

Rosa Maria do Vale Bosso

Investigação de Biomarcadores de Suscetibilidade e
de Exposição Ambiental em Indivíduos
Ocupacionalmente Exposto à Queima de Canaviais



1910001340



Entregue em
31/01/04

Rosendo





ROSA MARIA DO VALE BOSSO

**INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES DE SUSCETIBILIDADE E
DE EXPOSIÇÃO AMBIENTAL EM INDIVÍDUOS
OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS À QUEIMA DE CANAVIAIS**

**Tese apresentada para
obtenção do Título de Doutor
em Genética.**

**São José do Rio Preto - SP
2004**





ROSA MARIA DO VALE BOSSO

**INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES DE SUSCETIBILIDADE E
DE EXPOSIÇÃO AMBIENTAL EM INDIVÍDUOS
OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS À QUEIMA DE CANAVIAIS**



**Tese apresentada para
obtenção do Título de
Doutor em Genética.**

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto

Co-orientadora: Profa. Dra. Lidia Maria Fonte Amorim

São José do Rio Preto - SP

2004



4575.24

20206003

B745i

04/03/2005

Doação

R\$ 25,00

Autor(a)

076/2005

54/05

Bosso, Rosa Maria do Vale.

Investigação de biomarcadores de suscetibilidade e de exposição ambiental em indivíduos ocupacionalmente expostos à queimas de canaviais – São José do Rio Preto : [s.n.], 2004
106 f. ; 30 cm.

Orientador: Cláudia Márcia Aparecida Carareto

Co-Orientador: Lidia Maria da Fonte de Amorim

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2. Polimorfismo (Genética) 3. Monooxigenases. 4. Glutathione. 5. Queima de canaviais. 6. CYP1A1. 7. GSTs. I. Carareto, Cláudia Márcia Aparecida. II. Amorim, Lidia Maria da Fonte de. III. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 575.224



O presente 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, sob orientação da Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, com auxílio financeiro do CNPq e bolsa da FAPESP.



Dedico Ainda

À Ricardo, companheiro digno nos mais

dos adjetivos e de meu amor.

Dedico

***À meus pais, Eleny e Santo Bosso, pelo amor,
compreensão, apoio e por não terem medido
esforços para que alcançasse esse objetivo.***

***À minha querida irmã, Paula, pelo carinho e
amizade.***

Agradeço pelo amor que nos une.

Dedico Ainda

**Ao Ricardo, companheiro digno dos mais
sublimes adjetivos e de meu amor.**

Eu sei que vou te amar
Por toda a minha vida eu vou te amar
A cada despedida, eu vou te amar
Desesperadamente.
Eu sei que vou te amar.
E cada verso meu será pra te dizer
Que sei que eu sei que vou te amar por toda a minha vida
Eu sei que vou chorar
A cada ausência tua eu vou chorar
Mas cada volta tua há de apagar
O que essa tua ausência me causou
Eu sei que vou sofrer a eterna disventura de viver
A espera de viver ao lado teu por toda a minha vida.
(Tom Jobim e Vinicius de Moraes)

Agradecimento Especial

De coração agradeço muito aos meus professores e Prof. Dra. Nivea
Dutra Tedeschi Bonfatti Pross, pela orientação e grande parte
deste trabalho. Agradeço também aos meus amigos e familiares
pelo apoio e incentivo.

*Quem nada conhece nada ama.
Quem nada pode fazer, nada compreende.
Quem nada compreende, nada vale. Mas quem
compreende também ama, observa, vê... Quanto
mais conhecimento houver inerente em algo, tanto
maior o amor... Aquele que imagina que todos os
frutos amadurecem ao mesmo tempo, como as
cerejas, nada sabe a respeito das uvas.*

Paracelso

Agradecimentos

A Profa. Dra. Cláudia Márcia Andrade Carareto, pela disponibilidade em aceitar a solicitação de trabalho. Não sou capaz de traduzir em poucas linhas o seu verdadeiro papel durante esse momento de finalização da Tese. Sou grata pela sua eterna contribuição.

A Profa. Dra. Lúcia Maria da Fonte de Amorim, do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal Fluminense RJ, pela orientação deste trabalho. Sou grata pela sua paciência, pelas sugestões e dedicação ao trabalho antes mesmo de ser co-orientadora.

Ao Prof. Dr. Luis Roberto de Souza, do Departamento de Biologia da UERJ RJ, pela possibilidade de trabalhar com ele em seu laboratório.

Agradecimento Especial

Aos Prof. Dr. Carlos Roberto Otonari, Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, Profa. Dra. Daisy Maria Passos Salvador, Profa. Dra. Marília de Araújo Medeiros Faria, pela participação como membros da Banca.

A Profa. Dra. Ana Elizabeth Silva e Profa. Dra. Paula Rahal, pelas valiosas sugestões quando foram membros da Banca de Qualificação.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação e Departamento de Biologia, pela orientação e apoio.

Ao concluir essa etapa quero agradecer à **Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes**, pela orientação de grande parte deste trabalho. Agradeço pela sua valiosa contribuição aos meus primeiros passos nos árduos e difíceis caminhos da Ciência.

Ao Prof. Dr. Alexandre Szwarc, do Departamento de Química e Ciências Ambientais, pela disponibilidade em ajudar sempre que sua ajuda foi necessária.

A Profa. Dra. Sueli Umbuzini, do Departamento de Tecnologia da CITEC, pelas valiosas sugestões ao longo e intensificação dos estudos de autorrevisão.

A todos que integram o Departamento de Zoologia e Botânica, especialmente a Maria Helena Carabozo, pelo apoio.

Aos funcionários da UNICE.Nikue e Conforti, pela pronta ajuda nas listas de recursos de livros e artigos.

Agradecimentos

À **Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto**, pela disponibilidade em aceitar a orientação do trabalho. Não sou capaz de traduzir em poucas linhas o seu verdadeiro papel durante esse momento de finalização da Tese. Sou grata pela sua efetiva contribuição.

