancer drug.*

## Introdução

O genoma humano, assim como o de outros organismos, codifica informações que protegem sua própria integridade. Estas incluem não somente o reconhecimento do dano e reparo, como também a transcrição e regulação do ciclo celular[1]. O DNA precisa ser extremamente estável para manter sua integridade e alto grau de fidelidade durante a replicação e, dessa maneira, é plausível considerar a existência de mecanismos que protejam ou reparem o DNA dos danos que constantemente alteram sua estrutura. Muitas dessas alterações surgem durante o processo de replicação, recombinação e do próprio reparo em si, enquanto outras alterações provêm da instabilidade de ligações químicas específicas entre os nucleotídeos, ou ainda, da reação do DNA com uma variedade de agentes físicos, biológicos e químicos, muitos dos quais presentes no ambiente. Muitos desses são também mutagênicos, possibilitando a ocorrência de danos severos ao DNA, que podem refletir-se em distúrbios futuros graves, como o câncer.

As vias de reparo são constituídas de complexos enzimáticos que atuam na molécula de DNA para minimizar os erros durante o processo de duplicação, tornando-se indispensável o conhecimento e entendimento destes mecanismos, uma vez que as mutações são introduzidas no genoma de um indivíduo em conseqüência de danos no DNA e, deste modo, podem afetar a capacidade de crescimento, sobrevivência e reprodução de um organismo.

Serão aqui abordadas as principais vias de reparo do DNA, como o reparo de bases pareadas erroneamente, reparo de excisão de nucleotídeos, reparo de excisão de bases, reparo recombinacional e reparo direto[1].

## Mecanismo de Reparo

### 1. Reparo de pareamento errôneo:

O reparo de pareamento errôneo ou mismatch repair (MMR) corrige erros ocasionais da duplicação do DNA e também as heterologias formadas durante a recombinação[1], eliminando as bases mal pareadas e alças de deleção/inserção que surgem em decorrência do deslizamento da DNA polimerase durante a síntese de DNA (Figura 1). O MMR atua sobre a cadeia recém sintetizada. Em E. coli, a hemi-metilação da adenina em seqüências GATC fornece a informação que permite a discriminação da cadeia, sendo que os grupos metil residem na cadeia parental. Entretanto, em eucariotos, este mecanismo ainda não é bem compreendido[1].

Inicialmente os genes mutHLS foram descobertos em bactérias, sendo que os principais membros desse caminho em E. coli são MutL, MutS e MutH, juntamente com a DNA polimerase, proteínas de ligação à cadeia simples e DNA ligases.

Existem seis homólogos do gene mutS de E. coli em humanos, denominados genes MSH, MSH2, MSH3 e MSH6, encontradas no núcleo. O MSH1 está localizado na mitocôndria, enquanto MSH4 e MSH5 são parte do sistema de recombinação[2]. Para o reconhecimento da base mal pareada, a proteína MSH2 forma um heterodímero com outras duas proteínas de MMR, a MSH6 para o reparo de alças de deleção/inserção e a MSH3 para reparo de bases mal pareadas. Um heterodímero de MLH1 e PMS2 (ou MLH1 e MLH3) coordena a função do complexo de reconhecimento de bases mal pareadas e outras proteínas envolvidas no reparo como por exemplo, um fator de proliferação celular (PCNA), exonucleases (EXO1), DNA polimerases (δ e ε), fatores de replicação e helicases[3]. O complexo faz uma pequena incisão na cadeia de DNA, seguida da atividade de exonuclease, resultando em uma lacuna de 100 a 1000 nucleotídeos na cadeia com a base mal pareada. Depois, a lacuna é preenchida e o DNA é restaurado à forma correta[3].

As alterações nessa via de reparo levam a erros de replicação particularmente em regiões de microssatélite que contêm várias seqüências de DNA repetidas em "tandem", que causam "deslizamentos" da DNA polimerase, produzindo nucleotídeos mal pareados, não reparados em células deficientes desse tipo de reparo[3].

As mutações nesses genes estão relacionadas com um aumento do risco (70-85%) de câncer de cólon não-poliposo familial (HNPCC). Mutações nos genes MLH1 e MLH2 são responsáveis pela grande maioria das famílias HNPCC, enquanto mutações em MSH6 estão relacionadas à alta incidência de câncer endometrial[4]. Outros tipos de cânceres esporádicos parecem possuir alguns defeitos em genes MMR, incluindo os carcinomas de ovário, endométrio, tumores de células pequenas e não pequenas do pulmão, gástrico, cervical e de mama.

### 2. Reparo Direto

Embora a reversão direta, efetuada pelas enzimas fotoativas nos danos induzidos por UV, não tenha sido detectada em mamíferos placentários, outra forma pouco comum de reparo, envolvendo a reversão ativa da lesão está presente em células humanas. Esse mecanismo é muito eficiente, pois remove a alteração da base, sem retirar a base danificada. Isso envolve a correção da lesão $O^6$-metilguanina, produzida endogenamente, em pequenas quantidades, por catabólitos celulares reativos, levando a transições G:C A:T. Uma metiltransferase específica remove o grupo metil deletério do resíduo

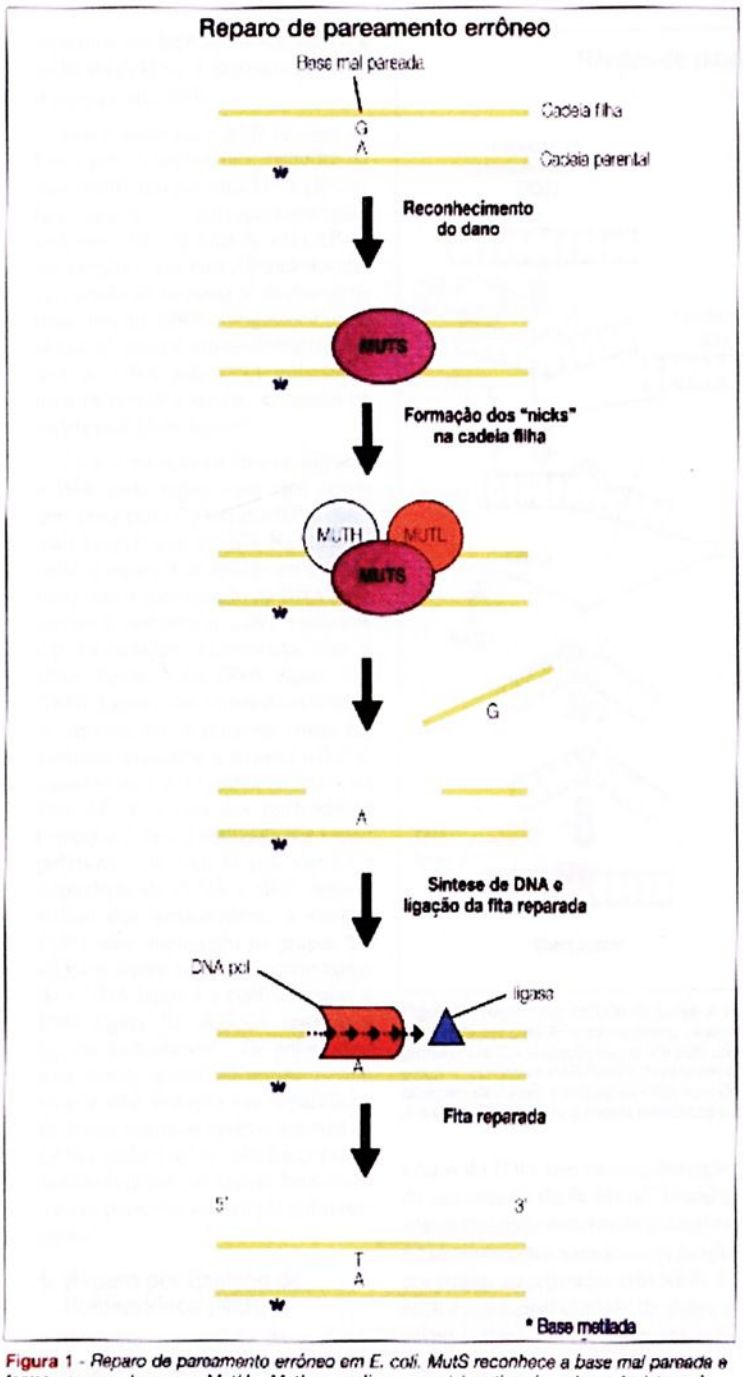



**Figura 1** - *Reparo de pareamento errôneo em E. coli. MutS reconhece a base mal pareada e forma um complexo com MutH e MutL, que clivam a cadeia retirando o dano. A síntese de DNA é feita pela DNA polimerase e a ligação do esqueleto açúcar-fosfato pela DNA ligase.*

de guanina do DNA e transfere para o seu próprio resíduo cisteína, em um processo de reparo rápido e livre de falhas. Esse sistema remove tais erros raros, mas altamente mutagênicos a um custo energeticamente alto, pois uma molécula inteira da proteína é sacrificada para cada lesão corrigida[7]. Em humanos a atividade de alquiltransferase é realizada pela O⁶-metil guanina-DNA metil transferase (MGMT). Os níveis dessa proteína em células tumorais freqüentemente correlacionam sua sensibilidade a agentes quimioterapêuticos. Níveis elevados de MGMT foram observados em câncer de ovário, rabdosarcoma, melanoma, câncer de mama, pulmão, pâncreas, cólon e cérebro[8].

## 4. Reparo por Excisão de Bases (BER)

O reparo por excisão de bases (BER) protege as células contra os efeitos deletérios dos danos induzidos endogenamente ao DNA, por hidrólise, espécies de oxigênio reativas e outros metabólitos intracelulares que modificam a estrutura das bases do DNA e também é importante para resistir a lesões produzidas por radiação ionizante e potentes agentes alquilantes[9] (Figura 2). Tais lesões no DNA são processadas em sítios abásicos ou apurínicos-apirimidínicos (AP) em procariotos e em mamíferos, sendo reparados por BER. Em E. coli, o BER consiste de um caminho composto de passos enzimáticos seqüenciais, seguindo a clivagem da ligação N-glicosídica, por um evento espontâneo ou através da ação de uma DNA glicosilase. Em mamíferos, o reparo de sítios AP é geralmente iniciado pela classe II de AP endonuclease, seguido pela dRpase, DNA polimerase e finalmente DNA ligase. O BER caracteriza-se pela excisão relativamente pequena de lacunas produzidas em DNA de fita dupla, após a remoção dos sítios AP e pelo fato de que os adutos e as lesões

reparados por BER distorcem menos a molécula de DNA, comparados àqueles reparados pelo NER[6].

Resumidamente, o BER consiste de cinco passos seqüenciais: remoção da base danificada por uma DNA glicosilase, levando a um sítio apurínico/apirimidínico (AP); incisão do sítio AP na sua porção 5' por uma AP endonuclease; excisão do terminal 5' da desoxirribose fosfato (dRP), originando uma lacuna de apenas um nucleotídeo; síntese de DNA pela DNA polimerase para preencher a lacuna; e ligação da cadeia pela DNA ligase[19].

Após a remoção da base danificada, o BER pode seguir duas vias, sendo uma mais curta ("short patch") e outra mais longa ("long patch"). Na via mais curta, o reparo é de apenas um nucleotídeo com a participação da DNA polimerase β, que remove a dRP e adiciona um nucleotídeo, terminando com a DNA ligase 1 ou DNA ligase III/ XRCC1 para selar o corte da cadeia[3, 11]. A segunda via, é proposta como um caminho secundário e envolve o deslocamento de 2 a 13 bases ao redor do sítio AP. A síntese dos nucleotídeos correspondentes é realizada por várias polimerases (δ e/ou ε) cuja função é dependente de PCNA e RFC. Após a adição dos nucleotídeos, a enzima FEN1 atua removendo os grupos 5'-dRP e o reparo completo ocorre quando a DNA ligase I e possivelmente, a DNA ligase III/ XRCC1 restaura a ligação fosfodiéster[3, 6]. Os polimorfismos nesses genes de reparo podem levar a uma variação nas capacidades de defesa contra os agentes danosos do DNA e podem ser de relevância para o desenvolvimento do câncer, bem como para os pacientes sob terapia quimioterápica[2].

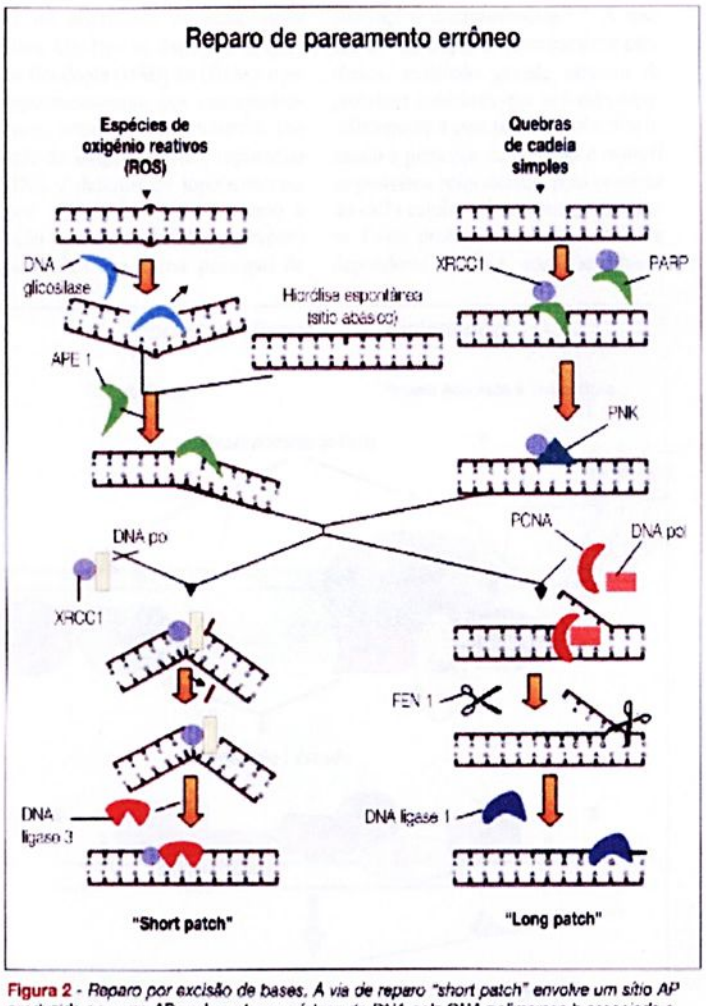



**Figura 2** - *Reparo por excisão de bases. A via de reparo "short patch" envolve um sítio AP produzida por uma AP endonuclease, síntese de DNA pela DNA polimerase b associada a proteína XRCC1 e ligação da cadeia pelo complexo DNA ligase III/XRCC1. Na via "long patch" o complexo PARP/XRCC1 reconhece o dano na cadeia de DNA, seguido pela clivagem da cadeia e síntese de DNA pela DNA polimerase δ ou ε dependente de PCNA. A enzima FEN 1 libera a cadeia danificada e a DNA ligase I sela a cadeia.*

## 4. Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER)

O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) remove principalmente adutos do DNA que causam distorção da estrutura da dupla hélice[2]. Grandes adutos incluindo dímeros de pirimidina e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos podem ser reparados pelo NER[2]. O NER é o principal caminho de reparo e envolve cinco passos, iniciando pelo reconhecimento do dano ao DNA, dupla incisão sobre a cadeia danificada, remoção do segmento de DNA que contém o dano, síntese de DNA e por último, ligação da cadeia[4] (Figura 3).

O reconhecimento do dano é feito por um complexo protéico com a XPA e a proteína A de replicação (RPA). Em seguida, esse complexo interage com o

complexo fator 2H de transcrição, composto por ERCC3 e ERCC2, que está associado com a transcrição e contém a atividade helicase. Por fim, atuam duas nucleases, ERCC1-XPF e XPG, que compreendem as subunidades restantes da exonuclease. A incisão ocorre, quando o complexo da exonuclease cliva a cadeia de DNA danificada à posição 5'e 3' do aduto e requer uma abertura da dupla fita de DNA realizada por membros do complexo. Por sua vez, a clivagem é observada quando a porção ERCC1-XPF atua sobre o esqueleto fosfodiéster a 5' da lesão. A localização da incisão depende do aduto e ocorre entre 16 e 25 ligações fosfodiéster a 5' do aduto. A porção XPG corta o DNA na posição 3' da lesão e ocorre entre 2 a 9 ligações fosfodiéster sobre o lado 3' do aduto. Apesar da lesão, as características estruturais da exonuclease, limita o tamanho global do fragmento em 26 a 27 nucleotídeos. A síntese de DNA e o reparo estrutural são feitos pela DNA polimerase δ e ε, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), o fator de replicação C (RFC), a DNA ligase e outras proteínas. Os RFC e PCNA, auxiliam na ligação da polimerase no DNA, que adiciona os nucleotídeos complementares ao grupo 3'- OH livre. Depois, a DNA ligase sela a incisão, restaurando a hélice intacta[1].

Deficiências do NER pode originar três doenças humanas geneticamente heterogêneas: o xeroderma pigmentoso (XP), com sete grupos de complementação genética (XPA-XPG), síndrome de Cockayne, com dois grupos de complementação (CS-A e CS-B) e tricotiodistrofia (TTD), com três grupos de complementação, TTD-A, XP grupo D e XP grupo B.