À **Profa. Dra. Lidia Maria da Fonte de Amorim**, do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal Fluminense-RJ, pela co-orientação deste trabalho. Sou grata pela sua paciência, pelas sugestões e dedicação ao trabalho antes mesmo de ser co-orientadora.

Ao **Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto**, do Departamento de Bioquímica da UERJ-RJ, pela pronta disposição e confiança que me recebeu em seu laboratório.

Aos **Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron**, **Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza**, **Profa. Dra. Daisy Maria Favero Salvadori**, **Profa. Dra. Marcilia de Araújo Medrado Faria**, pela participação como membros da Banca.

Às **Profa. Dra. Ana Elizabete Silva** e **Profa. Dra. Paula Rahal**, pelas valiosas sugestões quando foram membros da Banca de Qualificação.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação e Departamento de Biologia, pela atenção e colaboração sempre que precisei.

Ao **Prof. Dr. Elizeu Trabuco**, pela colaboração cedendo espaço no Laboratório de Físico-Química do Departamento de Química e Ciências Ambientais.

Ao **Prof. Dr. Maurício Boscolo**, do Departamento de Química e Ciências Ambientais, pela disponibilidade em ajudar sempre que sua ajuda foi solicitada.

À **Profa. Dra. Gisela Umbuzeiro**, do Departamento de Toxicologia da CETESB, pelas valiosas sugestões em relação a interpretação dos ensaios de mutagenicidade.

A todos que integram o Departamento de Zoologia e Botânica, especialmente à **Maria Helena Carabolante**, pelo apoio.

Aos funcionários do IBILCE **Kikue** e **Goulart**, pela preciosa ajuda nas coletas de amostras de urina e sangue.



Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, especialmente a **Rosana**, pelo pronto atendimento e simpatia.

Aos **voluntários** que participaram do estudo cedendo as amostras, sem as quais o trabalho não poderia ter sido realizado.

A todos os integrantes do Departamento de Bioquímica da UERJ-RJ, em especial a **Profa. Dra. Ana Rossini**, pela valiosa colaboração na técnica de GSTP1.

Às colegas de laboratório **Francine, Giulianna, Vivian, Luciane e Nathalia**, pela ajuda e agradável companhia.

Às colegas de pós-graduação **Jucimara Colombo e Geovana Mussi**, pela amizade e companheirismo.

À **Marcela**, do laboratório de Biologia Molecular da FAMERP pela ajuda quando precisei.

À **FAPESP e CNPq** pelo incentivo financeiro.

À **Deus**, por estar aqui, aprendendo e tentando contribuir da maneira que me é possível.



SUMÁRIO

I. Introdução

1- Classificação dos agentes químicos quanto ao potencial tóxico	07
2- Os PAHs e o câncer	09
3- Polimorfismos e correlação entre marcadores de exposição e suscetibilidade	11

II. Objetivos

19

III. Resultados

Capítulo 1. Exposição ambiental aos componentes químicos da fumaça e risco de câncer: estratégias de prevenção	22
---	----

Capítulo 2. Análise dos polimorfismos <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> and <i>GSTP1</i> e <i>CYP1A1</i> em uma população brasileira	30
---	----

Capítulo 3. Efeito dos polimorfismos genéticos <i>CYP1A1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> and <i>GSTP1</i> nos níveis de 1-hidroxipireno urinário e atividade mutagênica da urina de cortadores de cana-de-açúcar	51
---	----

IV. Discussão

77

V. Conclusões

85

VI. Referências

87

VII. Resumo

98

VIII. Abstract

100

IX. Anexos

102



I. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido pela Índia e Austrália. Aproximadamente, 55% da cana brasileira transformam-se em álcool e 45%, em açúcar. A cana é plantada no Centro-Sul e no Norte-Nordeste, permitindo dois períodos de safra, portanto, produz-se o ano todo. Em vista disso, na década de 70, foi implantado o PROALCOOL, um programa desenvolvido pelo governo brasileiro, com a finalidade de incentivar a utilização do álcool como combustível automobilístico. A partir de então, o Brasil, sustentado pela agroindústria canavieira, tem sido o pioneiro na utilização desse combustível renovável. Dentre os estados brasileiros, o de São Paulo gera 61% da produção de álcool, permitindo ao país continuada economia de divisas, em um ritmo médio de 1,8 bilhões de dólares anuais. De modo similar, esse estado produz 60% de todo o açúcar nacional, que por ser produto competitivo no mercado internacional, torna o estado responsável por 70% das exportações. Além disso, da cana-de-açúcar origina-se a energia elétrica, co-gerada no processo de queima do bagaço (http://www.única.com.br/pages/sociedade_desenvol1.asp).

Para produzir açúcar e álcool, a área de cana colhida no Estado de São Paulo, na safra 2003/2004, foi de aproximadamente 2,45 milhões de hectares, o que proporcionou empregar cerca de 400 mil pessoas no campo e nas usinas. Isso significa 40% do emprego rural do Estado (<http://www.única.com.br/files/informacaounica/unica57.pdf>)

No Brasil, para facilitar o corte da cana-de-açúcar, costuma-se queimar previamente os canaviais. Desse processo origina-se uma fuligem que permanece por certo tempo no ar e tem sido apontada, pelos próprios cortadores de cana, como responsável pelo aumento de problemas respiratórios. Além desse fato, os poluentes originados dessa operação são levados de acordo com a direção do vento, contaminando não apenas os trabalhadores rurais, mas o ambiente como um todo, que inclui os moradores de municípios vizinhos.

Do processo de queima de canaviais são formados, dentre outros poluentes, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (*polycyclic aromatic hydrocarbons* - PAHs), compostos conhecidos por sua ação mutagênica e/ou carcinogênica, ocorrendo primariamente como resultado da combustão e pirólise, a partir de matéria orgânica (SCHOKET, 1999).

A combustão é um processo químico de oxidação que ocorre em uma taxa suficientemente rápida para produzir elevação da temperatura originando calor ou chama (HARTZELL, 1996). O processo de combustão envolve três estágios designados como ignição, flamejamento e combustão lenta. A ignição é o processo inicial em que se observam pequenas chamas. No segundo estágio, a combustão é mais eficiente e há emissão de dióxido de carbono (CO_2), nitrogênio (N_2), água (H_2O), óxido nítrico (NO_x) e dióxido de enxofre (SO_2). No terceiro estágio, ocorre um processo de baixa temperatura e ausência de chama, com a emissão de grandes quantidades de compostos oxidados incompletamente, tais como, monóxido de carbono (CO), metano (CH_4) e outros hidrocarbonetos particulados. Entre os dois últimos estágios tem-se a formação de acetileno (C_2H_2) e cianogênio (NCCN). O acetileno sofre polimerização, via radicais livres, até a formação dos núcleos aromáticos, dando origem aos PAHs. Alguns PAHs contendo menor número de anéis aromáticos como naftaleno, fenantreno e antraceno reagem formando outros PAHs de maior peso (HEPP et al., 1995).

Os PAHs são moléculas orgânicas formadas por átomos de hidrogênio e carbono. A maior fonte de tais compostos compreende a emissão de materiais particulados em consequência da queima de plantações agrícolas, da fumaça do cigarro, da combustão do carvão, dos motores de veículos e da produção de coque (VAN HOUDT, 1990; LEWTAS et al., 1992). Desse modo, são compostos encontrados no ambiente ocupacional e residencial e, em consequência da dispersão das cinzas, atinge o homem via inalação, dérmica ou pela água de rios contaminados (DEPORTES et al., 1995). Representam uma classe importante de poluentes ambientais, pois as lesões resultantes das ligações desses compostos com o DNA, quando não reparadas, poderão iniciar o processo carcinogênico (BARTSCH, 2000).

A *Environmental Protection Agency* (EPA) e o *National Institute of Occupational Safety and Health* (NIOSH) (NIOSH, 1998; EPA, 1999), dos Estados Unidos, consideram os PAHs como poluentes prioritários para investigação ambiental, cujas estruturas estão representadas na Figura 1.

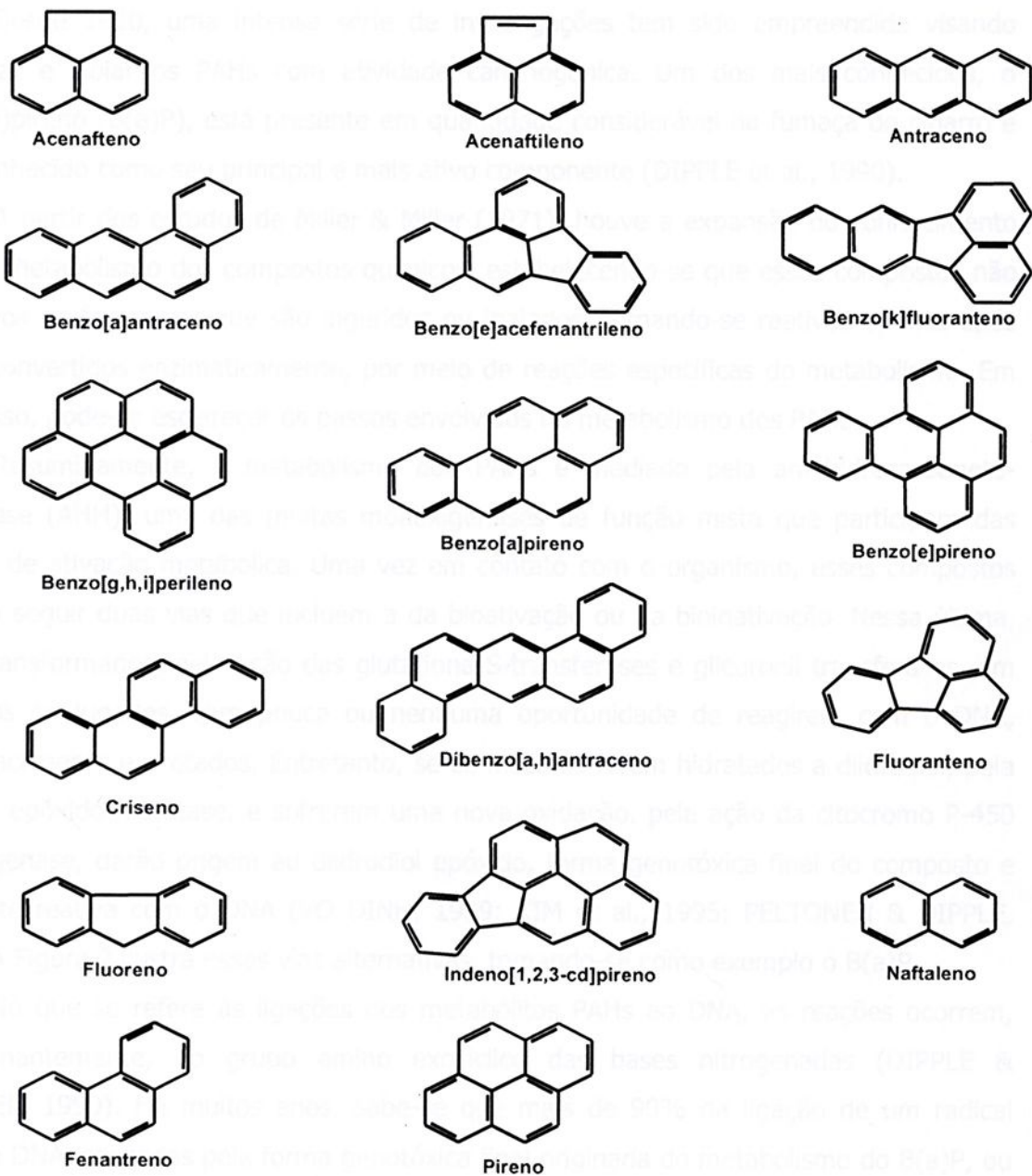


Figura 1 - Estruturas químicas dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) considerados poluentes prioritários pelas agencias do governo americano *Enviromental Protection Agency* (EPA) e o *National Institute of Occupational Safety and Health* (NIOSH).