## 5. Reparo de quebras no DNA fita dupla

Os cromossomos sofrem uma série de tipos de danos que podem resultar em perda ou alterações da informação genética. Um tipo de dano é o de quebra de fita dupla (DSB) do DNA, surgida espontaneamente por mecanismos celulares, como aqueles induzidos por radicais de oxigênio livres, replicação do DNA e defeitos na topoisomerase ou por agentes genotóxicos como a radiação ionizante. A falta de reparo nessas lesões é a causa principal de aberrações cromossômicas[13, 15]. A quebra de fita dupla é extremamente citotóxica, existindo grande número de proteínas nucleares que se ligam especificamente a esse tipo de lesão, sinalizando a presença de tal dano e instruir as proteínas responsáveis pelo controle do ciclo celular sobre o perigo iminente. Essas proteínas incluem a quinase dependente de DNA, com sua subuni-

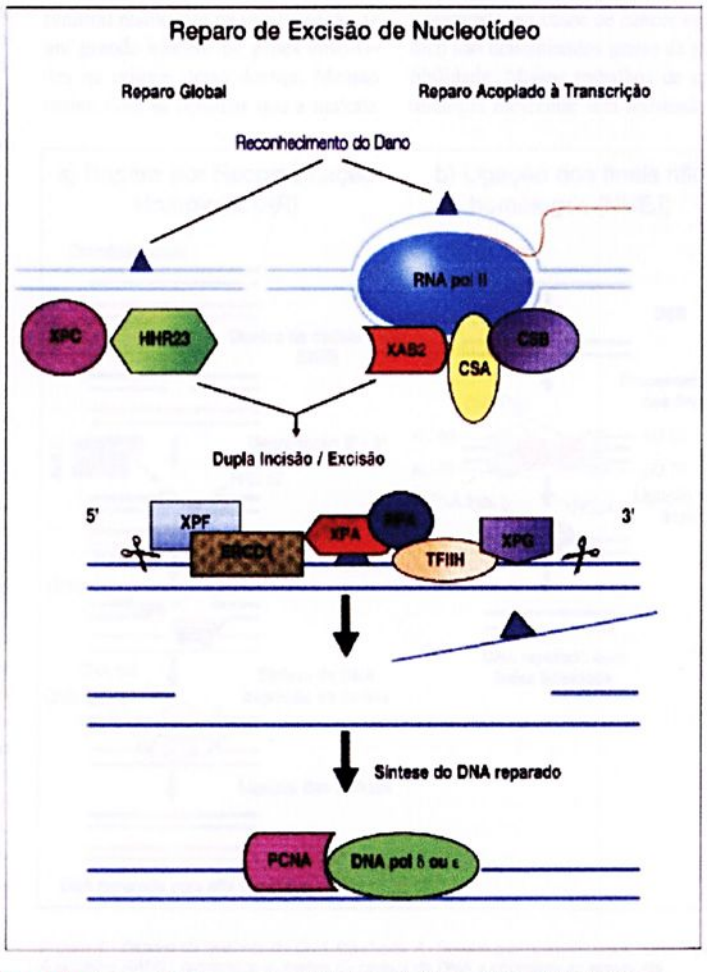



**Figura 3** - *As duas vias do reparo de excisão de nucleotídeos – Reparo Global e Reparo Acoplado à Transcrição. Estas vias iniciam-se pelo reconhecimento do dano ao DNA seguido pela dupla incisão/excisão da cadeia através de um complexo enzimático e síntese pela DNA polimerase d ou e dependente de PCNA.*

dade Ku, outras quinases como ATM e ATR, PARP, a exonuclease RAD50 MRE11-p95, o heterodímero DNA ligase IV/ XRCC4 e RAD527. Em mamíferos, existem duas vias principais para o reparo de quebras de fita dupla: o reparo homólogo (RH) (Figura 4A) e o reparo por ligação das extremidades não homólogas (NHEJ) (Figura 4B). Durante o RH, a seqüência homóloga forma um pareamento, com o uso da cromátide irmã do cromossomo homólogo como molde para o evento do reparo[9]. Após o reconhecimento da quebra, ocorre a degradação da porção danificada e o deslocamento da cromátide irmã para o sítio a ser reparado. A cromátide serve como molde para a síntese de DNA, restaurando a seqüência original anterior ao dano, fazendo desse tipo de reparo um evento preciso, livre de erros.

Durante o NHEJ, o dano é eliminado por mecanismos que envolvem a religação direta das extremidades quebradas, sem a permuta de seqüências homólogas fornecidas por um cromossomo ou cromátide intacta. Esse mecanismo é capaz de converter terminais de DNA não complementares em junções covalentemente seladas por reações que incluem a síntese de DNA, degradação exonucleolítica, ligação e anelamento de seqüências contendo porções de homologia. Isso freqüentemente leva a mudanças características da seqüência original no sítio de quebra, gerando substituição de bases, deleções e inserções. Assim sendo, o NHEJ é um processo mutagênico que pode causar aberrações cromossômicas, doenças genéticas e câncer. Por outro lado, o estabelecimento de um rearranjo genético na linhagem germinativa pode fornecer oportunidades evolucionárias para as espécies[12].

## Polimorfismos de genes envolvidos no reparo do DNA

Os sistemas de reparo do DNA são responsáveis por manter a integridade do genoma de células somáticas e germinativas, minimizando erros de replicação, removendo danos do DNA e reduzindo rearranjos deletérios surgidos por recombinação aberrante, sendo importantes na proteção do genoma contra mutações que levam ao câncer e outras doenças herdáveis ou degenerativas[2].

Estudos de câncer hereditário ou familial resultaram na identificação de um grande número de genes envolvidos na origem dessa doença. Mesmo assim, deve-se ressaltar que a maioria dos casos de câncer é esporádica e não familial. No caso de cânceres esporádicos, na ausência de outros fatores de risco conhecidos, a existência de um parente de primeiro grau com a doença é um fator de risco muito significante, sugerindo que a variação genética é um elemento chave na suscetibilidade ao câncer na maioria dos indivíduos[11].

Os genes associados com o risco aumentado em casos de câncer esporádico são denominados genes de suscetibilidade. Muitos trabalhos de epidemiologia molecular têm mostrado que

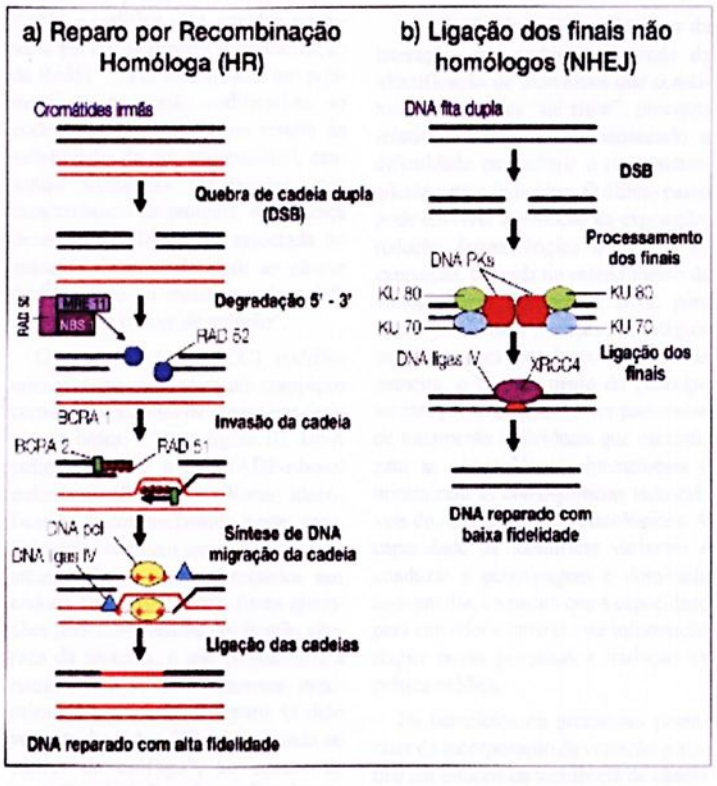



**Figura 4** - *Reparo de quebras do DNA fita dupla. A- Reparo por recombinação homóloga. A proteína RAD51 reconhece a quebra da cadeia de DNA e coordena as etapas de degradação 5'-3' e de invasão da cadeia da cromátide homóloga. Esta serve como molde para síntese da cadeia quebrada pela DNA polimerase. B- Reparo por ligação das extremidades não homólogas. O complexo formado pelas DNA PKs e as proteínas Ku70 e Ku80 realiza o processamento das extremidades quebradas, enquanto a DNA ligase IV realiza a ligação das cadeias.*

variantes alélicas em vários loci estão associadas a um aumento de várias vezes no risco de câncer induzido por agentes ambientais, e que também a capacidade reduzida de reparo do DNA constitui outro fator significante de risco.

Vários polimorfismos em genes de reparo do DNA foram identificados e parte deles, em seqüências conservadas evolutivamente. Muitos resultaram em substituições de aminoácidos, sugerindo uma possível função na manutenção da função protéica normal[15].

Os polimorfismos na via de reparo de pareamento incorreto (MMR) estão intimamente relacionados com o câncer coloretal não poliposo hereditário, principalmente os polimorfismos dos genes MSH2, MLH1, MSH6, PMS1 e PMS2. A perda de função desses genes causa instabilidade de microssatélite, que adquire pequenas unidades repetidas em tandem, resultando na falta de correção de erros surgidos durante a replicação do DNA[3]. Outros cânceres esporádicos também apresentam defeitos em genes do MMR, incluindo ovário, endométrio, célula pequena e não pequena de pulmão, os carcinomas pancreático, gástrico, cervical e de mama[3].

Níveis elevados da proteína O⁶-metilguanina DNA metiltransferase (MGMT), que participa da via de reparo direto, foram detectados em câncer de ovário, rabdomiosarcoma, melanoma, câncer de mama, pulmão, pâncreas, cólon e tumores de cérebro.

Uma estrita conexão entre defeitos no reparo de quebras de fita dupla (DSB) no DNA e tumorigênese foi encontrada nos genes de suscetibilidade ao câncer de mama e de ovário hereditário, BRCA1 e BRCA2. As famílias com mutações nesses genes mostram um padrão de herança autossômica dominante para a suscetibilidade[3]. Várias síndromes que predispõem ao câncer, como a ataxia telangiectasia e a síndrome de Nijmegen são caracterizadas por instabilidade cromossômica e sensibilidade a agentes que causam quebras no DNA. Estudos sobre genes envolvidos nesta via verificaram que a presença de alguns polimorfismos aumentava o risco de desenvolver câncer de mama, dentre eles o XRCC2 e XRCC3, enquanto o polimorfismo de Lig4 foi associado com uma diminuição do risco[15].

O gene XRCC3 é membro de uma família de proteínas relacionadas a Rad51 e codifica uma proteína necessária para a montagem e estabilização da Rad51[3,5]. Foi identificado um polimorfismo na região codificadora no códon 241 deste gene que resulta na substituição de um aminoácido[5], causando mudanças substanciais nas características da proteína. A presença desse polimorfismo foi associada ao aumento da suscetibilidade ao câncer de bexiga[16] e ao melanoma de pele[36], mas não em câncer de pulmão[21].

O gene humano XRCC1 codifica uma proteína que forma um complexo com outras enzimas de reparo por excisão de bases, a DNA ligase III, DNA polimerase β e a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP)[22-23,34]. Foram identificados 5 polimorfismos neste gene. Três deles resultam em substituição de aminoácidos e foram detectados nos códons 194, 280 e 399[15]. Essas alterações poderiam resultar em função alterada da proteína, o que prejudicaria a reunião com as outras enzimas, minimizando o processo de reparo. O alelo variante do códon 399 foi associado ao câncer de esôfago[18], ao câncer de mama[24], pulmão[29], estômago[31], cabeça e pescoço[38], entre outros. A variante do códon 194 foi associado com um risco aumentado de câncer de mama.

Os grandes adutos, induzidos no DNA por carcinógenos químicos do cigarro, são reparados através da excisão de nucleotídeos que inclui o gene XPD. Uma variante XPD no éxon 23, que leva a uma substituição de aminoácido, foi associada com capacidade de reparo reduzida[42]. A proteína XPD trabalha como uma helicase 5'-3' dependente de ATP, junto ao fator de transcrição basal II H (TFIIH). A substituição Lys751Gln foi associada com níveis aumentados de adutos DNA-PAH em grupos com câncer de mama, comparados aos indivíduos saudáveis[39].

## Perspectivas futuras

A redução do impacto do risco da interação gene-ambiente depende da identificação de indivíduos que constituem populações "de risco", processo relativamente fácil, permanecendo a dificuldade em reduzir o risco subseqüente para o indivíduo. O último passo pode envolver a remoção da exposição, redução farmacológica do efeito da exposição, baseada no entendimento da biologia e/ou observação ativa, para identificar e tratar doenças nos estágios mais precoces possíveis. Da mesma maneira, o conhecimento do genótipo tornará possível desenvolver protocolos de tratamento individuais que maximizam as conseqüências intencionais e minimizam as conseqüências indesejáveis dos tratamentos farmacológicos. A capacidade de identificar variantes e conduzir a genotipagem é dominada hoje em dia, enquanto que a capacidade para entender e utilizar essa informação requer novas pesquisas e tradução na prática médica.

Os benefícios ou promessas potenciais da incorporação da variação genética em estudos da incidência de câncer e modelos de estimativa dos riscos incluem: decisões racionais para trabalhar, tentando minimizar a exposição e risco de indivíduos suscetíveis; melhor estimativa do risco da doença na população, resultando em exposições definidas e regulações cientificamente váli-

das; detecção precoce de doenças que, sabidamente aumentam a observação de indivíduos em risco, resultando em um aumento da resposta ao tratamento; e entender melhor o processo da doença levando a tratamentos novos e melhorados.

A variação na capacidade de reparar o DNA é um fator na suscetibilidade ao câncer e é um paradigma para as promessas de estimar os riscos individuais e da população. Os benefícios potenciais para a pesquisa e o cuidado com a saúde são enormes. Essas mesmas oportunidades demandam desafios para a comunidade científica e sociedade para garantir que todos os indivíduos compartilhem da aplicação frutífera da tecnologia e do conhecimento[1].

## Referências Bibliográficas


1. Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M, Slupphaug G. Base excision repair of DNA in mammalian cells. *Febs Lett* 2000; 476:73-7.
2. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science* 2001; 291:1284 – 1289.
3. Hansen WK & Kelley MR. Review of mammalian DNA repair and translational implications. *The J Pharmal Exp Therapeutics* 2000; 295(1):1-9.
4. Drummond JT & Bellacosa A. Human DNA mismatch repair in vitro operates independently of methylation status at CpG sites. *Nucleic Ac Res* 2001; 29(11):2234-43.
5. Peltomaki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res* 2001; 488:77-85.
6. Wu J, Gu L, Wang H, Geacintov NE, Li GM. Mismatch repair processing of carcinogen-DNA adducts triggers apoptosis. *Mol Cellular Biol* 1999; 19(12):8292-301.
7. Vuuren AJ, Appeldoorn E, Odijk H, Humbert S, et al. Partial characterization of the DNA repair protein complex, containing the ERCC1, ERCC4, ERCC11 and XPF correcting activities. *Mutat Res* 1995; 337:25-39.
8. Lindahl T & Wood D. Quality control by DNA repair. *Science* 1999; 286:1898-1905.
9. Seeberg E, Eide L, Bjoras M. The base excision repair pathway. *Tibs – Review* 1995; 20:201-207.
10. Wilson SH. Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta. *Mutat Res* 1998; 407:203-215.
11. Iwanaga A, Ouchida M, Miyazaky K, Hori K, Mukay T. Functional mutation of DNA polymerase B found in human gastric cancer – inability of the base excision repair in vitro. *Mutat Res* 1999; 435:121-8.
12. Lindahl T. Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. *Mutat Res* 2000; 462:129-35.
13. Pfeiffer P, Gottlich B, Reichenberger S, Feldmann E, et al. DNA lesions and repair. *Mutat Res* 1996; 366:69-80.
14. Pierce AJ, Stark JM, Araujo FD, Moynahan ME, et al. Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends In Cell Biology – Review* 2001; 11(11):52-59.
15. Mohrenweiser HW, Jones IM. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation? *Mutat Res* 1998; 400:15-24.
16. Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 1998; 58:604-8.
17. Kuschel B, Auranen A, Mcbride S, Novik K, et al. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Human Mol Genet* 2002; 11(2):1399-1407.
18. Matullo G, Guarrera S, Carturan S, Peluso M, et al. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *J J Cancer* 2001; 92:562-7.
19. Cui X, Brenneman M, Meyne J, Oshimura M, Goodwin EH, Chen DJ. The XRCC2 and XRCC3 repair genes are required for chromosome stability in mammalian cells. *Mutat Res* 1999; 434:75-88.
20. Brenneman MA, Weiss AE, Nickoloff JA, Chen DJ. XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination. *Mutat Res* 2000; 459:89-97.
21. Winsey SL, Haldar NA, Marsh HP, Bunce M, et al. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res* 2000; 60:5612-16.
22. David-Beabes GL, Lunn RM, London SJ. No association between the XPD (Lys751Gln) polymorphism or the XRCC3 (Thr241Met) polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidem Biom Prev* 2001; 10:911-2.
23. Shen H, Xu Y, Yu R, Qin Y, et al. Polymorphism of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *J J Cancer* 2000; 88:601-6.
24. Stern MC, Umbach DM, Van-Gils CH, Lunn RM, Taylor JA. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol, Biom & Prev* 2001; 10:125-31.
25. Lee JM, Lee YC, Yang SY, Yang PW, et al. Genetic polymorphism of XRCC1 and risk of esophageal cancer. *J J Cancer* 2001; 95:240-6.
26. Smitha TR, Millera MS, Lohmane K, Langee EM, et al. Polymorphisms of XRCC1 and XRCC2 genes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Lett* 2003; 190 (2):183-190.
27. Duell EJ, Wiencke JK, Cheng T-J, Varkonyi A, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 2000; 21:965-71.
28. Divine KK, Gilliland FD, Crowell RE, Stidley CA, et al. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat Res* 2001; 461:273-8.
29. Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, et al. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 1999; 20:2125-9.
30. Tang D, Cho S, Rundle A, Chen S, et al. Polymorphisms in the DNA repair enzyme XPD are associated with increased levels of PAH-DNA adducts in a case-control study of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 75(2):159-166.



**Autores**

**Márcia Cristina Duarte**
Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética, Ibilce-UNESP, São José do Rio Preto – SP

**Nivea Dulce Conforti**
Mestra e Doutora em Genética, Pós Doutorado na Universidade do Texas – EUA. Coordenadora do Laboratório de Epidemiologia Molecular do Ibilce-UNESP, São José do Rio Preto – SP.

**Endereço para correspondência:**
e-mail: duartebio@hotmail.com

# III – SHORT COMMUNICATION: POLYMORPHISMS OF THE DNA REPAIR GENES *XRCC1* AND *XRCC3* IN A BRAZILIAN POPULATION

***Genetics and Molecular Biology, submetido em 22 de dezembro de 2004***

**Polymorphisms of the DNA repair genes *XRCC1* and *XRCC3* in a Brazilian population**

Márcia Cristina Duarte

MSc in Genetics, UNESP- São Paulo State University, Department of Biology, São José do Rio Preto - SP, Brazil.

Jucimara Colombo

MSc in Genetics, UNESP- São Paulo State University, Department of Biology, São José do Rio Preto - SP, Brazil.

Andréa Regina Baptista Rossit

PhD in Genetics, Adjunct Professor, FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Center for Microorganism Investigation, São José do Rio Preto, SP, Brazil

Ana Elizabete Silva

PhD in Genetics, Adjunct Professor, UNESP- São Paulo State University, Department of Biology, São José do Rio Preto - SP, Brazil.

Running title: *XRCC1* and *XRCC3* genetic variants

Key words: DNA repair, *XRCC1*, *XRCC3*, polymorphism, ethnic variability

Send correspondence to Ana Elizabete Silva, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brazil. CEP 15054-000. Phone: +55 (17) 221 2384.