Essas duas agências do governo norte-americano estão sendo citadas, uma vez que no Brasil não há legislação ambiental e/ou ocupacional em relação aos PAHs.

Desde 1920, uma intensa série de investigações tem sido empreendida visando identificar e isolar os PAHs com atividade carcinogênica. Um dos mais conhecidos, o benzo(a)pireno (B(a)P), está presente em quantidade considerável na fumaça do cigarro e foi reconhecido como seu principal e mais ativo componente (DIPPLE et al., 1990).

A partir dos estudos de Miller & Miller (1971), houve a expansão do conhecimento sobre o metabolismo dos compostos químicos, estabelecendo-se que esses compostos não são ativos na forma em que são ingeridos ou inalados, tornando-se reativos apenas após serem convertidos enzimaticamente, por meio de reações específicas do metabolismo. Em vista disso, pode-se esclarecer os passos envolvidos no metabolismo dos PAHs.

Resumidamente, o metabolismo dos PAHs é mediado pela aril-hidrocarboneto-hidroxilase (AHH), uma das muitas monoxigenases de função mista que participam das reações de ativação metabólica. Uma vez em contato com o organismo, esses compostos poderão seguir duas vias que incluem a da bioativação ou da bioinativação. Nessa última, serão transformados, pela ação das glutathione S-transferases e glicuronil transferases, em produtos conjugados, com pouca ou nenhuma oportunidade de reagirem com o DNA, sendo facilmente excretados. Entretanto, se os mesmos forem hidratados a diidrodiol, pela ação da epóxido hidratase, e sofrerem uma nova oxidação, pela ação da citocromo P-450 monoxigenase, darão origem ao diidrodiol epóxido, forma genotóxica final do composto e altamente reativa com o DNA (VO DINH, 1989; KIM et al., 1995; PELTONEN & DIPPLE, 1995). A Figura 2 ilustra essas vias alternativas, tomando-se como exemplo o B(a)P.

No que se refere às ligações dos metabólitos PAHs ao DNA, as reações ocorrem, predominantemente, no grupo amino exocíclico das bases nitrogenadas (DIPPLE & MOSCHEL, 1990). Há muitos anos, sabe-se que mais de 90% da ligação de um radical alquil ao DNA, causadas pela forma genotóxica final originada do metabolismo do B(a)P, ou seja, o 7,8-dihidrodiol 9,10-epóxido (BPDE), ocorrem no grupo amino exocíclico da guanina. Canella *et al.* (1991) demonstraram que a ligação do BPDE com o DNA resulta de uma abertura *trans* do anel de epóxido pelo grupo amino exocíclico dos resíduos da desoxiguanosina. Outros sítios de alquilação incluem o oxigênio na posição 2, o nitrogênio na posição 7 da guanina, além do grupo amino exocíclico da adenina e citosina (DOERJER et al., 1984).

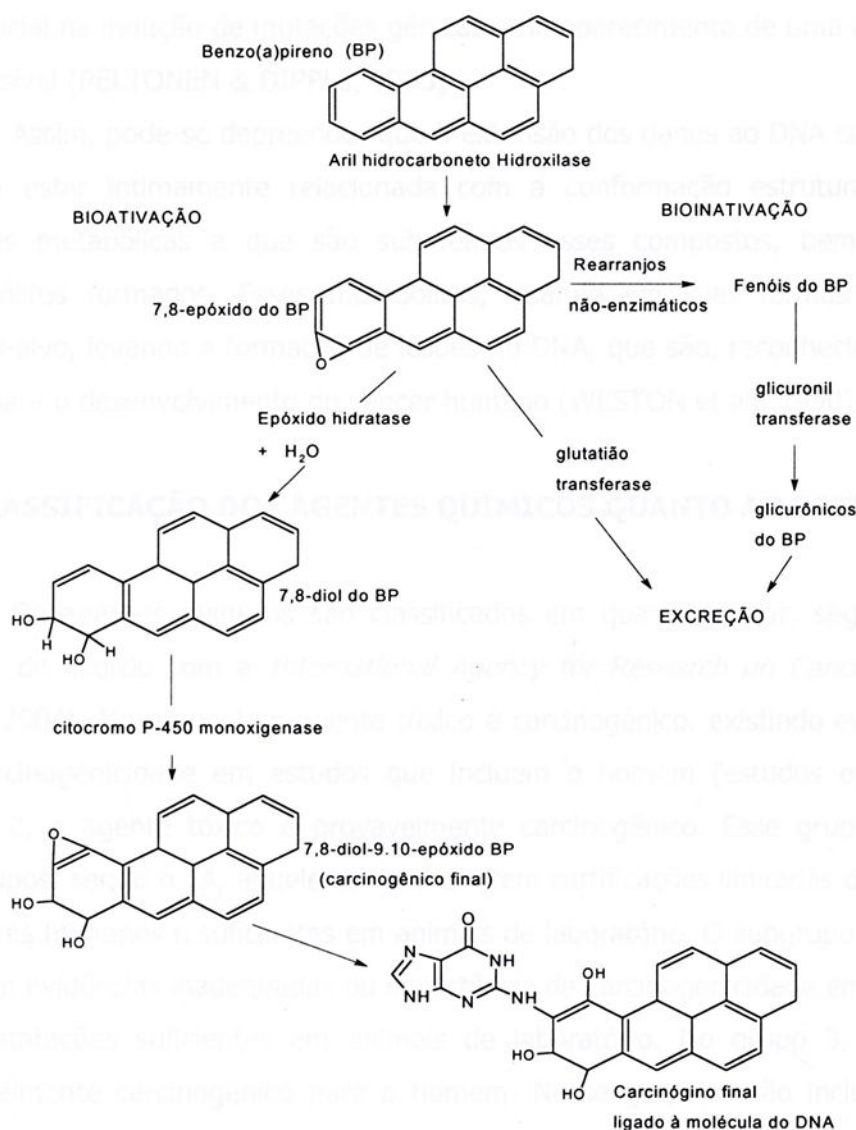


Figura 2 - Etapas do metabolismo do benzo(a)pireno e carcinógeno final ligado à molécula de DNA. Modificado de Wright (1980).