E-mail: anabete@ibilce.unesp.br

**Abstract**

In several DNA repair genes, polymorphisms may result in reduced repair capacity, which has been implicated as a risk factor for various types of cancer. The frequency of the polymorphic alleles varies among populations, suggesting an ethnic distribution of genotypes. We genotyped 300 healthy Brazilian individuals for polymorphisms of codons 194 and 399 of the *XRCC1* gene and of codon 241 of the *XRCC3* gene, which participate in the base excision repair and homologous recombination repair pathways, respectively. The allele frequencies of Arg194Trp and Arg399Gln in the *XRCC1* gene and of Thr241Met in the *XRCC3* gene were 0.07, 0.33 and 0.35, respectively. These frequencies were compared with those obtained for different populations from several countries, evidencing ethnic variability.

## Introduction

Different DNA repair systems maintain the integrity of the human genome through the removal of DNA damage induced by endogenous and environmental sources (Christmann *et al.*, 2003). A deficiency in the repair capacity due to mutations in genes involved in DNA repair can lead to genomic instability that, in turn, is related to chromosomal instability syndromes and carcinogenesis (Hansen and Kelley, 2000). DNA polymorphisms can result in a subtle structural alteration of the repair enzymes, so individuals with a repair capacity below the mean of population can be at an increased risk of developing different kinds of cancer (Mohrenweiser and Jones, 1998)

Shen *et al.* (1998) first reported several polymorphisms in five DNA repair genes (*XPD, XPF, ERCC1, XRCC1* and *XRCC3*) representing three different repair pathways. Later on, other studies reported different polymorphisms in DNA repair genes, such as *XPA, XPB, XPC* and *hOGG1* (Ishida *et al.*, 1999; Butkiewicz *et al.*, 2000; Chavanne *et al.*, 2000).

The human genes *XRCC1* and *XRCC3* (X-Ray Repair Cross Complementing family) have been identified by their ability to restore DNA repair activity in Chinese hamster ovary (CHO) mutant cell lines EM9 (Thompson *et al.,* 1990) and irs1SF (AA8) (Fuller and Painter, 1988), respectively. The protein XRCC1 plays a role in base excision repair (BER), interacts with DNA ligase III and complexes with DNA polymerase β and PARP (poly ADP-ribose polymerase). These interactions may facilitate the repair of DNA strand breaks and damage caused by ionizing radiation, oxidative damage and non-bulky adducts (Dianov *et al.*, 2003). Shen *et al.* (1998) identified three polymorphisms in the *XRCC1* gene at conserved sequences, resulting in amino acid substitutions at codons 194 (Arg194Trp), 280 (Arg280His) and 399 (Arg399Gln), at reported allele frequencies of 0.25, 0.08 and 0.25, respectively.

Many authors analyzed these polymorphisms in human populations and found a significant correlation between the Arg194Trp polymorphism and risk of early-onset

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

colorectal carcinoma (Abdel-Rahman *et al.*, 2000), gastric cardia cancer (Shen *et al.*, 2000), head and neck cancer (Olshan *et al.*, 2002) and skin cancer (Han *et al.*, 2004). The Arg399Gln polymorphism is more frequent and was also associated with early-onset colorectal carcinoma (Abdel-Rahman *et al.*, 2000) and gastric cardia cancer (Shen *et al.*, 2000), besides breast cancer (Duell *et al.*, 2001), lung cancer (Zhou *et al.*, 2003) and esophageal cancer (Yu *et al.*, 2004), among others.

The product of the *XRCC3* gene functions in the homologous recombination repair (HRR) for double-strand breaks (DSBs) and cross-link repair in mammalian cells (Dianov *et al.*, 2003). During HRR, the XRCC3 protein interacts with Rad51C and possibly with Rad51 itself, enabling Rad51 protein multimers to assemble at the site of damage (Brenneman *et al.*, 2002). A common polymorphism in exon 7 of the *XRCC3* gene results in an amino acid substitution at codon 241 (Thr241Met) that may affect the enzyme's function. The *XRCC3* variant allele has been identified in healthy individuals, at a frequency ranging from 0.23 to 0.38 (Shen *et al.*, 1998; David-Beabs *et al.*, 2001).

Molecular epidemiological studies have shown that the Thr241Met variant is associated with increased risk of melanoma (Winsey *et al.*, 2000), bladder cancer (Matullo *et al.*, 2001), breast cancer (Smith *et al.*, 2003) and lung cancer (Jacobsen *et al.*, 2004).

The frequencies of polymorphisms of both metabolic and repair enzymes are distinct in different ethnic groups (Kato *et al.*, 1992; Stephens *et al.*, 1994; Lunn *et al.*, 1999; Abdel-Rahman *et al.*, 2000). Thus, we conducted a study to estimate the frequency of the variants Arg194Trp and Arg399Gln in the base excision repair gene *XRCC1* and Thr241Met in the homologous recombination repair gene *XRCC3*, in healthy individuals from a Southeastern Brazilian population. As far as we know, this is the first study carried out to evaluate XRCC1 and XRCC3 polymorphisms in a Brazilian population.



## Material and Methods

About 5 mL of whole blood were collected from three hundred healthy individuals (164 males and 136 females) from São José do Rio Preto, State of São Paulo, Southeastern Brazil, with a mean age of 52 years (ranging from 19 to 93 years). After a visual and interviewed-based classification, this population was ethnically classified into Caucasians (262) and Negroids (38).

This study was approved by the National Research Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all individuals.

DNA was extracted as described by Abdel-Rahman *et al.* (1994). *XRCC1* genotypes for codons 194 and 399 were detected using multiplex PCR-RFLP, as previously described (Abdel-Rahman *et al.* 2000) with modifications, to amplify the 491bp and 615bp fragments, respectively. Codon 241 of the *XRCC3* gene was genotyped by a PCR-RFLP technique, as described by David-Beabs *et al.* (2001) with modifications. The amplified fragments of codons 194 and 399 of the *XRCC1* gene and of codon 241 of the *XRCC3* gene were digested with the restriction enzymes *Msp*I and *Nla*III, respectively, and resolved on 2% 1000 agarose gel (Invitrogen, Brazil).

Statistical analyses were performed using the Statidisk computer software program. The chi-square test was utilized to compare the genotype frequencies and factors such as gender and ethnicity. The 0.05 probability level (p) was used as criterion of significance.

## Results and Discussion

Table 1 shows the frequency distributions of the *XRCC1* and *XRCC3* genotypes in healthy individuals from Southeastern Brazil and compares these frequencies with those previously published for different ethnic groups. For the *XRCC1* gene, the allele frequencies of the 194Trp and 399Gln polymorphisms were 0.07 and 0.33, respectively, whereas for the



241Met polymorphism of the *XRCC3* gene the frequency was 0.35. Figure 1 shows the banding patterns of the *XRCC1* (A) and *XRCC3* (B) polymorphisms.

Considering the variables gender and ethnicity, no statistically significant differences were observed with respect to the genotype frequencies (Table 2). According to the literature, it seems that the genotype distribution of *XRCC1* and *XRCC3* does not vary between gender, but differences among ethnic groups are suggested (Lunn *et al.*, 1999; Abdel-Rahman *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2000).

In this study, the allele frequencies of the 194Trp polymorphism in Caucasians (0.07) and Negroids (0.09) were the same as those previously published for 96 healthy Brazilian individuals from the same region of the country (Rossit *et al.*, 2002). Likewise, our results are in accordance with those observed for American Caucasians (Lunn *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2003) and African Americans residing in North Carolina (Lunn *et al.*, 1999) and for the Egyptian population (Abdel-Rahman *et al.*, 2000), but not with the frequencies reported for Taiwanese (0.27) (Lunn *et al.*, 1999), Chinese (0.35) (Shen *et al.*, 2000) and that described by Shen *et al.* (1998) in twelve healthy individuals (0.25).

The frequency of the allele 399Gln (*XRCC1*) in Caucasians (0.34) found in the current study was comparable with that described by Rossit *et al.* (2002) in a group of Brazilian white individuals, in North American Caucasians (Lunn *et al.*, 1999; David-Beabs and London, 2001; Smith *et al.*, 2003) and in Italy (Matullo *et al.*, 2001). However, this frequency was higher than that reported for Taiwanese (0.26) (Lunn *et al.*, 1999), Chinese (0.26) (Shen *et al.*, 2000), Korean (0.22) (Park *et al.*, 2002) and Egyptian (0.14) (Abdel-Rahman *et al.*, 2000) populations. In Negroids, although the difference observed was not significant, the allele frequency was lower (0.26) than that of Caucasians, but higher than that described in African Americans (0.17) (Lunn *et al.*, 1999) and 0.18 (David-Beabs and London, 2001).



Data from our study on Brazilian individuals showed that the allele frequency of the *XRCC3* 241Met polymorphism was similar in Caucasians (0.36) and Negroids (0.31). These frequencies were comparable with that observed in Italian (Matullo *et al.*, 2001) and North American studies (David-Beabs *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003), but higher than that observed in African American (David-Beabs *et al.*, 2001) and Chinese (Shen *et al.*, 2004) populations.

The Brazilian population is very heterogeneous, as a result of mating between different ethnic groups, including native Indians and immigrants from Europe, Africa and Asia. Our results are in accordance with this fact, since no significant difference was found between the Brazilian individuals of both ethnic groups, while there are differences in the allele frequencies compared to other populations, mainly Taiwanese, Chinese and Egyptian. Thus, hybridization plays an important role in the genotype distribution and, as Brazil is a large country, there can be differences in this distribution among different States, according to the origin of the immigrants which settled in each one of them.

Our study describes for the first time both allele frequencies of the *XRCC1* and *XRCC3* polymorphisms in a Southeastern Brazilian population. The differences observed with regard to other populations emphasize the role of ethnic variability in the allelic distribution of the *XRCC1* and *XRCC3* genes and reinforce the importance of further studies on polymorphisms of DNA repair genes that may play an important role in cancer susceptibility in different populations.

**Acknowledgments**

This study was supported by CAPES.

**References**

Abdel-Rahman SZ, Nouraldeen AM and Ahmed AE (1994) Molecular interaction of 2,3-[14C]-acrylonitrile with DNA in gastric tissues of rat. J Biochem Toxicol 9:121-128.

Abdel-Rahman SZ, Soliman AS, Bondy ML, Omar S, El-Badawy SA, Khaled HM, Seifeldin IA and Levin B (2000) Inheritance of the 194*Trp* and the 399*Gln* variant alleles of the DNA repair gene *XRCC1* are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. Cancer Lett 159:79-86.

Brenneman MA, Wagener BM, Miller CA, Allen C and Nickoloff JA (2002) XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. Mol Cell 10:387-395.

Butkiewicz D, Rusin M, Harris CC and Chorazy M (2000) Identification of four single-nucleotide polymorphisms in the DNA repair genes: *XPA* and *XPB (ERCC3)* in Polish population. Hum Mutat 15:577-578.

Chavanne F, Broughton BC, Pietra D, Nardo T, Browitt A, Lehmann AR and Stefanini M (2000) Mutations in the *XPC* gene in families with xeroderma pigmentosum and consequences at the cell, protein and transcript levels. Cancer Res 60:1974-1982.

Christmann M, Tomicic MT, Roos WP and Kaina B (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. Toxicology 193(1-2):3-34.

David-Beabs GL, Lunn RM and London SJ (2001) No association between the XPD (Lys751Gln) polymorphism or the XRCC3 (Thr241Met) polymorphism and lung cancer risk. Cancer Epidemiol Biomark Prev 10:911-912.

David-Beabs GL and London SJ (2001) Genetic polymorphism of *XRCC1* and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians. Lung Cancer 34:333-339.

Dianov GL, Sleeth KM, Dianova II and Allinson SL (2003) Repair of abasic sites in DNA. Mut Res 531:157-163.



Duell EJ, Wiencke JK, Cheng T-J, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TDS, Mark EJ, Wain JC, Christiani DC and Kelsey KT (2001) Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. Carcinogenesis 21:965-971.

Fuller LF and Painter RB (1988) A Chinese hamster ovary cell line hypersensitive to ionizing radiation and deficient in repair replication. Mut Res 193:109-121.

Han J, Hankinson SE, Colditz GA and Hunter DJ (2004) Genetic variation in *XRCC1*, sun exposure, and risk of skin cancer. Brit J of Cancer 91:1604-1609.

Hansen WK and Kelley MR (2000) Review of mammalian DNA repair and translational implications. JPET 295(1):1-9.

Ishida T, Takashima R, Fukayama M, Hamada C, Hippo Y, Fuji T, Moriyama S, Matsuba C, Nakahori Y, Morita H, Yazaki Y, Kodama T, Nishimura S and Aburatani H (1999) New DNA polymorphisms of human MMH/OGG1 gene: prevalence of one polymorphism among lung-adenocarcinoma patients in Japan. Int. J. Cancer 80:18–21.

Jacobsen NR, Raaschou-Nielsen O, Nexϕ B, Wallin H, Overvad K, Tjϕnneland A and Vogel U (2004) *XRCC3* polymorphisms and risk of lung cancer. Cancer Lett 213:67-72.

Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, Weston A and Harris CC (1992) Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. Cancer Res 52:6712-6715.

Lunn RM, L RG, Hsieh LL, Thompson CL and Bell DA (1999) XRCC1 polymorphisms: Effects on Aflotoxin B1-DNA adducts and Glycophorin A variant frequency. Cancer Res 59:2557-2561.

Matullo G, Guarrera S, Carturan S, Peluso M, Malaveille C, Davico L, Piazza A and Vineis P (2001) DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. Int J Cancer 92:562-567.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Mohrenweiser HW and Jones IM (1998) Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation? Mutat Res 400:15-24.

Olshan AF, Watson MA, Weissler MC and Bell DA (2002) *XRCC1* polymorphisms and head and neck cancer. Cancer Lett 178:181-186.

Park JY, Lee SY, Jeon H-S, Bae NC, Chae SC, Joo S, Kim CH, Park J-H, Kam S, Kim IS and Jung TH (2002) Polymorphism of the DNA repair gene *XRCC1* and risk of primary lung cancer. Cancer Epidemiol Biomark Prev 11:23-27.

Rossit ARB, Cabral IR, Hackel C, Silva RCMA, Froes NDTC and Abdel-Rahman SZ (2002) Polymorphisms in DNA repair gene *XRCC1* and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older Southeastern Brazilians. Cancer Lett 180:173-182.

Shen MR, Jones LM and Mohrenweiser H (1998) Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. Cancer Res 58:604-608.

Shen H, Xu Y, Yu R, Qin Y, Zhou L, Wang X and Spitz MR (2000) Polymorphism of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. Int J Cancer 88:601-606.

Shen H, Wang X, Hu Z, Zhang Z, Xu Y, Hu X, Guo J and Wei Q (2004) Polymorphisms of DNA repair gene *XRCC3* Thr241Met and risk of gastric cancer in a Chinese population. Cancer Lett 206:51-58.

Smith TR, Millera MS, Lohmanc K, Langec EM, Casec LD, Mohrenweiser HW and Hu JJ (2003) Polymorphisms of *XRCC1* and *XRCC3* genes and susceptibility to breast cancer. Cancer Lett 190:183-190.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Stephens EA, Taylor JA, Kaplan N, Yang C-H, Hsieh LL, Lucier GW and Bell DA (1994) Ethnic variation in the CYP2E1 gene, polymorphism analysis of 695 African-Americans, European Americans and Taiwanese. Pharmacogenetics 4:185-92.

Thompson LH, Brookman KW, Jones NJ, Allen SA and Carrano AV (1990) Molecular cloning of the human *XRCC1* gene. Mol Cell Biol 10:6160-6171.

Winsey SL, Haldar NA, Marsh HP, Bunce M, Marshall SE, Harris AL, Wojnarowska F and Welsh KI (2000) A variant within the DNA repair gene *XRCC3* is associated with the development of melanoma skin cancer. Cancer Res 60:5612-5616.

Yu H-P, Zhang X-Y, Wang X-L, Shi L-Y, Li F, Su Y-H, Wang Y-J, Lu B, Sun X, Lu W-H and Xu S-Q (2004) DNA repair gene *XRCC1* polymorphisms, smoking, and esophageal cancer risk. Cancer Detec Prev 28(3):194-199.

Zhou W, Liu G, Miller DP, Thurston SW, Xu LL, Wain JC, Lynch TJ, Su L and Christiani DC (2003) Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2*, smoking, and lung cancer risk. Cancer Epidemiol Biomark Prev 12:359-365.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

**Table 1.** *XRCC1* and *XRCC3* genotypes and allele frequencies among healthy Brazilian individuals and comparison with other populations.

| Codon | Genotypes | Brazil | | USA | | | | | | Italy | China | Egypt | Korea |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Current study | Rossit *et al.*, 2002 | Lunn et al., 1999 | | | David-Beabs and London, 2001[a] David-Beabs *et al.*, 2001[b] | | Smith *et al.*, 2003 | Matullo *et al.*, 2001 | Shen *et al.*, 2000[c]; Shen *et al.*, 2004[d] | Abdel-Rahman *et al.*, 2000 | Park *et al.*, 2002 |
| | | Caucasian/ Negroid | Caucasian/ Negroid | Caucasian | African-American | Taiwanese | Caucasian | African-American | Caucasian | Caucasian | Chinese | Egyptian | Korean |
| 194 *XRCC1* | Arg/Arg | 258 (86%) | 79 (82.3%) | 150 (89%) | 89 (91%) | 67 (56%) | 407 (88%) | 205 (84%) | 264 (87.7%) | ND | 70 (42.2%) | 43 (89.6%) | ND |
| | Arg/Trp | 41 (13.7%) | 17 (17.7%) | 18 (11%) | 9 (9%) | 42 (35%) | 54 (12%) | 36 (15%) | 36 (12%) | ND | 77 (46.4%) | 5 (10.4%) | ND |
| | Trp/Trp | 1 (0.3%) | 0 (0%) | 1 (0.5%) | 0 (0%) | 11 (8%) | 0 (0%) | 2 (1%) | 1 (0.3%) | ND | 19 (11.4%) | 0 (0%) | ND |
| | **Total** | **300** | **96** | **169** | **98** | **120** | **461** | **243** | **301** | - | **166** | **48** | - |
| | **Allele frequency** | **0.07** | **0.08** | **0.06** | **0.05** | **0.27** | **0.06[a]** | **0.08[a]** | **0.08** | **ND** | **0.35[c]** | **0.05** | **ND** |
| 399 *XRCC1* | Arg/Arg | 139 (46%) | 49 (51%) | 65 (38%) | 67 (69%) | 63 (53%) | 186 (40%) | 164 (67%) | 119 (40%) | 53 (43%) | 94 (56.6%) | 37 (77.1%) | 81 (60%) |
| | Arg/Gln | 123 (41%) | 34 (35.4%) | 83 (49%) | 27 (28%) | 51 (43%) | 217 (47%) | 70 (29%) | 150 (50%) | 58 (47%) | 59 (35.5%) | 9 (18.8%) | 48 (35.6%) |
| | Gln/Gln | 38 (13%) | 13 (13.6%) | 21 (13%) | 3 (3%) | 6 (4%) | 58 (13%) | 9 (4%) | 31 (10%) | 13 (10%) | 13 (7.8%) | 2 (4.1%) | 6 (4.4%) |
| | **Total** | **300** | **96** | **169** | **97** | **120** | **461** | **243** | **300** | **124** | **166** | **48** | **135** |
| | **Allele frequency** | **0.33** | **0.31** | **0.37** | **0.17** | **0.26** | **0.36[a]** | **0.18[a]** | **0.37** | **0.39** | **0.26[c]** | **0.14** | **0.22** |
| 241 *XRCC3* | Thr/Thr | 128 (42.7%) | ND | ND | ND | ND | 175 (39%) | 136 (58%) | 112 (37%) | 33 (26%) | 150 (90%) | ND | ND |
| | Thr/Met | 131 (43.7%) | ND | ND | ND | ND | 210 (46%) | 88 (38%) | 141 (47%) | 64 (52%) | 16 (10%) | ND | ND |
| | Met/Met | 41 (13.6%) | ND | ND | ND | ND | 68 (15%) | 10 (4%) | 49 (16%) | 27 (22%) | 0 (0%) | ND | ND |
| | **Total** | **300** | - | - | - | - | **453** | **234** | **302** | **124** | **166** | - | - |
| | **Allele frequency** | **0.35** | **ND** | **ND** | **ND** | **ND** | **0.38[b]** | **0.23[b]** | **0.43** | **0.35** | **0.05[d]** | **ND** | **ND** |

ND = not determined.