Existe uma significativa diferença na ligação de determinados resíduos de PAHs com o DNA. Essa diferença na reatividade deve-se à estrutura química desses compostos. Por exemplo, o dimetil-benzo(a)antraceno (DMBA) possui um grupo metil na região da baía, o que não ocorre com o B(a)P. Isso permite com que o DMBA reaja semelhantemente, com a desoxiadenosina, bem como a desoxiguanosina e o B(a)P reaja quase que apenas com a desoxiguanosina (DIPPLE et al., 1990; PELTONEN & DIPPLE, 1995). Essas diferenças de conformação podem, presumivelmente, levar a diferenças nas vias em que os adutos de DNA são reparados ou não durante o processo da duplicação celular, conferindo capacidade

diferencial na indução de mutações gênicas e no aparecimento de uma lesão pré-neoplásica irreversível (PELTONEN & DIPPLE, 1995).

Assim, pode-se depreender que a extensão dos danos ao DNA causados pelos PAHs, parece estar intimamente relacionada com a conformação estrutural da molécula, às reações metabólicas a que são submetidos esses compostos, bem como ao tipo de metabólitos formados. Esses metabólitos, quando em suas formas finais, atingem os órgãos-alvo, levando a formação de lesões no DNA, que são, reconhecidamente, fatores de risco para o desenvolvimento do câncer humano (WESTON et al., 1990).

1- CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES QUÍMICOS QUANTO AO POTENCIAL TÓXICO

Os agentes químicos são classificados em quatro grupos, segundo seu potencial tóxico, de acordo com a *International Agency for Research on Cancer* (SAKIARA, 2001; IARC, 2004). No grupo 1, o agente tóxico é carcinogênico, existindo evidências suficientes de carcinogenicidade em estudos que incluem o homem (estudos epidemiológicos). No grupo 2, o agente tóxico é provavelmente carcinogênico. Esse grupo compreende dois subgrupos, sendo o 2A, aquele em que existem certificações limitadas de carcinogenicidade em seres humanos e suficientes em animais de laboratório. O subgrupo 2B é usado quando existem evidências inadequadas ou inexistência de carcinogenicidade em relação ao homem e constatações suficientes em animais de laboratório. No grupo 3, o agente tóxico é possivelmente carcinogênico para o homem. Nesse grupo, estão incluídos os compostos com evidências limitadas em estudos com animais de laboratório e ausência de evidências no homem. Em relação ao grupo 4, o agente tóxico é provavelmente carcinogênico para o homem.

Na Tabela I estão as características mutagênicas e carcinogênicas dos 17 PAHs e sua classificação de acordo com a IARC (WHO, 1998; IARC, 2004).



2 OS PAHS E O CÂNCER

Tabela I- Características mutagênicas e cacinogênicas dos 17 PAHs prioritários pela EPA e NIOSH e sua classificação de acordo com a IARC.

HAP	Mutagenicidade	Carcinogenicidade	Classificação IARC
			(Grupo)
Acenafteno	?	?	X
Acenaftileno	?	Não estudado	X
Antraceno	-	-	3
Benzo(a)antraceno	+	+	2A
Benzo(e)acefenantrileno	+	+	2B
Benzo(k)fluoranteno	+	+	2B
Benzo(g,h,i)perileno	+	-	3
Benzo(a)pireno	+	+	2A
Benzo(e)pireno	+	?	3
Criseno	+	+	3
Dibenzo(a,h)antraceno	+	+	2A
Fluoranteno	+	+	3
Fluoreno	-	-	3
Fenantreno	?	?	3
Indeno(1,2,3-cd)pireno	+	+	2B
Naftaleno	-	?	X
Pireno	?	?	3

(+) positivo, (-) negativo, (?) questionável, (x) sem classificação.
EPA, 1999 (*Enviromental Protection Agency*).
NIOSH,1998 (*National Institute of Occupational Safety and Health*).
IARC (*International Agency for Research on Cancer*), disponível em <http://www.monographs.iarc.fr>.

2- OS PAHS E O CÂNCER

Durante séculos, houve o predomínio da idéia de que a natureza existia somente para satisfazer a vontade humana, sem se questionar o limite desse usufruto. Embora muitos ainda pensem dessa maneira, a cada dia vêem-se sinais de que a sociedade está se conscientizando sobre os danos irreversíveis que a poluição, provocada pelo homem, pode causar ao ambiente e ao próprio indivíduo.

O reconhecimento das propriedades carcinogênicas dos compostos originados do processo de combustão é muito antigo. Em 1775, um cirurgião inglês, Sir Percival Pott, atribuiu a alta incidência de câncer de testículo e da cavidade nasal observada em limpadores de chaminés à prolongada exposição desses indivíduos à fuligem. A observação de Pott foi a base para a primeira medida preventiva contra o câncer ambiental, já que pouco depois de sua publicação, a associação dinamarquesa dos limpadores de chaminés passou a estimular seus membros a tomarem banhos diários e, em 1892, notou-se uma queda na incidência desse tipo de câncer nesses trabalhadores (FRIEDBERG et al., 1995).

A existência de uma íntima relação entre os processos mutagênico e carcinogênico foi primeiramente sugerida por Theodor Boveri, em 1914, que propôs ser o câncer dependente da ocorrência de um evento mutacional. Na verdade, sabe-se hoje que a progressão neoplásica da maioria dos cânceres humanos ocorre como resultado de múltiplos eventos que alteram a mensagem genética da célula incluindo, mutações no DNA, aberrações cromossômicas e modificações epigenéticas. Ao contrário das mutações genéticas, os eventos epigenéticos não envolvem mudanças nas seqüências de nucleotídeos (YAN, et al., 2001) e na estrutura cromossômica (LENGAUER, et al., 1998), mas sim o acesso à transcrição. Tal evento ocorre principalmente por metilação do DNA podendo silenciar genes, interferindo na ligação dos fatores de transcrição (BAAK et al., 2003; BALMAIN et al., 2003). Esses processos afetam, de forma não controlada, a diferenciação e a proliferação celular. Embora na sua fase inicial a neoplasia seja localizada, pode disseminar-se pelo organismo em consequência da capacidade das células cancerosas crescerem em outros tecidos, o que pode ser letal para o indivíduo (LEWIN, 1997; BAAK et al., 2003).

Consideram-se, pelo menos, três etapas nesse processo, desde o momento da agressão química até o aparecimento da neoplasia. Os primeiros eventos representam o passo em que o agente externo é processado metabolicamente pelo organismo e liga-se a macromoléculas como o DNA. Segue-se um ciclo de divisão celular, em que a lesão bioquímica é fixada e transforma as células-alvo em células iniciadas ou mutadas. Essa etapa é chamada "iniciação". Na segunda etapa, designada "promoção", existe uma lesão pré-



neoplásica. Ocorre inativação de genes supressores de tumor e ativação de proto-oncogenes. A “progressão”, terceira etapa da carcinogênese, é entendida como o passo em que podem ocorrer alterações qualitativas no fenótipo celular, levando à transformação de uma lesão benigna em maligna, possivelmente por seleção clonal (COHEN, 1987; SARASIN, 2003).

O tempo entre o efeito iniciador e o aparecimento de um tumor é denominado período de latência e, no homem, parece variar de 10 a 20 anos. Enquanto o acúmulo de mudanças genéticas em células somáticas é considerado essencial para a gênese do câncer, sabe-se que nem todo carcinógeno é genotóxico, podendo participar de modo indireto como promotor durante a carcinogênese (YAMASAKI et al., 1996).

O câncer é um sério problema de saúde pública. Ele é responsável por cerca de dez milhões de novos casos anuais, com seis milhões de mortes a cada ano no mundo. Desse total, 50% dos casos concentram-se em países em desenvolvimento, que disponibilizam apenas 5% de seus recursos para o controle da doença. Caso não haja uma estratégia efetiva de prevenção, detecção e cuidados, no ano de 2020 serão vinte milhões de novos pacientes/ano com a doença, estimando-se uma mortalidade anual de doze milhões (SIKORA, 1999). O câncer no Brasil constitui a segunda causa de morte. Estimou-se para 2003 a ocorrência de 402.190 novos casos e 126.960 óbitos por câncer. Para o Estado de São Paulo foi estimado um total de 147.410 novos casos e 38.040 de óbitos, sendo esperado para o sexo masculino 67.750 novos casos e 20.910 óbitos, enquanto que, para o sexo feminino, foram estimados 79.660 novos casos e 17.130 óbitos (INCA, 2004).

Dados epidemiológicos indicam que a maioria dos cânceres ocorre devido a fatores ambientais. Conseqüentemente, a identificação de carcinógenos é de fundamental importância para a prevenção da doença, sendo os poluentes, como os pesticidas sintéticos e outros compostos químicos produzidos pelo homem, um risco importante de câncer para a população geral (RAMEL, 1991). Realmente, existe forte correlação entre exposição a altas concentrações de PAHs e incidência de câncer de pulmão (DELCLOS et al., 1993; KEOHAVONG et al., 2003), esôfago, cabeça e pescoço e bexiga, que estão ligados, por sua vez, também ao uso do tabaco (BOFFETTA et al., 1997; PINTO et al., 2003; ELCI et al., 2003; HUNG et al., 2004).

Vários estudos têm mostrado que muitos PAHs são mutagênicos em células bacterianas e em células de cultura de mamíferos, além de induzirem aberrações cromossômicas e elevarem a frequência de micronúcleos e de trocas entre cromátides irmãs (MOTYKIEWICZ et al., 1992; HATJIAN et al., 1995). Esses parâmetros são importantes sinais pré-clínicos uma vez que as frequências aumentadas estão diretamente relacionadas com o aumento da incidência do câncer.



A avaliação de amostras de ar das cidades de São Paulo e Cubatão (SATO et al., 1995) e Porto Alegre (VARGAS et al., 1998), utilizando o teste para avaliação de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, sugeriu a presença de nitro-PAHs nesses locais. Além da atmosfera nas grandes cidades e nas indústrias, que contêm altos níveis de poluentes, outros locais têm revelado a presença desses compostos. Zamperlini et al. (1997), por exemplo, utilizando técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, detectou PAHs (do tipo considerado poluente prioritário) na fuligem originada da queima de canaviais. Por meio do teste de Ames (MARON & AMES, 1983), foi demonstrada atividade mutagênica na fuligem sedimentada da cana-de-açúcar, além de índices mais elevados de mutagenicidade em amostras de urina de cortadores de cana, quando comparadas às de controles (BOSSO, 2000). Amre et al. (1999) observaram um risco elevado de câncer de pulmão em trabalhadores rurais de plantações de cana-de-açúcar. Os dados apresentados mostram que a população está exposta a complexas misturas de compostos químicos, principalmente aquelas ricas em PAHs.

3- POLIMORFISMOS E CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES DE EXPOSIÇÃO E SUSCETIBILIDADE

Os marcadores biológicos são indicadores do risco genotóxico e podem ser usados para a detecção precoce de populações de risco, bem como agentes danosos presentes no ambiente. São subdivididos em indicadores de exposição, efeito e de suscetibilidade. De acordo com essa classificação, é possível identificar um indicador biológico em cada passo da substância genotóxica dentro do organismo, desde sua absorção, ataque nucleofílico e conseqüente lesão às moléculas informacionais, fixação do dano e excreção (PAVANELLO & CLONFERO, 2000).