**Table 2**. Genotype distribution of genes *XRCC1* and *XRCC3* by gender and ethnicity.

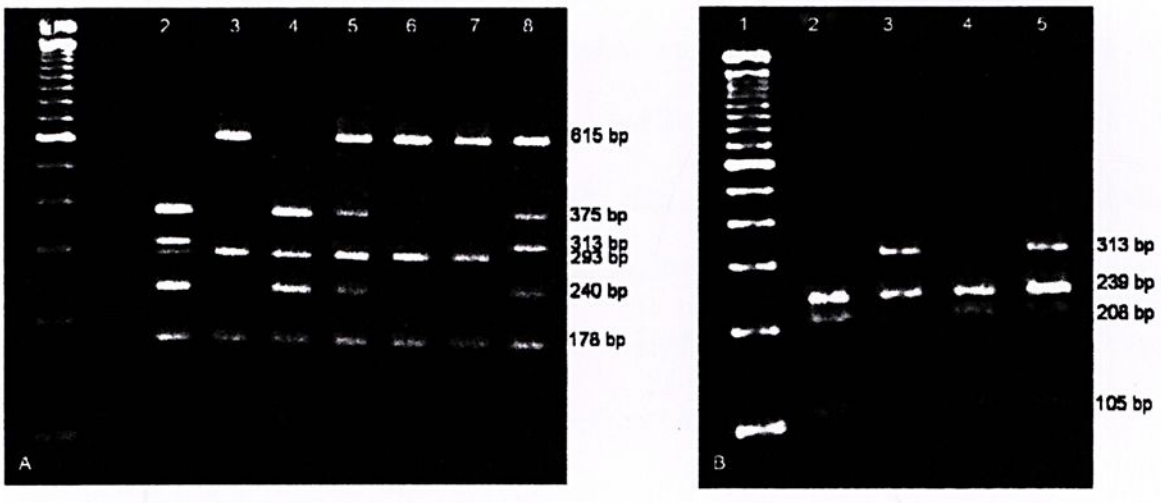
| Codon | Genotypes | Gender | | Ethnicity | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *Male* | *Female* | *Caucasian* | *Negroid* |
| | Arg/Arg | 137 (83.5%) | 121 (89%) | 226 (86.3%) | 32 (84.2%) |
| **194** | Arg/Trp | 26 (15.9%) | 15 (11%) | 36 (13.7%) | 5 (13.2%) |
| ***XRCC1*** | Trp/Trp | 1 (0.6%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (2.6%) |
| | **Allele frequency** | **0.08** | **0.05** | **0.07** | **0.09** |
| | *Probability* | p= 0.1266 | | p= 0.7337 | |
| | Arg/Arg | 72 (43.9%) | 67 (49.3%) | 119 (45.5%) | 20 (52.6%) |
| **399** | Arg/Gln | 70 (42.7%) | 53 (39%) | 107 (40.8%) | 16 (42.1%) |
| ***XRCC1*** | Gln/Gln | 22 (13.4%) | 16 (11.7%) | 36 (13.7%) | 2 (5.3%) |
| | **Allele frequency** | **0.35** | **0.31** | **0.34** | **0.26** |
| | *Probability* | p= 0.6469 | | p= 0,4048 | |
| | Thr/Thr | 67 (40.8%) | 61 (44.9%) | 110 (42%) | 18 (47.4%) |
| **241** | Thr/Met | 68 (41.5%) | 63 (46.3%) | 115 (43.9%) | 16 (42.1%) |
| ***XRCC3*** | Met/Met | 29 (17.7%) | 12 (8.8%) | 37 (14.1%) | 4 (10.5%) |
| | **Allele frequency** | **0.38** | **0.31** | **0.36** | **0.31** |
| | *Probability* | p= 0.0841 | | p= 0.5306 | |



**Figure legend:**

**Figure 1.** Representative RFLP analysis of *Msp*I and *Nla*III digest of the PCR products containing codons 194 and 399 of the *XRCC1* gene (A) and codon 241 of the *XRCC3* gene (B), respectively, separated on 2% 1000 agarose gel. **A** – Lane 1: molecular weight marker; Lane 2: heterozygous Arg/Trp 194 and wild-type homozygous Arg/Arg 399; Lanes 3, 6 and 7: homozygous Arg/Arg 194 and mutant homozygous Gln/Gln 399; Lane 4: wild-type homozygous Arg/Arg 194 and Arg/Arg 399; Lane 5: homozygous Arg/Arg 194 and heterozygous Arg/Gln 399; Lane 8: mutant homozygous Trp/Trp 194 and heterozygous Arg/Gln 399. **B** – Lane 1: molecular weight marker; Lanes 2 and 4: mutant homozygous Met/Met 241; Lane 3: wild-type homozygous Thr/Thr 241; Lane 5: heterozygous Thr/Met 241.

unesp


2
3
4
5
6
7
8
615 bp
375 bp
313 bp
293 bp
240 bp
178 bp
A
1
2
3
4
5
313 bp
239 bp
208 bp
105 bp
B

# I V – ARTIGO ORIGINAL:

# POLYMORPHISMS OF DNA REPAIR GENES *XRCC1* AND *XRCC3*, INTERACTION WITH ENVIRONMENTAL EXPOSURE AND RISK OF CHRONIC GASTRITIS AND GASTRIC CANCER

***Para submissão à World Journal of Gastroenterology***

**Polymorphisms of DNA repair genes *XRCC1* and *XRCC3*, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer.**

**Running Title: DNA repair gene polymorphisms and gastric lesions.**

**Márcia Cristina Duarte, Jucimara Colombo, Andrea Regina Baptista Rossit, Alaor Caetano, Aldenis Albaneze Borim, Durval Wornrath, Ana Elizabete Silva**

**Márcia Cristina Duarte, Jucimara Colombo, Ana Elizabete Silva**, UNESP - São Paulo State University, Department of Biology, Campus São José do Rio Preto, SP, Brazil

**Andréa Regina Baptista Rossit**, FAMERP- São José do Rio Preto School of Medicine, Microorganism Investigation Center, São José do Rio Preto, SP, Brazil

**Alaor Caetano, Aldenis Albaneze Borim**, FAMERP- São José do Rio Preto School of Medicine, Hospital de Base, São José do Rio Preto, SP, Brazil

**Durval Wornrath**, Pio XII Foundation, Barretos, SP, Brazil

This work was accomplished in the Cytogenetic and Molecular Biology Laboratory, Department of Biology, UNESP- São Paulo State University – Campus de São José do Rio Preto, SP, Brazil

**Supported by** Brazilian Agency CAPES

**Correspondence to**: Ana Elizabete Silva,
Departamento de Biologia, UNESP,
Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth
CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.
**Telephone:** +55-17-2212384 **Fax:** +55-17-2212390
E-mail: anabete@ibilce.unesp.br

**Abstract**

**AIM:** To evaluate the association between polymorphisms *XRCC1* Arg194Trp and Arg399Gln and *XRCC3* Thr241Met and the risk for chronic gastritis and gastric cancer, in a Southeastern Brazilian population.

**METHODS:** Genotyping by PCR-RFLP was carried out on 202 patients with chronic gastritis (CG) and 160 patients with gastric cancer (GC), matched to 202 (C1) and 150 (C2) controls, respectively.

**RESULTS:** No differences were observed among the studied groups with regard to the genotype distribution of *XRCC1* codons 194 and 399 and of *XRCC3* codon 241. However, the combined analyses of the three variant alleles (194Trp, 399Gln and 241Met) showed an increased risk for chronic gastritis when compared to the GC group. Moreover, an interaction between the polymorphic alleles and demographic and environmental factors was observed in the CG and GC groups. *XRCC1* 194Trp was associated with smoking in the CG group, while the variant alleles *XRCC1* 399Gln and *XRCC3* 241Met were related with gender, smoking, drinking and *H. pylori* infection in the CG and GC groups.

**CONCLUSION:** Our results showed no evidence of a relationship between the polymorphisms *XRCC1* Arg194Trp and Arg399Gln and *XRCC3* Thr241Met and the risk of chronic gastritis and gastric cancer in the Brazilian population, but the combined effect of these variants may interact to increase the risk for chronic gastritis, considered a premalignant lesion. Our data also indicate a gene-environment interaction in the susceptibility to chronic gastritis and gastric cancer.



## INTRODUCTION

DNA repair pathways are responsible for maintaining the integrity of the genome in face of environmental insults and general DNA replication errors, playing a role in protecting it against mutations that lead to cancer[1]. So, polymorphisms of DNA repair enzymes, which may alter the function or efficiency of the DNA repair, may contribute to an increased risk of environmental carcinogenesis[2]. These low-penetrance susceptibility genes have common variants and interact with environmental factors, contributing as a major factor to the populational incidence of cancer[3]. Several polymorphisms in genes that participate in different DNA repair pathways, such as *XPD, XPF, ERCC1, XRCC1, XRCC3*[4], *hOGG1*[5], *XPA, XPB*[6] and *XPC*[7], have been identified and related to cancer susceptibility.

The *XRCC1* gene is responsible for a scaffolding protein that directly associates with other proteins such as DNA polymerase β, PARP (ADP-ribose polymerase) and DNA ligase III in a complex, to facilitate the processes of base excision repair (BER) or single-strand break repair[8]. The BER pathway repairs DNA damage caused by a variety of endogenous and exogenous factors, including oxidation, alkylating agents and ionizing radiation[1,9]. The XRCC1 protein can bind directly to both gapped and nicked DNA, as well as to gapped DNA associated with DNA polymerase β, suggesting that this protein might be independently involved in DNA damage recognition[10]. Two polymorphisms, more often found in *XRCC1*' conserved sites, lead to a C→T substitution at codon 194 in exon 6 and to a G→A substitution at codon 399 in exon 10 of the gene, leading to the amino acid alterations arginine (Arg) to tryptophan (Trp) and arginine (Arg) to glutamine (Gln), respectively. These changes in conserved protein sites may alter the BER capacity, increasing the chances of DNA damage[4].

The Arg399Gln variant is more frequent and has been associated with head and neck[11], colorectal[12], gastric[13], esophageal[14,15], breast[16] and lung[17,18] cancers. The

Arg194Trp polymorphism has been related to colorectal[12], gastric[13], head and neck[19] and skin[20] cancers.

Protein XRCC3 functions in the DNA double-strand break (DSB) and cross-link repair[21] and interacts and stabilizes Rad51[22], one of the key components of the homologous repair (HR) pathway. The HR pathway uses a second intact copy of a homologous chromosome as a template to copy the information lost at the DSB site, resulting in a high-fidelity process and preventing chromosomal aberrations[9]. The main polymorphism in this gene involves the change of threonine (Thr) to methionine (Met) at codon 241 in exon 7[4]. Little is known about the functional consequences of this variation, although some studies observed a positive relation between the Thr241Met polymorphism and an increased risk for skin[23], bladder[24], breast[25] and lung[26] cancers.

So far, the investigations about interactions between *XRCC1* and *XRCC3* polymorphisms and environmental carcinogenesis have produced scarce and conflicting results[27,28,29,30,31,32], showing the functional complexity of these variants, that can include their interaction with environmental factors, thus modulating the susceptibility to cancer. Regarding gastric cancer, only a few studies were conducted to investigate its association with *XRCC1* and *XRCC3* variants[13, 28,31,33].

In Brazil, gastric cancer is still one of the most frequent types of cancer. The estimate for 2005 points to the fourth place in incidence and mortality, with about 23,000 new cases and 12,000 deaths[34]. However, multiple factors are thought to play a role in gastric carcinogenesis, including diet[35], lifestyle[36], pathological changes in the stomach such as chronic gastritis[37], and genetic alterations[38,39], besides the infection by *Helicobacter pylori*, the first bacterium to be termed as a definitive cause of cancer[40].

Thus, we conducted a study to evaluate the association between the polymorphisms *XRCC1* Arg194Trp and Arg399Gln and *XRCC3* Thr241Met and the risk of chronic gastritis

and gastric cancer in a Brazilian population, as well as the interaction between these polymorphisms and environmental factors involved in gastric carcinogenesis.

## MATERIAL AND METHODS

### Subjects

This was a case-control study on chronic gastritis and gastric cancer. The case groups comprised 202 patients with a histopathologically confirmed diagnosis of chronic gastritis (100 men and 102 women), with a mean age of 52 years (range 19-86 years), and 160 patients with a histopathologically confirmed diagnosis of gastric adenocarcinoma (118 men and 42 women), with a mean age of 61 years (range 28-93 years). All subjects were recruited from the *Hospital de Base* in São José do Rio Preto, SP, and from the Pio XII Foundation in Barretos, SP, Brazil. Gastric adenocarcinomas were classified as diffuse or intestinal types, according to the classification proposed by Lauren[41], and the chronic gastritis cases according to the Sidney System[42]. *H. pylori* infection was histologically established by the Giemsa staining technique. Two cancer-free control groups with no previous history of gastric disease were matched to the case groups with respect to age, gender and ethnicity. The control group for chronic gastritis (C1) was composed of 202 healthy individuals (100 men and 102 women) with a mean age of 51 years (range 20-85 years), and the control group for gastric cancer (C2) consisted of 150 healthy volunteers (108 men and 42 women) with a mean age of 59 years (range 22-93 years). Epidemiological data on the study population were collected using a standard interviewer-administered questionnaire, with questions about current and past occupation, smoking habits, alcohol intake and family history of cancer. This work was approved by the National Research Ethics Committee and written informed consent was obtained from all individuals.



**DNA extraction and genotype analyses**

About 5mL of whole blood were collected from all study participants in sterile EDTA-coated vacutainers. The samples were assigned a unique identifier code. DNA was extracted according to Abdel-Rahman *et al.*[43] and stored at -20°C until used for genotyping.

Genotypic analyses of the *XRCC1* gene were carried out by multiplex PCR-RFLP, using primers for codons 399 (F 5'-TTGTGCTTTCTCTGTGTCCA-3' e R 5'-TCCTCCAGCCTTTTCTGATA-3') and 194 (F 5'-GCCCCGTCCCAGGTA-3' e R 5'-AGCCCCAAGACCCTTTCACT-3'), which generate a fragment of 615 and 491 bp, respectively, as previously described[12] with modifications. Briefly, PCR was performed in 25 µL reaction buffer containing 12,5 pmol each primer, 0,2 mM of dNTPs, 3 mM of $MgCl_2$, about 100 ng DNA and 1 U of Taq DNA polymerase. The PCR products were digested overnight with 10 U of *Msp*I at 37°C. The wild-type Arg allele for codon 194 is identified by the presence of a 293 bp band, and the mutant Trp allele by the presence of a 313 bp band (indicative of the absence of the *Msp*I cutting site). For codon 399, the presence of two bands of 375 and 240 bp, respectively, identifies the wild-type Arg allele, while the uncut 615 bp band identifies the mutant Gln allele (indicative of the absence of the *Msp*I cutting site). A 178 bp band, resulting from an additional invariant *Msp*I cutting site in the 491 bp amplified fragment, is always present and serves as an internal control for complete enzyme digestion.

Polymorphism of the *XRCC3* gene was determined by PCR-RFLP, using codon 241 primers (F- 5' GCCTGGTGGTCATCGACTC 3' e R- 5' ACAGGGCTCTGGAAGGCACT GCTCAGCTCACGCACC 3'), as previously described by David-Beabes *et al.*[44]. The 25µL PCR mixture contained about 100 ng of DNA, 12,5 pmol of each primer, 0,2 mM of dNTPs, 2 mM of $MgCl_2$ and 1 U of Taq DNA polymerase. The 552 bp amplified product was digested overnight with 5 U of *Nla*III at 37°C. The wild-type allele Thr was identified by the presence

of two 239 and 313 bp bands, while the mutant allele Met was represented by 105, 208 and 239 bp bands.

**Statistical analyses**

Chi-square or Fisher's exact tests were utilized to compare the groups with regard to genotype frequencies and putative risk factors such as age, gender, ethnicity, smoking, drinking, *H. pylori* infection and histological type of adenocarcinoma. To investigate the gene-environment interactions, the odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (95% CI) were calculated, according to a combination of the *XRCC1* and *XRCC3* polymorphisms with putative risk factors. The statistical analyses were performed using Statidisk and GraphPad InStat computer software programs. A probability level ($P$) of less than 0.05 was used as criterion of significance.

**RESULTS**

Demographic data and risk factors of the study population are summarized in Table 1. Cases and controls did not show any statistically significant difference with regard to age, gender and ethnicity, indicating a well-matched study population. Gastric cancer (GC) patients were more likely to be cigarette smokers or alcohol drinkers than chronic gastritis (CG) patients and controls (C2), and this difference was statistically significant ($P<0.05$), the same occurring with CG patients when compared to controls (C1).

The *XRCC1* and *XRCC3* genotypes and the allele frequency distributions among cases and controls are presented in Table 2. The allele frequencies of polymorphisms 194Trp, 399Gln and 241Met were similar in cases and controls, not showing any statistically significant differences ($P>0.05$). However, a combined analysis of the *XRCC1* Arg194Trp and Arg399Gln polymorphisms and the *XRCC3* Thr241Met polymorphism (Table 3), and the

assessment of the inter- and intra-gene interactions of these three polymorphisms revealed a statistically significant ($P$= 0.0372) association when the three variant alleles interacted in the chronic gastritis group, as compared to the gastric cancer group. Other combinations did not show any significant difference. The banding patterns of *XRCC1* Arg194Trp and Arg399Gln and of *XRCC3* Thr241Met are represented in Figure 1.