No monitoramento biológico deve ser feita a distinção entre os indicadores de exposição e os de efeito. O primeiro inclui a concentração da substância ou seus metabólitos em fluidos biológicos, a mutagenicidade da substância excretada e o ataque metabólico ao DNA. Tais indicadores têm o propósito de avaliar a absorção do composto em questão e se possível, sua dose interna biologicamente efetiva, que refere-se à sua concentração no organismo. Os indicadores de efeito incluem a detecção de sinais pré-clínicos ou clínicos da doença, como o aumento na frequência de aberrações cromossômicas, a mutação em oncogenes e genes supressores de tumor, que fornecem o grau das alterações de alvos genéticos importantes, como em cromossomos e seqüências gênicas. Por outro lado, os marcadores de suscetibilidade incluem as diferenças individuais



no metabolismo de xenobióticos, no reparo de DNA e a presença de polimorfismos em oncogenes e genes supressores de tumor. Esses são, atualmente, de grande interesse no campo da medicina ambiental, principalmente devido ao seu papel na modulação da resposta individual à exposição a carcinógenos (PAVANELLO & CLONFERO, 2000).

A atividade mutagênica da urina é reconhecida como um marcador de dose interna para detectar exposição recente a compostos mutagênicos (ANDRE et al., 2002). Os testes de mutagenicidade da urina têm sido freqüentemente aplicados em estudos de biomonitoramento de populações expostas à misturas complexas ambiental e/ou ocupacionalmente geradas (CERNÁ et al., 1997; KATO et al., 2004).

O 1-hidroxipireno (1-OHP) é um metabólito do pireno utilizado como indicador biológico da dose interna (biomarcador de exposição) na avaliação da exposição aos PAHs. Sua excreção representa 90% da metabolização do pireno, que é encontrado em 1 a 10% nas misturas de PAHs (JONGENELEN, 1987). O 1-OHP é excretado na urina ligado ao ácido glicurônico, ao contrário dos outros metabólitos dos PAHs, que são excretados principalmente nas fezes (DOR, 1999). Entretanto, cerca de 10 a 25% foram encontrados na urina em forma livre (SINGH, 1995). A utilização do 1-OHP no monitoramento biológico da exposição aos PAHs é vantajosa, devido ao fato do pireno estar presente nas misturas de PAHs em concentrações relativamente altas, ser estável, possuir apenas o pireno como precursor, passível de determinação em urina humana, incluindo populações controles (JONGENELEN, 1994; SORENSEN et al., 2003). Além disso, há correlação entre as concentrações de pireno com o benzo(a)pireno e outros PAHs, sendo assim considerado um bom indicador da exposição aos PAHs (WHO, 1998).

Ao entrar em contato com os PAHs, os indivíduos respondem diferentemente. Isso se deve ao fato de que a maioria dos compostos químicos não é ativa por si só, necessitando de ativação metabólica para tornar-se eletrofílica e interagir-se com as macromoléculas celulares (KRIEK et al. 1998; CHEN et al., 2002). Os adutos de PAHs no DNA podem conduzir a mutações e um alto nível de adutos está associado com um risco aumentado de desenvolver câncer (SORENSEN et al. 2003). Assim sendo, a variação no fenótipo metabólico, que envolve as enzimas de ativação e destoxificação, desempenha um papel importante no desenvolvimento do câncer ambiental. Essa variação está relacionada ao polimorfismo genético, sendo que grande parte desse polimorfismo apresenta relevância clínica e envolve as enzimas metabolizadoras de carcinógenos (PERERA & WEINSTEIN, 2000). Tais enzimas são didaticamente classificadas em duas amplas categorias, as de fase I e as de fase II. As enzimas da fase I envolvem quase que exclusivamente os citocromos P-450 (CYP-450), que catalisam a inserção de um átomo de oxigênio em substratos

relativamente inertes, tornando-os altamente reativos. Por outro lado, as enzimas de fase II, que incluem principalmente as glutathionas S-transferases (GSTs) e UDP-glicosil transferases, reagem com os eletrofílicos finais, que se tornaram reativos na fase I, catalisando a conjugação desses com substratos endógenos, como glutathionas e glicuronídeos, respectivamente. Conseqüentemente, são produzidos intermediários hidrofílicos, facilmente excretáveis da célula, embora tais intermediários também possam ser originados por um processo não enzimático (LANG & PELKONEN, 1999).

O gene humano *CYP1A1* localiza-se no braço longo do cromossomo 15, possuindo sete éxons e seis íntrons (KAWAJIRI et al., 1986). A enzima é induzida principalmente em tecidos extra-hepáticos, pelos vários compostos que possuem capacidade de se ligar ao receptor aril hidroxilase (Ah), responsável pela regulação do gene *CYP1A1*. Entre esses compostos estão incluídas substâncias como dioxinas, benzo(a)pireno e outros PAHs. Ao se ligarem ao receptor Ah no citosol, o complexo é conduzido ao núcleo e a transcrição do gene *CYP1A1* é induzida. O produto gênico do *CYP1A1* possui atividade aril hidrocarboneto hidroxilase (AHH) que catalisa o primeiro passo do metabolismo dos PAHs a compostos eletrofílicos, podendo culminar em metabólitos carcinogênicos (TANINGHER et al., 1999).

Quinze polimorfismos do *CYP1A1* foram descritos (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>), no entanto, três deles vêm sendo mais estudados com relação ao câncer (CYP1A1*2A: proteína CYP1A1.1, CYP1A1*2B: proteína CYP1A1.2 e CYP1A1*4: proteína CYP1A1.4). A frequência de cada um depende do grupo étnico (GARTE, 1998). O polimorfismo, CYP1A1*2A, foi localizado na posição 3801, 264 bases após o sinal de poliadenilação, na região 3' que flanqueia o gene e 1194 pares de bases após o término do éxon 7. A transição de timina para citosina dá origem a um sítio de restrição para a enzima *MspI* (KAWAJIRI et al., 1990). O segundo foi localizado na região codificadora do éxon 7 e é representado pela transição da adenina para guanina na posição 2455 (HAYASHI et al., 1991). Quando esse polimorfismo ocorre simultaneamente com o CYP1A1*2A, caracteriza-se um desequilíbrio de ligação entre os dois polimorfismos. Nebert et al. (1999), propuseram que quando ligado ao CYP1A1*2A, tal polimorfismo seja chamado de *CYP1A1*2B*, no entanto, quando não se apresentarem ligados, seja designado CYP1A1*2C.