Table 4 shows the associations of the different genotypes with the variables gender, smoking, drinking and *H. pylori* infection, among the groups. For this analysis, we combined the heterozygous and mutant homozygous genotypes. Allele 194Trp was associated with smoking, with an increased OR for chronic gastritis (4.16, 95%CI=1.16-16.66), when we compared the CG and C1 groups. The comparison between the CG and GC groups revealed that in men who were smokers and drinkers there was an association with increased OR's for gastric cancer in the individuals with the alleles *XRCC1* 399Gln (3.03, 95%CI=1.58-5.55; 2.27, 95%CI=1.22-4.16 and 3.22, 95%CI=1.75-5.88, respectively) and *XRCC*3 241Met (3.22, 95%CI=1.66-6.25; 1.88, 95%CI=1.01-3.57 and 2.63, 95%CI=1.41-4.76, respectively). Comparing the CG and GC groups further, we found increased OR's for gastric cancer in the association between *H. pylori*-negative subjects and the alleles *XRCC1* 399Gln (0.26, 95%CI=0.11-0.63) and *XRCC3* 241Met (0.36, 95%CI=0.15-0.85). An association between smoking and drinking and the polymorphisms 399Gln (2.04, 95%CI=1.17-3.57 and 2.63, 95%CI=1.35-5.26, respectively) and 241Met (2.44, 95%CI=1.42-4.16 and 2.13, 95%CI=1.10-4.00, respectively) was observed when we compared the CG and C1 groups, with increased OR's for chronic gastritis. Likewise, when we compared GC and C2, we observed an association between smoking and drinking, with an increased OR for stomach cancer, and alleles 399Gln (3.57, 95%CI=1.85-6.66 and 5.55, 95%CI=2.77-10.99) and 241Met (2.70, 95%CI=1.38-5.26 and 4.34, 95%CI=2.17-9.09). The other evaluated parameters as age and ethnicity, presented no association with the studied polymorphisms.



## DISCUSSION

There is increasing evidence that genetic variation leads to different DNA repair capacities in the human population. So, common polymorphisms can play a role in the individual genetic susceptibility to cancer[45]. Very few studies have investigated the role of polymorphisms of the DNA repair genes *XRCC1* and *XRCC3* in the risk of gastric cancer, and, to our knowledge, so far no study examined both gene polymorphisms in this type of cancer and in chronic gastritis. We conducted the first case-control study to investigate the relationship between the polymorphisms *XRCC1* Arg194Trp and Arg399Gln and *XRCC3* Thr241Met and the risk of chronic gastritis and gastric cancer, in a Southeastern Brazilian population.

Our data showed no association between the *XRCC1* and *XRCC3* polymorphisms and an increased risk for chronic gastritis and gastric cancer. To date, there are three published reports on investigations of the association between *XRCC1* polymorphisms and gastric cancer risk[13,28,33], and only one that examined the influence of an *XRCC3* polymorphism[31], with conflicting results. While Shen *et al.*[13] found the variant genotypes Arg194Trp and Arg399Gln in the *XRCC1* gene to be associated with an increased risk of gastric cardia cancer, Ratnasinghe *et al.*[28] observed a significant reduction in the risk of this type of cancer, both in Chinese populations. Similarly, Lee *et al.*[33] did not find any association with the risk of gastric cancer in a Korean population, but suggested that the 194Trp allele might be a protective allele with regard to gastric antral cancer. The only study that investigated the role of the *XRCC3* polymorphism in gastric cancer in a Chinese population found no evidence of an association between this polymorphism and an increased risk of gastric cancer[31].

The differences observed in these reports may be due to the different types of gastric cancer studied (cardia and antrum), which may have a distinct pathogenesis and ethnical differences[33]. In the Brazilian population, most gastric cancers are located in the antral

region, as in the Korean population, and are commonly associated with *H. pylori* infection. We also found that in the gastric cancer group the variant allele frequency of 194Trp was lower (0.06) and those of 399Gln and 241Met were higher (0.33 and 0.31, respectively) than those reported in Asian populations[13,28,31,33].

These differences can yet be due to the presence of variants of the common susceptibility polymorphisms, not just a single one, but DNA repair genes or activation and detoxification genes may jointly contribute to the susceptibility of gastric and other cancers. Thus, it is important to include more gene polymorphisms for the same or other DNA repair pathways to verify the gene-gene interactions, as well as the gene-environment interactions that may be important in the etiology of the disease.

When we assessed the association of *XRCC1* Arg194trp and Arg399Gln and *XRCC3* Thr241Met with the risk of chronic gastritis and gastric cancer, we found an increased risk for chronic gastritis when all three variant alleles were present at the same time, supporting the hypothesis of an additive effect of these three polymorphisms. There are no studies on chronic gastritis regarding its association with DNA repair gene polymorphisms, as there are for several metabolizing genes, such as *GSTM1, GSTT1* and CYP1A1, in Brazilian[46] and Chinese[47] populations. Chronic gastritis, a frequent inflammation of the stomach[48], is considered a premalignant lesion[49]. Gastritis may start after an *H. pylori* infection and progress over time from an initially superficial form to more severe forms, including severe atrophic gastritis with intestinal metaplasia[50]. About 10% of patients with gastric atrophy develop gastric cancer within a time period of 15 years[48]. Therefore, a reduced DNA repair capacity due to variant alleles may allow mutations to accumulate in the DNA of the epithelial cells of the stomach, resulting from the inflammatory process caused by *H. pylori* or from environmental factors such as dietary habits and lifestyle, increasing the risk of gastric cancer.



Gastric cancer has a complex etiology in which genetic and environmental factors play an important role. In this study, we observed a statistically significant association between variant alleles and demographic and environmental factors such as gender, smoking, drinking and *H. pylori* infection.

It is known that *H. pylori* infection has a very important role in the development of chronic gastritis and in its development into gastric cancer[50]. Various mechanisms were proposed for *H. pylori*-associated carcinogenesis, such as the formation of DNA adducts, the generation of free radicals, and a dysregulation of the gastric epithelial cell cycle[51,52]. So, these factors, associated with a decreased DNA repair capacity, may increase the risk for gastric cancer. Differently from these findings, we found a high frequency of variants 399Gln and 241Met in *H. pylori*-negative gastric cancer patients, as compared to chronic gastritis patients. However, these data must have been influenced by the great number of *H. pylori*-negative individuals, as compared to the *H. pylori*-positive individuals found in the gastric cancer group, probably due to an underestimate of the histological diagnosis in these patients.

In smokers, the presence of *XRCC1* 194Trp was more frequent in chronic gastritis cases, while polymorphisms *XRCC1* 399Gln and *XRCC3* 241Met were more frequent in both the chronic gastritis and the gastric cancer groups, compared with healthy controls. Whether the mechanisms of tobacco carcinogens act in human gastric cancer is currently uncertain. The main carcinogens contained in tobacco smoke include polyaromatic hydrocarbons (PAH), N-nitrosamines and aromatic amines. Cigarette smoking increases the number of single-strand breaks and DNA adducts, which, if left unrepaired, can lead to gene mutation[53]. These DNA damages can be repaired by BER, in which the XRCC1 protein has an important role. Functional studies of *XRCC1* variants observed a significantly elevated level of sister chromatid exchange (SCE) in peripheral blood lymphocytes after *in vitro* exposure to the tobacco-specific NNK in carriers of the 399Gln allele, but the same was not observed for the



194Trp polymorphism[54]. Duell *et al.*[55] reported higher frequencies of SCE for current smokers with the 399Gln polymorphism than for smokers with the Arg/Arg genotype.

Protein XRCC3 participates in the DSB repair by the homologous repair pathway and the 241Met variant may lead to biological implications for the enzyme's function and/or the interaction with other proteins involved in DNA damage repair. Matullo *et al.*[56] associated the 241 Met polymorphism with $^{32}$P-DNA adduct levels, indicating a possible role of the *XRCC3* gene in the repair of bulky DNA adducts. Thus, variations in DNA repair capacity caused by polymorphisms of DNA repair genes may modulate the genotoxic effect of tobacco smoking.

Excessive alcohol consumption can also lead to DNA damage through the production of free radical intermediates, such as reactive oxygen species, which are produced during the ethanol metabolism[57]. The frequency of DNA single-strand breaks also increases with chronic exposure to alcohol[58]. We observed an association with alcohol consumption in the patients with chronic gastritis and gastric cancer, and found an increased risk for these diseases when polymorphisms *XRCC1* 399Gln and *XRCC3* 241Met were present.

In conclusion, in the Brazilian population studied, we did not find evidence of a relationship between the polymorphisms *XRCC1* Arg194Trp and Arg399Gln and *XRCC3* Thr241Met and the development of chronic gastritis and gastric cancer. However, intra- and inter-gene interactions may contribute to the development of chronic gastritis, a precursor lesion of stomach cancer. We also verified a gene-environment interaction between the *XRCC1* and *XRCC3* polymorphisms, mainly with the habits of smoking and drinking, in the chronic gastritis and gastric cancer patients. Our study is an important addition to the small number of previously published reports on DNA repair gene variants in gastric cancer and shows the need for further studies in different populations, to elucidate the role of these polymorphisms in carcinogenesis.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Dr. Antonio José Manzato for assistance with the statistical analysis.

## REFERENCES

1 Lindahl T. Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. *Mutat Res* 2000 Apr; 462(2-3): 129-35 [PMID: 10767624]

2 Mohrenweiser HW, Jones IM. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation? *Mutat Res* 1998 May; 400(1-2): 15-24 [PMID: 9685572]

3 Shields PG, Harris CC. Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. *J Clin Oncol* 2000 Jun; 18(11): 2309-15 [PMID: 10829052]

4 Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 1998 Feb; 58(4): 604-8 [PMID: 9485007]

5 Ishida T, Takashima R, Fukayama M, Hamada C, Hippo Y, Fujii T, Moriyama S, Matsuba C, Nakahori Y, Morita H, Yazaki Y, Kodama T, Nishimura S, Aburatani H. New DNA polymorphisms of human MMH/OGG1 gene: prevalence of one polymorphism among lung-adenocarcinoma patients in Japanese. *Int J Cancer* 1999 Jan; 80(1): 18-21 [PMID: 9935223]

6 Butkiewicz D, Rusin M, Harris CC, Chorazy M. Identification of four single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes: XPA and XPB (ERCC3) in Polish population. *Hum Mutat* 2000 Jun; 15(6): 577-8 [PMID: 10862089]

7 Chavanne F, Broughton BC, Pietra D, Nardo T, Browitt A, Lehmann AR, Stefanini M. Mutations in the XPC gene in families with xeroderma pigmentosum and consequences

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

at the cell, protein, and transcript levels. *Cancer Res* 2000 Apr; 60(7): 1974-82 [PMID: 10766188]

8 Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res* 1996 Nov; 24(22): 4387-94 [PMID: 8948628]

9 Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003 Nov; 193(1-2): 3-34 [PMID: 14599765]

10 Marintchev A, Mullen MA, Maciejewski MW, Pan B, Gryk MR, Mullen GP. Solution structure of the single-strand break repair protein XRCC1 N-terminal domain. *Nat Struct Biol* 1999 Sep; 6(9): 884-93 [PMID: 10467102]

11 Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher SA, Clayman GL, Strom SS, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 1999 Nov; 20(11): 2125-9 [PMID: 10545415]

12 Abdel-Rahman SZ, Soliman AS, Bondy ML, Omar S, El-Badawy SA, Khaled HM, Seifeldin IA, Levin B. Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett* 2000 Oct; 159(1): 79-86 [PMID: 10974409]

13 Shen H, Xu Y, Qian Y, Yu R, Qin Y, Zhou L, Wang X, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 2000 Nov; 88(4): 601-6 [PMID: 11058877]

14 Lee JM, Lee YC, Yang SY, Yang PW, Luh SP, Lee CJ, Chen CJ, Wu MT. Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of the esophageal cancer. *Int J Cancer* 2001 Jul; 95(4): 240-6 [PMID: 11400117]

unesp

15 Yu HP, Zhang XY, Wang XL, Shi LY, Li YY, Li F, Su YH, Wang YJ, Lu B, Sun X, Lu WH, Xu SQ. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and esophageal cancer risk. *Cancer Detect Prev* 2004; 28(3): 194-9 [PMID: 15225899]

16 Duell EJ, Millikan RC, Pittman GS, Winkel S, Lunn RM, Tse CK, Eaton A, Mohrenweiser HW, Newman B, Bell DA. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001 Mar; 10(3): 217-22 [PMID: 11303590]

17 Divine KK, Gilliland FD, Crowell RE, Stidley CA, Bocklage TJ, Cook DL, Belinsky SA. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat Res* 2001 Jan; 461(4): 273-8 [PMID: 11104903]

18 Zhou W, Liu G, Miller DP, Thurston SW, Xu LL, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smoking, and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003 Apr; 12(4): 359-65 [PMID: 12692111]

19 Olshan AF, Watson MA, Weissler MC, Bell DA. XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer. *Cancer Lett* 2002 Apr; 178(2): 181-6 [PMID: 11867203]

20 Han J, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ. Genetic variation in XRCC1, sun exposure, and risk of skin cancer. *Br J Cancer* 2004 Oct; 91(8): 1604-9 [PMID: 15381933]

21 Thompson LH, Schild D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* 2002 Nov; 509(1-2): 49-78 [PMID: 12427531]

22 Schild D, Lio Y, Collins DW, Tsomondo T, Chen DJ. Evidence for simultaneous protein interactions between human RAD51 paralogs. *J Biol Chem* 2000; 275:16443-16449 [PMID:10749867]

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

23 Winsey SL, Haldar NA, Marsh HP, Bunce M, Marshall SE, Harris AL, Wojnarowska F, Welsh KI. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res* 2000 Oct; 60(20): 5612-6 [PMID: 11059748]

24 Matullo G, Guarrera S, Carturan S, Peluso M, Malaveille C, Davico L, Piazza A, Vineis P. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int J Cancer* 2001 May; 92(4): 562-7 [PMID: 11304692]

25 Smith TR, Miller MS, Lohman K, Lange EM, Case LD, Mohrenweiser HW, Hu JJ. Polymorphisms of XRCC1 and XRCC3 genes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Lett* 2003 Feb; 190(2): 183-90 [PMID: 12565173]

26 Jacobsen NR, Raaschou-Nielsen O, Nexo B, Wallin H, Overvad K, Tjonneland A, Vogel U. XRCC3 polymorphisms and risk of lung cancer. *Cancer Lett* 2004 Sep; 213(1): 67-72 [PMID: 15312685]

27 David-Beabes GL, London SJ. Genetic polymorphism of XRCC1 and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians. *Lung Cancer* 2001 Dec; 34(3): 333-9 [PMID: 11714530]

28 Ratnasinghe LD, Abnet C, Qiao YL, Modali R, Stolzenberg-Solomon R, Dong ZW, Dawsey SM, Mark SD, Taylor PR. Polymorphisms of XRCC1 and risk of esophageal and gastric cardia cancer. *Cancer Lett* 2004 Dec; 216(2): 157-64 [PMID: 15533591] [PubMed - in process]

29 Butkiewicz D, Rusin M, Enewold L, Shields PG, Chorazy M, Harris CC. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 2001 Apr; 22(4): 593-7 [PMID: 11285194]



30 Duan Z, Shen H, Lee JE, Gershenwald JE, Ross MI, Mansfield PF, Duvic M, Strom SS, Spitz MR, Wei Q. DNA repair gene XRCC3 241Met variant is not associated with risk of cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002 Oct; 11(10Pt1): 1142-3 [PMID: 12376526]

31 Shen H, Wang X, Hu Z, Zhang Z, Xu Y, Hu X, Guo J, Wei Q. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC3 Thr241Met and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Cancer Lett* 2004 Mar; 206(1): 51-8 [PMID: 15019159]

32 Sanyal S, Festa F, Sakano S, Zhang Z, Steineck G, Norming U, Wijkstrom H, Larsson P, Kumar R, Hemminki K. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis* 2004 May; 25(5): 729-34 [PMID: 14688016]

33 Lee SG, Kim B, Choi J, Kim C, Lee I, Song K. Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of gastric cancer. *Cancer Lett* 2002 Dec; 187(1-2): 53-60 [PMID: 12359351]

34 INCA – Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Estimativa 2005 – Estimativas de incidência por câncer no Brasil, 2004. Disponível em http://www.inca.org.br.

35 Kobayashi M, Tsubono Y, Sasazuki S, Sasaki S, Tsugane S; Japan Public Health Center Study Group. Vegetables, fruit and risk of gastric cancer in Japan: a 10-year follow-up of the JPHC Study Cohort I. *Int J Cancer* 2002 Nov; 102(1): 39-44 [PMID: 12353232]

36 Sasazuki S, Sasaki S, Tsugane S; Japan Public Health Center Study Group. Cigarette smoking, alcohol consumption and subsequent gastric cancer risk by subsite and histologic type. *Int J Cancer* 2002 Oct; 101(6): 560-6 [PMID: 12237898]

37 Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992 Dec; 52(24): 6735-40 [PMID: 1458460]

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

38 Chen X, Leung SY, Yuen ST, Chu KM, Ji J, Li R, Chan AS, Law S, Troyanskaya OG, Wong J, So S, Botstein D, Brown PO. Variation in gene expression patterns in human gastric cancers. *Mol Biol Cell* 2003 Aug; 14(8): 3208-15 [PMID: 12925757]

39 Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 2004; 157: 327-49 [PMID: 15055305]

40 IARC – Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61: 1-241 [PMID: 7715068]

41 Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49 [PMID: 14320675]

42 Price AB. The Sydney System: histological division. *J Gastroenterol Hepatol* 1991 May-Jun; 6(3): 209-22 [PMID: 1912431]

43 Abdel-Rahman SZ, Nouraldeen AM, Ahmed AE. Molecular interaction of [2,3-14C] acrylonitrile with DNA in gastric tissue of rat. *J Biochem Toxicol* 1994 Aug; 9(4): 191-8 [PMID: 7853353]

44 David-Beabes GL, Lunn RM, London SJ. No association between the XPD (Lys751G1n) polymorphism or the XRCC3 (Thr241Met) polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001 Aug; 10(8): 911-2 [PMID: 11489761]

45 Hu JJ, Mohrenweiser HW, Bell DA, Leadon SA, Miller MS. Symposium overview: genetic polymorphisms in DNA repair and cancer risk. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002 Nov; 185(1): 64-73 [PMID: 12460738]

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

46 Colombo J, Rossit ARB, Caetano A, Borim AA, Wornrath DR, Silva AE. *GSTT1, GSTM1* and *CYP2E1* genetic polymorphisms in gastric cancer and chronic gastritis in a Brazilian population. *World J Gastroenterol* 2004 May; 10(9): 1240-1245 [PMID: 15112335]

47 Setiawan VW, Zhang ZF, Yu GP, Li YL, Lu ML, Tsai CJ, Cordova D, Wang MR, Guo CH, Yu SZ, Kurtz RC. GSTT1 and GSTM1 null genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study in a Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000 Jan; 9(1): 73-80 [PMID: 10667466]

48 Cheli R, Giacosa A. Chronic atrophic gastritis and gastric mucosal atrophy--one and the same. *Gastrointest Endosc* 1983 Feb; 29(1): 23-5 [PMID: 6826003]

49 Genta RM. Review article: Gastric atrophy and atrophic gastritis--nebulous concepts in search of a definition. *Aliment Pharmacol Ther* 1998 Feb; 12 (Suppl 1): 17-23 [PMID: 9701001]

50 Correa P. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995; 19 (Suppl 1): S37-43 [PMID: 7762738]

51 Moss SF. The carcinogenic effect of H. pylori on the gastric epithelial cell. *J Physiol Pharmacol* 1999 Dec; 50(5): 847-56 [PMID: 10695564]

52 Zhang ZW, Patchett SE, Farthing MJ. Role of Helicobacter pylori and p53 in regulation of gastric epithelial cell cycle phase progression. *Dig Dis Sci* 2002 May; 47(5): 987-95 [PMID: 12018925]

53 Newcomb PA, Carbone PP. The health consequences of smoking. *Cancer. Med Clin North Am* 1992 Mar; 76(2): 305-31 [PMID: 1548964]

54 Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA. The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett* 2000 Oct; 159(1): 63-71 [PMID: 10974407]

55 Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TD, Mark EJ, Wain JC, Christiani DC, Kelsey KT. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 2000 May; 21(5): 965-71 [PMID: 10783319]

56 Matullo G, Palli D, Peluso M, Guarrera S, Carturan S, Celentano E, Krogh V, Munnia A, Tumino R, Polidoro S, Piazza A, Vineis P. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis* 2001 Sep; 22(9): 1437-45 [PMID: 11532866]

57 Brooks PJ. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity - a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1997 Sep; 21(6): 1073-82 [PMID: 9309320]

58 Daiker DH, Shipp BK, Schoenfeld HA, Klimpel GR, Witz G, Moslen MT, Ward JB Jr. Effect of CYP2E1 induction by ethanol on the immunotoxicity and genotoxicity of extended low-level benzene exposure. *J Toxicol Environ Health A* 2000 Feb; 59(3): 181-96 [PMID: 10667633]

**Table 1.** Frequency distribution analysis of selected demographic and risk factors in chronic gastritis (CG) and gastric cancer (GC) patients and respective control groups C1 and C2.

| Variable | CG N (%) | C1 N (%) | *P* value | GC N (%) | C2 N (%) | *P* value |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Sex** | | | | | | |
| Male | 100 (49.5) | 100 (49.5) | | 118 (73.7) | 108 (67.5) | |
| Female | 102 (50.5) | 102 (50.5) | 1.0000 | 42 (26.3) | 42 (32.5) | 0.7290 |
| Total | 202 (100) | 202 (100) | | 160 (100) | 150 (100) | |
| **Age** | | | | | | |
| < 50 | 94 (46.5) | 103 (51.0) | | 25 (15.6) | 46 (30.7) | |
| ≥ 50 | 108 (53.5) | 99 (49.0) | 0.3704 | 135 (84.4) | 104 (69.3) | 0.0743 |
| Total | 202 (100) | 202 (100) | | 160 (100) | 150 (100) | |
| **Ethnicity** | | | | | | |
| Caucasoid | 182 (90.0) | 182 (90.0) | | 140 (87.5) | 128 (85.3) | |
| Negroid | 20 (10.0) | 20 (10.0) | 1.0000 | 20 (12.5) | 22 (14.7) | 0.5775 |
| Total | 202 (100) | 202 (100) | | 160 (100) | 150 (100) | |
| **Smoking status** | | | | | | |
| Non-smoker | 89 (44.1) | 124 (61.4) | | 47 (29.4) | 76 (50.7) | |
| Smoker | 113 (55.9) | 78 (38.6) | 0.0005* | 113 (70.6) | 74 (49.3) | 0.0001* |
| Total | 202 (100) | 202 (100) | | 160 (100) | 150 (100) | |
| **Smoking time (years)** | | | | | | |
| < 30 | 64 (56.6) | 48 (61.5) | | 37 (32.7) | 33 (44.6) | |
| ≥ 30 | 49 (43.4) | 30 (38.5) | 0.4990 | 76 (67.3) | 41 (55.4) | 0.1015 |
| Total | 113 (100) | 78 (100) | | 113 (100) | 74 (100) | |
| **Alcohol status** | | | | | | |
| Non-drinkers | 138 (68.0) | 162 (74.7) | | 72 (45.0) | 110 (75.9) | |
| Drinkers | 64 (32.0) | 32 (25.3) | 0.0004* | 88 (55.0) | 35 (24.1) | 0.0000* |
| Total | 202 (100) | 194 (100) | | 160 (100) | 143 (100) | |
| **Drinking time (years)** | | | | | | |
| < 30 | 37 (57.8) | 17 (53.0) | | 49 (55.7) | 11 (31.4) | |
| ≥ 30 | 27 (42.2) | 15 (47.0) | 0.6625 | 39 (44.3) | 24 (68.6) | 0.0152* |
| Total | 64 (100) | 32 (100) | | 88 (100) | 35 (100) | |
| ***H. pylori* infection** | | | | | | |
| *Positive* | 85 (53.5) | | | 21 (30.9) | | |
| *Negative* | 74 (46.5) | | | 47 (69.1) | | |
| Total | 159 (100) | | | 68 (100) | | |
| **Tumor histological type** | | | | | | |
| Intestinal | | | | 64 (50.4) | | |
| Diffuse | | | | 63 (49.6) | | |
| Total | | | | 127 (100) | | |

* significant difference ($P<0.05$)



**Table 2.** *XRCC1* and *XRCC3* allele frequencies in patients with chronic gastritis (CG) and gastric cancer (GC) and in the respective control groups C1 and C2.

| | Genotypes | CG (n= 202) N (%) | C1 (n=202) N (%) | *P* value | GC (n= 160) N (%) | C2 (n= 150) N (%) | *P* value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Arg/Arg | 176 (87.1) | 183 (90.6) | | 140 (87.5) | 130 (86.7) | |
| ***XRCC1*** | Arg/Trp | 24 (11.9) | 19 (9.4) | | 20 (12.5) | 19 (12.7) | |
| **Codon 194** | Trp/Trp | 2 (1.0) | 0 (0.0) | 0.2683 | 0 (0.0) | 1 (0.6) | 0.8269 |
| | Arg/Trp+Trp/Trp | 26 (12.9) | 19 (9.4) | | 20 (12.5) | 20 (13.3) | |
| | Allele frequency | 0.07 | 0.05 | | 0.06 | 0.07 | |
| | Arg/Arg | 98 (48.5) | 95 (47) | | 73 (45.6) | 70 (46.7) | |
| ***XRCC1*** | Arg/Gln | 91 (45.0) | 82 (40.6) | | 67 (41.9) | 57 (38.0) | |
| **Codon 399** | Gln/Gln | 13 (6.5) | 25 (12.4) | 0.7651 | 20 (12.5) | 23 (15.3) | 0.5035 |
| | Arg/Gln+Gln/Gln | 104 (51.5) | 107 (53.0) | | 87 (54.4) | 80 (53.3) | |
| | Allele frequency | 0.29 | 0.33 | | 0.33 | 0.34 | |
| | Thr/Thr | 92 (45.5) | 84 (41.6) | | 84 (52.5) | 67 (44.7) | |
| ***XRCC3*** | Thr/Met | 81 (40.1) | 89 (44.1) | | 53 (33.1) | 60 (40.0) | |
| **Codon 241** | Met/Met | 29 (14.4) | 29 (14.3) | 0.4221 | 23 (14.4) | 23 (15.3) | 0.1679 |
| | Thr/Met+Met/Met | 110 (54.5) | 118 (58.4) | | 76 (47.5) | 83 (55.3) | |
| | Allele frequency | 0.34 | 0.36 | | 0.31 | 0.35 | |



**Table 3.** Association between *XRCC1* and *XRCC3* genotype profiles and risk for chronic gastritis (CG) and gastric cancer (GC).

| *XRCC1* | | *XRCC3* | Groups | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Codon 194** | **Codon 399** | **Codon 241** | **CG** | **GC** | **OR (95% CI); *P*** | **CG** | **C1** | **OR (95% CI); *P*** | **GC** | **C2** | **OR (95% IC); *P*** |
| **All wide-type genotypes** | | | | | | | | | | | |
| Arg | Arg | Thr | 33 | 32 | 1.0 (reference) | 33 | 34 | 1.0 (reference) | 32 | 23 | 1.0 (reference) |
| **One variant polymorphism** | | | | | | | | | | | |
| Trp | Arg | Thr | 5 | 8 | 0.6 (0.17-2.04); 0.5469 | 5 | 6 | 1,2 (0.32-4.16); 1.0000 | 8 | 6 | 1.1 (0.32-3.44); 1.0000 |
| Arg | Gln | Thr | 51 | 38 | 1.4 (0.68-2.50); 0.5124 | 51 | 42 | 0.8 (0.42-1.51); 0.5234 | 38 | 34 | 1.2 (0.61-2.56); 0.5918 |
| Arg | Arg | Met | 50 | 27 | 2.0 (0.91-3.57); 0.1237 | 50 | 49 | 1.0 (0.51-1.75); 1.0000 | 27 | 34 | 2,0 (0.83-3.70); 0.1426 |
| **Two variant polymorphisms** | | | | | | | | | | | |
| Trp | Gln | Thr | 3 | 5 | 0.6 (0.13-2.63); 0.7106 | 3 | 2 | 0.6 (0.1-4.16); 1.0000 | 5 | 4 | 1.1 (0.16-4.54); 1.0000 |
| Arg | Gln | Met | 43 | 43 | 1.0 (0.50-1.85); 1.0000 | 43 | 58 | 1.4 (0.69-2.43); 0.4309 | 43 | 39 | 1.2 (0.63-2.50); 0.5389 |
| Trp | Arg | Met | 10 | 6 | 1.6 (0.52-5.00); 0.5771 | 10 | 6 | 0.6 (0.19-1.78); 0.4106 | 6 | 7 | 1.6 (0.48-5.55); 0.5999 |
| **Three variant polymorphisms** | | | | | | | | | | | |
| Trp | Gln | Met | 8 | 1 | 8.3 (0.91-100); 0.0372* | 8 | 5 | 0.6 (0.17-2.04); 0.5400 | 1 | 3 | 5.0 (0.40-50.0); 0.3113 |

* significant difference ($P< 0.05$)

**Table 4.** Association of heterozygous and mutant homozygous polymorphisms of codons 194 and 399 of the *XRCC1* gene and of codon 241 of the *XRCC3* gene with demographic and environmental risk factors in chronic gastritis (CG) and gastric cancer (GC) patients and the respective control groups C1 and C2.

| | Groups | Variable | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Gender | | Smoke | | Drink | | *H. pylori* infection | |
| | | Male N (%) | Female N (%) | No N (%) | Yes N (%) | No N (%) | Yes N (%) | Positive N (%) | Negative N (%) |
| ***XRCC1*** | **CG** | 11 (42.3) | 15 (57.7) | 9 (34.6) | 17 (65.4) | 20 (77) | 6 (23) | | |
| **Arg194Trp + Trp194Trp** | **C1** | 10 (52.6) | 9 (47.4) | 13 (68.4) | 6 (31.6) | 17 (89.5) | 2 (10.5) | | |
| | | $P$= 0.4929 | | $P$= 0.0250* | | $P$= 0.4355 | | | |
| | **CG** | 55 (53) | 49 (47) | 48 (46.2) | 56 (53.8) | 71 (68.3) | 33 (31.7) | 45 (53.6) | 39 (46.4) |
| | **GC** | 67 (77) | 20 (23) | 24 (27.6) | 63 (72.4) | 35 (40.2) | 52 (59.8) | 9 (23.7) | 29 (76.3) |
| | | $P$= 0.0005* | | $P$= 0.0084* | | $P$= 0.0001* | | $P$= 0.0021* | |
| ***XRCC1*** | **CG** | 55 (52.9) | 49 (47.1) | 48 (46.2) | 56 (53.8) | 71 (68.3) | 33 (31.7) | | |
| **Arg399Gln + Gln399Gln** | **C1** | 52 (48.5) | 55 (51.4) | 68 (63.6) | 39 (36.4) | 91 (85) | 16 (15) | | |
| | | $P$= 0.5335 | | $P$= 0.0111* | | $P$= 0.0039* | | | |
| | **GC** | 67 (77) | 20 (23) | 24 (27.6) | 63 (72.4) | 35 (40.2) | 52 (59.8) | | |
| | **C2** | 56 (70) | 24 (30) | 46 (57.5) | 34 (42.5) | 63 (78.8) | 17 (21.2) | | |
| | | $P$= 0.3042 | | $P$= 0.0001* | | $P$= 0.0000* | | | |
| | **CG** | 57 (51.8) | 53 (48.2) | 46 (41.8) | 64 (58.2) | 77 (70) | 33 (30) | 44 (52.4) | 40 (47.6) |
| | **GC** | 59 (77.6) | 17 (22.4) | 21 (27.6) | 55 (72.4) | 36 (47.4) | 40 (52.6) | 10 (28.6) | 25 (71.4) |
| | | $P$= 0.0004* | | $P$= 0.0494* | | $P$= 0.0019* | | $P$= 0.0175* | |
| ***XRCC3*** | **CG** | 57 (51.8) | 53 (48.2) | 46 (41.8) | 64 (58.2) | 77 (47.4) | 33 (52.6) | | |
| **Thr241Met + Met241Met** | **C1** | 59 (50) | 59 (50) | 75 (63.6) | 43 (36.4) | 98 (79.6) | 20 (20.4) | | |
| | | $P$= 0.7838 | | $P$= 0.0010* | | $P$= 0.0110* | | | |
| | **GC** | 59 (77.6) | 17 (22.4) | 21 (27.6) | 55 (72.4) | 36 (47.4) | 40 (52.6) | | |
| | **C2** | 59 (71.1) | 24 (28.9) | 42 (50.6) | 41 (49.4) | 66 (79.6) | 17 (20.5) | | |
| | | $P$= 0.3458 | | $P$= 0.0031* | | $P$= 0.0000* | | | |

* significant difference ($P < 0.05$)

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

**Figure legend:**

**Figure 1:** PCR-RFLP of *XRCC1* (A) and *XRCC3* (B) genes. **A.** Lane 1: molecular weight marker. Lane 2: wild-type homozygous codons 194 and 399. Lane 3: wild-type homozygous codon 194 and heterozygous codon 399. Lane 4: mutant homozygous codon 194 and wild-type homozygous codon 399. Lane 5: heterozygous codon 194 and wild type-homozygous codon 399. Lane 6: wild-type homozygous codon 194 and mutant homozygous codon 399. **B.** Lane 1: molecular weight marker. Lanes 2 and 5: heterozygous codon 241. Lane 3: wild-type homozygous codon 241. Lane 4: mutant homozygous codon 241.

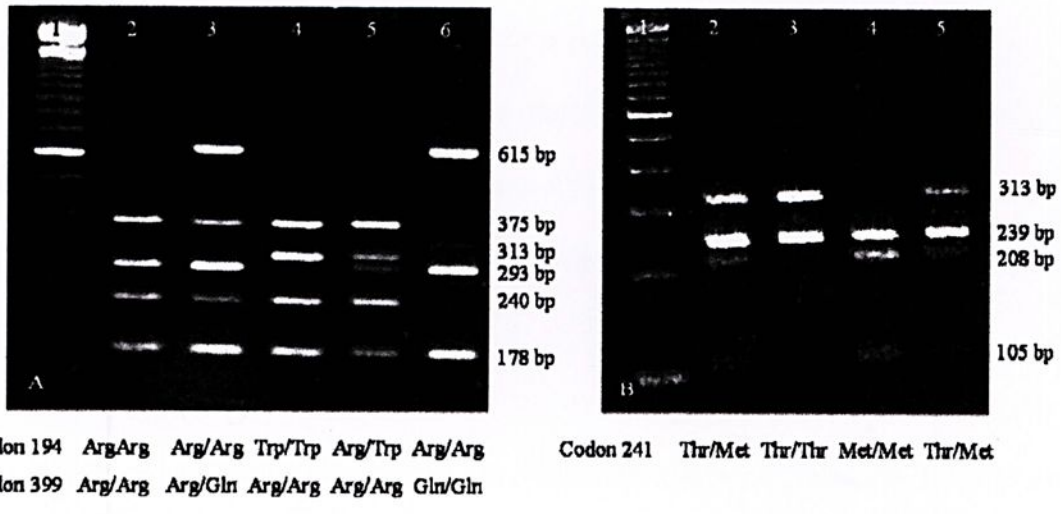

2
3
4
5
6
615 bp
375 bp
313 bp
293 bp
240 bp
178 bp
A
2
3
4
5
313 bp
239 bp
208 bp
105 bp
B
Codon 194 ArgArg Arg/Arg Trp/Trp Arg/Trp Arg/Arg
Codon 399 Arg/Arg Arg/Gln Arg/Arg Arg/Arg Gln/Gln
Codon 241 Thr/Met Thr/Thr Met/Met Thr/Met

Figure 1.

# V - DISCUSSÃO

## V- Discussão

Estudos epidemiológicos, nas últimas décadas, têm evidenciado diversos alelos variantes de enzimas que participam do metabolismo de xenobióticos e do reparo do DNA e sua associação com risco de câncer (NEBERT; MCKINNON; PUGA, 1996; GOODE; ULRICH; POTTER, 2002). Os sistemas de reparo do DNA atuam na manutenção da integridade genômica, reparando danos causados à molécula de DNA por fatores endógenos e exógenos, bem como erros surgidos durante a replicação do DNA (LINDAHL, 2000). Uma vez que polimorfismos nestes genes podem modular a resposta individual a agentes que lesam o DNA, derivados da dieta, estilo de vida e ambiente, o estudo do impacto destas variantes comuns na suscetibilidade ao câncer é importante para a caracterização de populações de alto risco.

Neste estudo, foram estimadas as freqüências dos polimorfismos dos códons 194 e 399 do gene *XRCC1* que participa do reparo de excisão de bases (BER) e do códon 241 do gene *XRCC3*, envolvido no sistema de reparo de recombinação homóloga (HRR), em indivíduos saudáveis da população brasileira e a associação e interação desses polimorfismos com fatores ambientais e risco para a gastrite crônica e câncer gástrico. Não foram observadas diferenças significantes entre as distribuições genotípicas e alélicas destes polimorfismos entre sexo e etnia no grupo de indivíduos saudáveis, nem entre esse grupo com os grupos de pacientes com gastrite crônica e câncer gástrico.

Nos 300 indivíduos saudáveis avaliados, as freqüências dos alelos variantes para os códons 194 e 399 do gene *XRCC1* foram, respectivamente, 0,07 e 0,33, semelhante à descrita por outro estudo brasileiro em 96 indivíduos (ROSSIT et al., 2002) e para outras populações caucasianas (LUNN et al., 1999; DAVID-BEABS; LONDON, 2000; SMITH et al., 2003). Considerando-se as diferentes etnias, o polimorfismo do códon 194 apresentou

freqüência alélica semelhante a afro-americanos (LUNN et al., 1999; DAVID-BEABS; LONDON, 2000) e egípcios (ABDEL-RAHMAN et al., 2000), mas menores que as observadas em chineses (SHEN et al., 2000) e taiwaneses (LUNN et al., 1999). Enquanto que a variante para o códon 399 foi mais elevada que as observadas para afro-americanos (LUNN et al., 1999; DAVID-BEABS; LONDON, 2000), taiwaneses (LUNN et al., 1999), chineses (SHEN et al., 2000), egípcios (ABDEL-RAHMAN et al., 2000) e coreanos (PARK et al., 2002).

Para o códon 241 do gene *XRCC3* ainda não há na literatura estimativa da freqüência desse alelo em populações brasileiras, assim o presente estudo apresenta os primeiros resultados, mostrando uma freqüência de 0,35, semelhante à descrita para caucasianos americanos (DAVID-BEABS; LUNN; LONDON, 2001) e italianos (MATULLO et al., 2001b), mas superior àquelas observadas para afro-americanos (DAVID-BEABS; LUNN; LONDON, 2001) e chineses (SHEN et al., 2004). Estas diferenças mostram uma variabilidade na distribuição alélica desses genes de reparo do DNA em diferentes populações e etnias. Portanto, enfatizando a necessidade e importância de estudos que avaliem tais parâmetros em populações diversas, principalmente a brasileira, caracterizada pela grande miscigenação desde a época de sua colonização, assim distinguindo-a dos demais países.

Vários estudos têm avaliado os efeitos destes e outros polimorfismos sobre o risco de muitos tipos de cânceres, e muitas vezes os resultados são divergentes, evidenciando a grande complexidade funcional existente no processo carcinogênico. Para o câncer gástrico, estes dados ainda são muito escassos, com apenas alguns estudos em chineses (SHEN et al., 2000; SHEN et al., 2004; RATNASINGHE et al., 2004) e coreanos (LEE et al., 2002), em que a freqüência dessa neoplasia é bastante elevada.

O presente trabalho consiste também na primeira avaliação simultânea desses três polimorfismos em pacientes com câncer gástrico e gastrite crônica, uma lesão do

estômago, que apesar de benigna é muito freqüente na população e comumente acompanhada pela infecção com a bactéria *H. pylori*, um potente carcinógeno (IARC, 1994), que aumenta em até 10 vezes o risco de câncer de estômago (GENTA, 1998).

Como relatado para outras populações não foi verificada associação dos polimorfismos dos genes *XRCC1* e *XRCC3* com o risco de câncer gástrico e gastrite crônica na população brasileira. Por exemplo, em populações coreana (LEE et al., 2002) e chinesa (RATNASINGHE et al., 2004), os polimorfismos dos códons 194 e 399 do gene *XRCC1* não foram mais freqüentes nos pacientes com câncer gástrico do que nos controles. Porém, em um único estudo na população chinesa, Shen et al. (2000) observaram uma associação entre estes dois polimorfismos e aumento de risco para o câncer gástrico na região da cárdia. Até o presente, há conhecimento de apenas um estudo que avaliou o efeito do polimorfismo do códon 241 do gene *XRCC3* em câncer gástrico (SHEN et al., 2004) e, da mesma forma que os dados ora obtidos, não evidenciou qualquer associação entre o alelo variante e o risco desta neoplasia.

As diferenças relatadas nos diferentes estudos podem ser devidas a diversos fatores, como a localização do câncer gástrico em diferentes regiões do estômago, que pode estar relacionada com alterações genéticas distintas, conforme os fatores ambientais desencadeantes. Neste estudo, a maioria dos tumores estavam localizados no antro e no corpo gástricos, que são comumente associados com infecção pela *H. pylori*. Também deve ser considerado o tamanho da amostra avaliada, que em alguns estudos, por ser reduzida, pode não manifestar diferenças estatísticas entre caso e controle. No presente trabalho foram analisados cerca de 200 indivíduos em cada grupo e seus respectivos controles, um número considerável quando comparado aos relatados na literatura. Por exemplo, outros estudos em câncer gástrico avaliaram cerca de 190 indivíduos (SHEN et al., 2000; LEE et al., 2002; SHEN et al., 2004) e apenas um apresentou número inferior, de 90 indivíduos

(RATNASINGHE et al., 2004). Também deve-se destacar que diferentes polimorfismos, em outros sistemas de reparo ou na metabolização de xenobióticos, podem interagir na suscetibilidade aos diversos tipos de câncer.

Em gastrite crônica, ainda não há relatos de estudos que investigaram a associação com esses polimorfismos de genes de reparo, como já descrito para alguns genes de metabolização como *GSTM1, GSTT1* e *CYP1A1* nas populações brasileira (COLOMBO et al., 2004) e chinesa (SETIAWAN et al., 2000). Apesar de não ter se constatado diferenças estatísticas para os alelos variantes 194Trp, 399Gln e 241Met nos genes *XRCC1* e *XRCC3*, respectivamente, no grupo de gastrite crônica quando foi investigada a interação intragênica e intergênica, verificou-se que a combinação dos três alelos variantes pode estar associada com o desenvolvimento desta lesão, quando comparado com o grupo de câncer gástrico. Assim, uma deficiência na capacidade de reparo do DNA devido a estes polimorfismos, pode permitir o acúmulo de danos ao DNA derivados de diversos fatores endógenos e exógenos, aumentado o risco de carcinogênese do estômago.

As proteínas XRCC1 e XRCC3 atuam, respectivamente, nas vias de reparo por excisão de bases e reparo por recombinação homóloga, responsáveis principalmente pela remoção de danos como adutos de DNA, SSB (Single Strand Break), DSB (Double Strand Break) e bases danificadas, originados por processos endógenos ou induzidos por carcinógenos ambientais, como os provenientes do tabaco. Durante o processo de reparo, estas proteínas interagem com outras que exercem funções específicas e importantes, tornando-se então, essenciais para o funcionamento adequado destas vias. Alguns estudos têm sugerido que os polimorfismos dos códons 399 do gene *XRCC1* e 241 do gene *XRCC3*, podem estar associados com fenótipos de múltiplos danos ao DNA em células e tecidos humanos. Por exemplo, Lunn et al. (1999) descreveram que o alelo 399Gln estava associado com aumento dos níveis de adutos aflatoxina-DNA em tecido placental, enquanto Duell et al.



(2000) associou este mesmo alelo com adutos polifenol-DNA em células mononucleares sanguíneas e aumento de trocas entre cromátides-irmãs em linfócitos de fumantes. Para o alelo 241Met, Matullo et al. (2001a) relacionaram com adutos de DNA em linfócitos em indivíduos saudáveis. Deste modo, a variação na capacidade de reparo do DNA devido a estes polimorfismos, pode modular o efeito genotóxico de fatores ambientais como os metabólitos do cigarro e do álcool.

No estudo ora realizado, foi verificada uma associação entre o alelo variante 194Trp do gene *XRCC1* e tabagismo no grupo com gastrite crônica, enquanto os alelos 399Gln do gene *XRCC1* e 241Met do gene *XRCC3* foram associados ao tabagismo e etilismo em ambos grupos com gastrite crônica e câncer gástrico. Os diversos carcinógenos presentes no tabaco, como aminas aromáticas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (NEWCOMB; CARBONE, 1992), bem como metabólitos reativos formados durante a metabolização do etanol (BROOKS, 1997), podem provocar danos à molécula de DNA e, deste modo, aumentar a suscetibilidade ao câncer quando os sistemas de reparo do DNA estão prejudicados devido à presença de variantes genéticas. Muitos trabalhos têm indicado o tabagismo e o etilismo na etiologia do câncer gástrico (ZARIDZE et al., 2000; MUNÕZ et al., 2001), porém, até o presente, nenhum estudo havia descrito uma associação entre os polimorfismos dos genes *XRCC1* e *XRCC3* com esses fatores ambientais na carcinogênese gástrica.

Embora não tenha sido encontrada uma associação direta entre os polimorfismos dos códons 194 e 399 do gene *XRCC1* e códon 241 do gene *XRCC3* com o risco de gastrite crônica e câncer gástrico neste trabalho, foi verificada uma forte interação entre estes polimorfismos e fatores ambientais, que podem atuar na suscetibilidade à estas lesões, devendo ser destacada a interação entre os três alelos variantes aqui estudados com o risco de gastrite crônica. A escassez de estudos sobre polimorfismos de genes de reparo do DNA neste tipo de neoplasia revela a importância deste estudo e justifica outros que avaliem

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

os aspectos funcionais destes e outros genes de reparo e metabolização na suscetibilidade ao câncer.

# VI - CONCLUSÕES

## VI – Conclusões

1. Os polimorfismos dos códons 194 e 399 do gene *XRCC1* e do códon 241 do gene *XRCC3* em indivíduos saudáveis da população brasileira apresentam freqüências similares entre sexo e etnia (caucasóides e negróides), mas diferem das descritas para outras populações como a asiática, mostrando variabilidade étnica;

2. Não há uma associação direta entre os polimorfismos avaliados e suscetibilidade à gastrite crônica e câncer gástrico. Contudo é observado um risco maior de gastrite crônica com a combinação dos três polimorfismos, evidenciando uma interação intra e intergênica;

3. Os fatores ambientais como tabagismo e etilismo, que exercem papel importante na carcinogênese do estômago, podem interagir com os alelos variantes dos genes *XRCC1* e *XRCC3* e aumentar o risco para gastrite crônica e o câncer gástrico. Contudo, a infecção pela *H. pylori* apesar de ser um potente carcinógeno gástrico, não mostrou associação com os polimorfismos avaliados.

unesp

# VII - RESUMO

## VII - Resumo

Os sistemas de reparo do DNA atuam corrigindo danos causados por compostos de origem endógena ou exógena e erros do processo de replicação. A capacidade de reparo reduzida, devido à mutações ou polimorfismos em genes que codificam as diferentes enzimas de reparo do DNA, pode constituir um fator de risco para muitas doenças humanas inclusive o câncer. O câncer gástrico, uma das neoplasias com maior taxa de incidência e mortalidade mundialmente apresenta etiologia complexa, mas fatores ambientais relacionados principalmente com a dieta, estilo de vida como o consumo de álcool e tabaco e a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, exercem importantes funções, pois são fontes de danos no material genético. Neste estudo, foram determinadas as freqüências dos polimorfismos dos códons 194 e 399 do gene de reparo de excisão de bases *XRCC1* e do códon 241 do gene de reparo por recombinação homóloga *XRCC3* em indivíduos saudáveis, pacientes com câncer gástrico e gastrite crônica, uma lesão benigna que aumenta o risco desta neoplasia. Também avaliou-se a interação desses polimorfismos com fatores ambientais e susceptibilidade à estas lesões. A genotipagem de 202 indivíduos com gastrite crônica (GC), 160 com câncer gástrico (CG) e 300 indivíduos saudáveis (C) foi realizada pela técnica de PCR-RFLP. No grupo controle a freqüência do alelo variante para os códons 194, 399 e 241 foi 0,07, 0,33 e 0,35, respectivamente. Estas freqüências não apresentaram diferenças estatísticas entre sexo e etnia (caucasóides e negróides), mas foram distintas das descritas para outras populações como chineses, taiwaneses, egípcios e coreanos, evidenciando variabilidade étnica. Da mesma forma, não houve diferenças significantes dessas freqüências alélicas entre os grupos GC (0,07, 0,29 e 0,34), CG (0,06, 0,33 e 0,31) e os controles. Entretanto, a ocorrência dos três polimorfismos simultaneamente contribuiu para aumentar o risco de gastrite crônica (p=0,0372). O alelo variante 194Trp foi associado com tabagismo no grupo

de gastrite crônica (OR=0,24, 95%IC=0,06-0,86), enquanto o polimorfismo 399Gln foi associado ao tabagismo e etilismo nos grupos de gastrite crônica (OR=0,49, 95%IC=0,28-0,85 e OR=0,38, 95%IC=0,19-0,74) e câncer gástrico (OR=0,28, 95%IC= 0,15-0,54 e OR=3,84, 95%IC=1,59-9,09), quando comparados aos respectivos grupos controles. O alelo 241Met do gene *XRCC3* também foi associado ao tabagismo e etilismo nos grupos de gastrite crônica (OR=0,41, 95%IC=0,24-0,70 e OR=0,47, 95%IC=0,25-0,90) e câncer gástrico (OR=0,37, 95%IC=0,19-0,72 e OR=0,23, 95%IC=0,11-0,46). Este trabalho apesar de não evidenciar uma associação direta entre os polimorfismos dos genes *XRCC1* e *XRCC3* com suscetibilidade à gastrite crônica e câncer gástrico, mostra pela primeira vez na população brasileira, uma interação intra e inter gênica dos alelos variantes 194Trp e 399Gln do gene *XRCC1* e 241Met do gene *XRCC3* e o risco de gastrite crônica, uma lesão pré-cancerosa. Ainda foi evidenciada a interação gene-ambiente entre estes polimorfismos e o consumo de cigarro e álcool, dois potentes fatores de risco, que podem conjuntamente contribuir para o desenvolvimento do processo carcinogênico.

Palavras chave: câncer gástrico, gastrite crônica, polimorfismos, reparo do DNA, *XRCC1*, *XRCC3*.

# VIII - ABSTRACT

## VIII - Abstract

DNA repair systems act by correcting damages of endogenous or exogenous origin and errors of the replication process. A reduced repair capacity, due to mutations or polymorphisms in genes that encode the different DNA repair enzymes, can constitute a risk factor for many human diseases besides cancer. Gastric cancer, one of the types of cancer with the highest incidence and mortality rates worldwide, has a complex etiology, but environmental factors related mainly to diet, lifestyle (such as the consumption of alcohol and tobacco) and infection by the bacterium *Helicobacter pylori*, play an important role, because they are sources of damage to the genetic material. In this study, we determined the frequencies of the polymorphisms of codons 194 and 399 in the base excision repair gene *XRCC1* and of codon 241 in the homologous recombination repair gene *XRCC3*, in healthy individuals and in patients with gastric cancer and chronic gastritis, a benign lesion that increases the risk of gastric cancer. The interaction of these polymorphisms with environmental factors and susceptibility to these lesions was also evaluated. Genotyping of 202 subjects with chronic gastritis (CG), 160 with gastric cancer (GC), and 300 healthy individuals (C) was accomplished using the PCR-RFLP technique. In the control group, the variant allele frequencies for codons 194, 399 and 241 were 0.07, 0.33 and 0.35, respectively. These frequencies did not present statistical differences regarding sex and ethnicity (Caucasian and Negroid), but they were different from those found in other populations, such as Chinese, Taiwanese, Egyptian and Korean, evidencing ethnic variability. Likewise, there were no significant differences regarding these allele frequencies among the groups CG (0.07, 0.29 and 0.34), GC (0.06, 0.33 and 0.31) and the controls. However, the simultaneous occurrence of the three polymorphisms contributed to increase the risk of chronic gastritis (p=0.0372). The variant allele 194Trp was associated with cigarette smoking in the chronic

gastritis group (OR=0.24, 95%CI=0.06-0.86), while the 399Gln polymorphism was associated with smoking and drinking in the groups with chronic gastritis (OR=0.49, 95%CI=0.28-0.85 and OR=0.38, 95%CI=0.19-0.74) and gastric cancer (OR=0.28, 95%CI=0.15-0.54 and OR=3.84, 95%CI=1.59-9.09), when compared to the respective control groups. Allele 241Met of the *XRCC3* gene was also associated with smoking and drinking in the groups with chronic gastritis (OR=0.41, 95%CI=0.24-0.70 and OR=0.47, 95%CI=0.25-0.90) and gastric cancer (OR=0.37, 95%CI=0.19-0.72 and OR=0.23, 95%IC=0.11-0.46). This work, although it does not show any direct association between the polymorphisms of the *XRCC1* and *XRCC3* genes and susceptibility to chronic gastritis and gastric cancer, it however shows for the first time in the Brazilian population an intra- and inter-gene interaction of the variant alleles *XRCC1* 194Trp and 399Gln and *XRCC3* 241Met and the risk of chronic gastritis, a precancerous lesion. Moreover, a gene-environment interaction was evidenced between these polymorphisms and the consumption of tobacco and alcohol, two major risk factors that jointly can contribute to trigger the carcinogenic process.

Key words: gastric cancer, chronic gastritis, polymorphisms, DNA repair, *XRCC1*, *XRCC3*.

# IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## IX - Referências Bibliográficas

ABDEL-RAHMAN, S.Z.; NOURALDEEN, A.M.; AHMED, A.E. Molecular interaction of 2,3-[14C]-acrylonitrile with DNA in gastric tissues of rat. *J. Biochem.. Toxicol.*, v.9, p.121-128, 1994.

ABDEL-RAHMAN, S.Z. et al. Inheritance of the 194*Trp* and the 399*Gln* variant alleles of the DNA repair gene *XRCC1* are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett.*, v.159, p.79-86, 2000.

ABDEL-RAHMAN, S.Z.; EL-ZEIN, R.A. The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett.*, v.159 (1), p.63-71, 2000.

BAUMANN, P.; WEST, S.C. The human Rad51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. *EMBO J.*, v.16, p.5198-5206, 1997.

BERTRAM, C.G. et al. An assessment of a variant of the DNA repair gene XRCC3 as a possible nevus or melanoma susceptibility genotype. *J. Invest. Dermatol.*, v.122, p.429-432, 2004.

BEVAN, S.; HOULSTON, R.S. Genetic predisposition to gastric cancer. *Q. J. Med.*, v.92, p.5-10, 1999.

BISHOP, D.K. et al. Xrcc3 is required for assembly of Rad51 complexes in vivo. *J. Biol. Chem.*, v.273, p.21482-21488, 1998.

BRENNEMAN, M.A. et al. *XRCC3* is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination. *Mutat. Res.*, v.459, p.89-97, 2000.

BRENNEMAN, M.A. et al. XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. *Mol. Cell*, v.10, p.387-395, 2002.

BROOKS, P.J. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity - a review. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v.21 (6), p.1073-1082, 1997.

BUTKIEWICZ, D. et al. Identification of four single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes: XPA and XPB (ERCC3) in Polish population. *Hum. Mutat.*, v.15 (6), p.577-578, 2000.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

BUTKIEWICZ, D. et al. Genetic polymorphism in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis,* v.22, p.593-597, 2001.

CALDECOTT, K.W. et al. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res.*, v.24 (22) p.4387-4394, 1996.

CALDECOTT, K.W. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair,* v.2, p.955-969, 2003.

CHAVANNE, F. et al. Mutations in the *XPC* gene in families with xeroderma pigmentosum and consequences at the cell, protein and transcript levels. *Cancer Res.*, v.60, p.1974-1982, 2000.

CHELI, R.; GIACOSA, A. Atrophic Gastrits. In: Sherlock P., Morson B.C., Barbara L., Veronesi U. eds. *Precancerous Lesions for the Gastrointestinal Tract.* New York: Raven Press, 1983.

CHEN, X. et al. Variation in gene expression patterns in human gastric cancers. *Mol. Biol. Cell,* v.14, p.3208-3215, 2003.

CHRISTMANN, M. et al. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology,* v.193 (1-2), p.3-34, 2003.

COLOMBO, J. et al. *GSTT1, GSTM1* and *CYP2E1* genetic polymorphisms in gastric cancer and chronic gastritis in a Brazilian population. *World J. Gastroenterol.*, v.10(9), p.1240-1245, 2004.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.*, v.52 (24), p.6735-6740, 1992.

CORREA, P. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. *Am. J. Surg. Pathol.*, v.19 (Suppl 1), p.S37-43, 1995.

CORREA, P. The biological model of gastric carcinogenesis. In: Buffer, P., Rice, J., Bird, M., Boffetta, P. eds. *Mechanisms of carcinogenesis: Contribution of molecular epidemiology.* Lyon: IARC Scientific Publications, n°157, 2004.

COTRAN, R.S.; ROBBINS, S.L.; KUMAR, V. Pathologic basis of disease. 6ª ed., Philadelphia: W.B. Sauders Company, 1999, 1425p.

CRAWFORD, K.W.; SHIELDS, P.G. Cancer susceptibility genes. In: Miller, M.S., Cronin, M.T. eds. *Genetic polymorphisms and susceptibility to disease.* New York: Taylor & Francis, p. 89-107, 2000.

CUI, X. et al. The XRCC2 and XRCC3 repair genes are required for chromosome stability in mammalian cells. *Mutat. Res.*, v.434, p.75-88, 1999.

DAIKER, D.H. et al. Effect of CYP2E1 induction by ethanol on the immunotoxicity and genotoxicity of extended low-level benzene exposure. *J. Toxicol. Envoron. Health A,* v.59(3), p.181-196, 2000

DAVID-BEABES, G.L.; LUNN, R.M.; LONDON, S.J. No association between the XPD (Lys751Gln) polymorphism or the XRCC3 (Thr241Met) polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, v.10, p.911-912, 2001.

DAVID-BEABS, G.L.; LONDON, S.J. Genetic polymorphism of *XRCC1* and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians. *Lung Cancer,* v.34, p.333-339, 2001.

DIANOV, G.L. et al. Repair of abasic sites in DNA. *Mutat. Res.,* v.531, p.157-163, 2003.

DIVINE, K.K. et al. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat. Res.*, v.461, p.273-278, 2001.

DRUMMOND, J.T.; BELLACOSA, A. Human DNA mismatch repair in vitro operates independently of methylation status at CpG sites. *Nucleic Ac. Res.*, v.29(11), p.2234-2243, 2001.

DUAN, Z. et al. DNA repair gene *XRCC3* 241Met variant is not associated with risk of cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.,* v.11, p.1142-1143, 2002.

DUARTE, M.C.; CONFORTI, N.D.; SILVA, A.E. Mecanismos de reparo do DNA e câncer. *Revista Sociedades Brasileiras de Câncer*, ano 1, n.3, p.36-46, 2004.

DUELL, E.J. et al. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis,* v.21, p.965-971, 2000.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

DUELL, E.J. et al. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, v.10 (3), p.217-222, 2001.

FORD, E.B. Polymorphism and taxonomy. In: J. Huxley (org). *The New Sistematics.* Claredon Press, 1940.

FULLER, L.F.; PAINTER, R.B. A Chinese hamster ovary cell line hypersensitive to ionizing radiation and deficient in repair replication. *Mutat. Res.*, v.193, p.109-121, 1988.

GENTA, R.M. Review article: gastric atrophy and atrophic gastritis – nebulous concepts in search of a definition. *Aliment Pharmacol. Ther.*, v.12 (1), p. 17-23, 1998.

GOODE, E.L.; ULRICH, C.M.; POTTER, J.D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, v.11, p.1513-1530, 2002.

HAN, J. et al. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and breast cancer risk in the nurse's health study. *Carcinogenesis,* v.25 (2), p.189-195, 2003.

HAN, J. et al. Genetic variation in *XRCC1*, sun exposure, and risk of skin cancer. *Brit. J. of Cancer,* v.91, p.1604-1609, 2004.

HANSEN, W.K.; KELLEY, M.R. Review of mammalian DNA repair and translational implications. *JPET,* v.295 (1), p.1-9, 2000.

HEAVEY, P.M.; ROWLAND, I.R. Gastrointestinal cancer. *Best Practice & Res. Clinical Gastroenterol.*, v.18 (2), p.323-336, 2004.

HOHENBERGER, P.; GRETSCHEL, S. Gastric cancer. *The Lancet,* v.362, p.305-315, 2003.

HU, J.J. et al. Symposium overview: genetic polymorphisms in DNA repair and cancer risk. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, v.185, p.64-73, 2002.

IARC – Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, v.61, p.1-241, 1994.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

INCA - Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em www.inca.org.br.

ISHIDA, T. et al. New DNA polymorphisms of human MMH/OGG1 gene: prevalence of one polymorphism among lung-adenocarcinoma patients in Japan. *Int. J. Cancer,* v.80, p.18–21, 1999.

IWANAGA, A. et al. Functional mutation of DNA polymerase B found in human gastric cancer – inability of the base excision repair in vitro. *Mutat. Res.,* v.435, p.121-128, 1999.

JACOBSEN, N.R. et al. *XRCC3* polymorphisms and risk of lung cancer. *Cancer Lett.,* v.213, p.67-72, 2004.

KATO, S. et al. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res.,* v.52, p.6712-6715, 1992.

KELLEY, J.R.; DUGGAN, J.M. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J. of Clinical Epidemiol.,* v.56, p.1-9, 2003.

KNUDSON, A.G. Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. *Cancer Res.*, v.45, p.1437-1443, 1985.

KOBAYASHI, M. et al. Vegetables, fruit and risk of gastric cancer in Japan: a 10-year follow-up of the JPHC Study Cohort I. *Int .J. Cancer,* v.102 (1), p.39-44, 2002.

KROKAN, H.E. et al. Base excision repair of DNA in mammalian cells. *Febs Lett.*, v.476, p.73-77, 2000.

KURCHEL, B. et al. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Human Mol. Genet.*, v.11(2), p.1399-1407, 2002.

KURUMIZAKA, H. et al. Homologous-pairing activity of the human DNA repair proteins XRCC3-Rad51C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.98, p.5538-5543, 2001.

LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, v.64, p.31-49, 1965.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

LEE, J.M. et al. Genetic polymorphism of XRCC1 and risk of esophageal cancer. *Int. J. Cancer*, v.95, p.240-246, 2001.

LINDAHL, T.; WOOD, D. Quality control by DNA repair. *Science*, v.286, p.18981905, 1999.

LINDHAL, T. Supression of spontaneous mautagenesis in human cells by DNA base excision-repair. *Mutat. Res.*, v.462, p.129-135, 2000.

LUNN, R.M. et al. *XRCC1* polymorphisms: Effects an Aflatoxin B1-DNA adducts and Glicophorin A variant frequency. *Cancer Res.*, v.59, p.2557-2561, 1999.

MARINTCHEV. A. et al. Solution structure of the single-strand break repair protein XRCC1 N-terminal domain. *Nat. Struct. Biol.*, v.6 (9), p.884-893, 1999.

MASSON, J.Y. et al. Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* v.98, p.8440-8446, 2001.

MATULLO, G. et al. *XRCC1, XRCC3, XPD* gene polymorphisms, smoking and $^{32}$P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis*, v.22, vol.9, p.1437-1445, 2001a.

MATULLO, G. et al. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int. J. Cancer*, v.92, p.562-567, 2001b.

MOHRENWEISER, H.W.; JONES, I.M. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the provises and perils of individual and population risk estimation? *Mutat. Res.*, v.400, p.15-24, 1998.

MOSS, S.F. The carcinogenic effect of H. pylori on the gastric epithelial cell. *J. Physiol. Pharmacol.*, v.50 (5), p.847-56, 1999.

MUÑOZ, N. et al. A case-control study of gastric cancer in Venezuela. *Int. J. Cancer*, v.93, p.417-423, 2001.

NARDONE, G. Review article: Molecular basis of gastric carcinogenesis. *Aliment. Pharmacol.*, vol.17, p.75-81, 2003.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

NEBERT, D.W.; MCKINNON R.A.; PUGA, A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol.*, v.15(4), p.273-280, 1996.

NEWCOMB, P.A.; CARBONE, P.P. The health consequences of smoking. *Cancer. Med. Clin. North Am.*, v.76 (2), p.305-331, 1992.

OLSHAN, A.F. et al. *XRCC1* polymorphisms and head and neck cancer. *Cancer Lett.*, v.178, p.181-186, 2002.

PARK, J.Y. et al. Polymorphism of the DNA repair gene *XRCC1* and risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, v.11, p.23-27, 2002.

PARKIN, D.M.; PISANI, P.; FERLAY, J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int. J. Cancer,* v.80, p.827-841, 1999.

PELTOMAKI, P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat. Res.*, v.488, p.77-85, 2001.

PFEIFFER, P. et al. DNA lesions and repair. *Mutat. Res.,* v.366, p.69-80, 1996.

PIERCE, A.J. et al. Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends in Cell Biol. – Review,* v.11(11), p.52-59, 2001.

PRICE, A.B. The Sydney System: histological division. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v.6 (3), p.209-222, 1991.

RAFII, S. et al. A naturally occurring mutation in an ATP-binding domain of the recombination repair gene *XRCC3* ablates its function without causing cancer susceptibility. *Hum. Mol. Genetics,* v.12 (8), p.915-923, 2003.

RATNASINGHE, L.D. et al. Polymorphisms of XRCC1 and risk of esophageal and gastric cardia cancer. *Cancer Lett.,* v.216, p.157-164, 2004.

ROSSIT, A.R.B. et al. Polymorphisms in DNA repair gene *XRCC1* and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older Southeastern Brazilians. *Cancer Lett.,* v.180, p.173-182, 2002.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

SANYAL, S. et al. polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis,* v. 25 (5), p.729-734, 2004.

SASAZUKI, S.; SASAKI, S.; TSUGANE, S. Japan Public Health Center Study Group. Cigarette smoking, alcohol consumption and subsequent gastric cancer risk by subsite and histologic type. *Int. J. Cancer*, v.101(6), p.560-566, 2002.

SCHILD, D. et al. Evidence for simultaneous protein interactions between human RAD51 paralogs. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.16443-16449, 2000.

SCHOKET, B. et al. Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure. *Mutat. Res.*, v.482, p. 57-69, 2001.

SEEBERG, E.; EIDE, L.; BJORAS, M. The base excision repair pathway. *Tibs – Review*, v.20, p.201207, 1995.

SETIAWAN, V.W. et al. GSTT1 and GSTM1 null genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study in a Chinese population. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, v.9, p.73-80, 2000.

SHEN, M.R.; JONES, L.M.; MOHRENWEISER, H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.*, v.58, p.604-608, 1998.

SHEN, H. et al. Polymorphism of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int. J. Cancer*, v.88, p.601-606, 2000.

SHEN, H. et al. Polymorphisms of DNA repair gene *XRCC3* Thr241Met and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Cancer Lett.s*, v.206, p.51-58, 2004.

SHIELDS, P.G.; HARRIS, C.C. Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. *J. Clin. Oncol.*, v.18, p.2309-2315, 2000.

SMITH, T.R. et al. Polymorphisms of *XRCC1* and *XRCC3* genes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Lett.*, v.190(2), p.183-190, 2003.

STADTLÄNDER, C.T.K-H.; WATERBOR, J.W. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis,* v.20 (12), p.2195-2207, 1999.

STEPHENS, E.A. et al. Ethnic variation in the CYP2E1 gene, polymorphisms analysis of 695 African-Americans, European Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics,* v.4, p.185-92, 1994.

STERN, M.C. et al. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, v.10, p.125-131, 2001.

STURGIS, E.M. et al. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, v.20, p.2125-2129, 1999.

TAHARA, E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. In: Buffer, P., Rice, J., Bird, M., Boffetta, P. eds. *Mechanisms of carcinogenesis: Contribution of molecular epidemiology.* Lyon: IARC Scientific Publications, nº157, 2004.

TANG, D. et al. Polymorphisms in the DNA repair enzyme XPD are associated with increased levels of PAH-DNA adducts in a case-control study of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.,*v.75(2), p. 159-166, 2002.

TARAMELLI, R.; ACQUATI, F. The human genome project and the discovery of genetic determinants of cancer susceptibility. *Europ. J. Cancer,* v.40 (17), p.2537-2543, 2004.

TEBBS, R.S. et al. Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the *XRCC3* DNA repair gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* v.92, p.6354-6358, 1995.

TERRY, M.B.; GAUDER, M.M.; GAMMON, M.D. The epidemiology of gastric cancer. *Semin. Radiat. Oncol.*, v.12, p.111-127, 2002.

THACKER, J.; ZDZIENICKA, M.Z. The mammalian *XRCC* genes: their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA Repair*, v.2, p.655-672, 2003.

THOMPSON, L.H. et al. Complementation of repair gene mutations on the hemizygous chromosome 9 in CHO: a third repair gene on human chromosome 19. *Genomics,* v.5, p.670-679, 1989.

THOMPSON, L.H. et al. Molecular cloning of the human *XRCC1* gene. *Mol. Cell Biol.*, v.10, p.6160-6171, 1990.

THOMPSON, L.H.; WEST, M.G. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat. Res.*, v.459, p.1-18, 2000.

THOMPSON, L.H.; SCHILD, D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat. Res.*, v.509 (1-2), p.49-78, 2002.

VIDAL, A.E. et al. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J.*, v.20, p.6530-6539, 2001.

VUUREN, A.J. et al. Partial characterization of the DNA repair protein complex, containing the ERCC1, ERCC4, ERCC11 and XPF correcting ativities. *Mutat. Res.*, v.337, p.25-39, 1995.

WILSON, S.H. Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta. *Mutat. Res.*, v.407, p.203-215, 1998.

WINSEY, S.L. et al. A variant within the DNA repair gene *XRCC3* is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res.*, v.60, p.5612-5616, 2000.

WOOD, R.D. et al. Human DNA repair genes. *Science,* v.291, p.1284-1289, 2001.

WU, J. et al. Mismatch repair processing of carcinogen-DNA adducts triggers apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, v.19(12), p.8292-8301, 1999.

WU, A.H. et al. Role of *Helicobacter pylori* CagA+ strains and risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus. *Int. J. Cancer,* v.103 (6), p.815-821, 2003.

YAMADA, N.A. et al. XRCC3 ATPase activity is required for normal XRCC3-Rad51C complex dynamics and homologous recombination. *J. Biol. Chem.,* v.279 (22), p.23250-23254, 2004.

YU, H-P. et al. DNA repair gene *XRCC1* polymorphisms, smoking, and esophageal cancer risk. *Cancer Detec. And Prev.,* v.28 (3), p.194-199, 2004.

ZARIDZE, D. et al. V. Alcohol consumption, smoking and risk of gastric cancer: case-control study from Moscow, Russia. *Cancer Causes Control*, v.11 (4), p.363-71, 2000.

Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

T. 1361/05

ZHANG, Z.W.; PATCHETT, S.E.; FARTHING, M.J. Role of Helicobacter pylori and p53 in regulation of gastric epithelial cell cycle phase progression. *Dig. Dis. Sci.*, v.47 (5), p.987-995, 2002.

ZHOU, W. et al. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2*, smoking, and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, v.12, p.359-365, 2003

**Nota:** As referências citadas na introdução e discussão desta dissertação estão de acordo com as normas publicadas pela ABNT de 2002, enquanto que as referências apresentadas nos artigos que compõem este trabalho estão de acordo com as normas propostas pelas respectivas revistas a que foram ou serão submetidos.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023.** Informação e Documentação: Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10520.** Informação e Documentação: Citações em documentos - Apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 14724.** Informação e Documentação: Trabalhos Acadêmicos – Apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

# X – APÊNDICE A

# X- APÊNDICE A

**Questionário do projeto: Interação dos polimorfismos dos genes de reparo *XRCC1* e *XRCC3* com fatores ambientais e suscetibilidade ao câncer gástrico.**

Responsáveis: Mestranda Márcia Cristina Duarte e Profa. Dra. Ana Elizabete Silva (Departamento de Biologia IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto-SP), Dr. Alaor Caetano e Dr. Aldenis Albanese Borim (Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP) e Dr. Durval Renato Wornrath (Fundação Pio XII, Barretos-SP).

## I. IDENTIFICAÇÃO

Nome:.....Prontuário:.....

Data de nascimento:...../...../..... Sexo ( ) F ( ) M

Grupo étnico: ( ) caucasóide ( ) negróide ( ) asiático

Endereço:.....Fone:.....

Cidade:.....Estado:.....

Profissão atual:.....tempo de atuação:.....

Profissão anterior:.....tempo de atuação:.....

## II. DADOS PESSOAIS E FAMILIAIS

- Consumo de bebida alcoólica: ( ) sim ( ) não ( ) ex-etilista

Há quantos anos:.....Tipo de bebida.....dose/dia.....

- Consumo de cigarro: ( ) sim ( ) não ( ) ex-fumante

Há quanto anos:.....Quantidade (un/dia):.....

- Doenças anteriores:

( ) úlcera ( ) gastrite ( ) câncer (tipo:.....)

( ) outras (tipo:.....)

- Tratamentos anteriores: ( ) sim ( ) não

Tipo:.....

- Cirurgias anteriores: ( ) sim ( ) não

Tipo:.....

- Uso de medicamentos: ( ) sim ( ) não

Tipo:.....

História de câncer ou outras doenças na família (grau de parentesco)

( ) câncer (tipo:.....) ( ) úlcera ( ) gastrite

( ) outras (tipo:.....)

Data:...../...../..... Responsável pelo procedimento:.....


cm 1 2 3 4 5 6 7
unesp
11 12 13 14 15 16 17 18