O polimorfismo CYP1A1*2B leva a uma mudança do aminoácido Isoleucina para Valina (CYP1A1 Ile/Val), no resíduo 462, na região de ligação ao grupamento heme (HR2). Uma cisteína localizada anteriormente na posição 457 faz parte da ligação com o grupamento heme. Desse modo, esse polimorfismo está localizado em uma região essencial para a atividade enzimática e a mudança de aminoácidos poderia resultar em alteração de atividade (HAYASHI et al., 1991).

O polimorfismo CYP1A1*4 foi descrito por Cascorbi et al. (1996). Localiza-se no éxon 7, duas bases antes do polimorfismo CYP1A1*2B e leva à mudança de um resíduo de treonina para asparagina na região de ligação do grupamento heme. A mudança de C para A promove a perda do sítio de restrição para a enzima *BsaI*, que pode ser utilizada para identificar a presença desse polimorfismo. Não foi observada relação da presença do polimorfismo CYP1A1*4 com o câncer de pulmão (CASCORBI, 1996).

Alguns estudos analisaram a atividade enzimática em relação à presença desses polimorfismos usando sistema de expressão *in vitro* e os resultados mostraram-se controversos. Kawajiri et al. (1993) demonstraram maior atividade aril hidrocarbono hidroxilase (1,5 X) para a enzima polimórfica CYP1A1.2 comparada com a enzima selvagem, no entanto, o trabalho de Schwarz et al. (2001) utilizando as enzimas selvagem, CYP1A1.2 e CYP1A1.4, mostraram que a selvagem apresentava o mais alto metabolismo total de B(a)P, seguido pelas variantes CYP1A1.4 (~70%) e CYP1A1.2 (~50%).

Vários estudos têm demonstrado associação dos polimorfismos CYP1A1 com suscetibilidade ao câncer. O trabalho de Song et al. (2001) mostrou um elevado risco para câncer de pulmão relacionado ao hábito de fumar em chineses que apresentavam pelo menos um alelo polimórfico CYP1A1*2A (OR=2,0; 95% CI= 1,4-2,8) ou CYP1A1*2B (OR=1,9; 95% CI= 1,3-2,7).

Dentre esses polimorfismos, o CYP1A1*2A é o mais freqüente. Os povos de origem asiática apresentam maior freqüência alélica (0,37), seguidos dos africanos (0,24), latinos (0,20) e caucasianos (0,12). Os asiáticos também apresentam maior freqüência em relação ao polimorfismo CYP1A1*2B (0,22), seguidos pelos latinos (0,16) e caucasianos (0,09), sendo que esse polimorfismo não está presente em africanos. Nos indivíduos de origem hispânica, ambos polimorfismos apresentam freqüência intermediária, quando se compara caucasianos e asiáticos (GARTE, 1998). Nessas populações existe uma ligação entre os polimorfismos CYP1A1*2B e o CYP1A1*2A, ou seja, os dois ocorrem simultaneamente, caracterizando-se o desequilíbrio de ligação. Tal ligação não foi observada na população afro-americanana, ao contrário dos achados de Hamada et al. (1995), em população brasileira da cidade do Rio de Janeiro. O polimorfismo CYP1A1*4 foi observado nas populações turca, alemã e polonesa apresentando freqüências alélicas de 0,06, 0,03 e 0,02, respectivamente (CASCORBI et al., 1994; MROZIKIEWICZ, 1997; AYNACIOGLU, et al., 1998). Uma população brasileira da cidade do Rio de Janeiro apresentou uma freqüência de 0,03, variando de 0,05 em brancos a 0,01 em negros (AMORIM et al., 2004).

As glutathionas S-transferases (GSTs) podem ser encontradas na maioria dos organismos vivos, incluindo as bactérias, fungos e plantas. Uma grande quantidade dessas

enzimas se expressa nos organismos superiores, como em humanos (LANG & PELKONEN, 1999). Dentre elas encontram-se, pelo menos, sete classes, das quais duas estão ligadas à membrana, cinco delas são citosólicas e incluem as alfa (α), mi (μ), pi (π), theta (θ) e kappa (κ). Apesar disso, as mais estudadas são as θ (GSTT1), π (GSTP1) e μ (GSTM1) (WORMHOUDT et al.; 1999, TANINGHER et al., 1999).

O gene *GSTT1*, localizado no cromossomo 22, mostra-se polimórfico. A deleção homozigota desse gene, isto é, o genótipo nulo (*GSTT1* 0/0) apresenta uma frequência que varia de 10 a 60%, dependendo da origem étnica (WARHOLM et al., 1995; NELSON et al., 1995). Cerca de 60% dos asiáticos, 40% dos africanos e 20% dos caucasianos não expressam essa enzima (ROSSINI et al., 2002). Observou-se que a ausência da atividade enzimática aumenta o risco para câncer oral (SREELEKHA et al., 2001) cabeça e pescoço (EVAN et al., 2001) e pulmão (SORENSEN et al., 2004), embora haja trabalhos que não encontraram associação entre esse polimorfismo e o risco para câncer de pulmão (SCHNEIDER et al., 2004).

O gene *GSTP1* localiza-se no cromossomo 11q13. A enzima GSTP1 se expressa em maior extensão nos pulmões e é uma das principais detoxificadora da forma ativada do benzo(a)pireno (BPDE) (MILLER et al., 2003). Os polimorfismos desse gene constituem duas variantes alélicas, a *GSTP1*B* e *GSTP1*C*, sendo a *GSTP1*A* o tipo selvagem. A *GSTP1*B* difere da *GSTP1*A* pela transição A→G no nucleotídeo 313, códon 104: Ile>Val e a *GSTP1*C* pela transição C→T no nucleotídeo 341, códon 113: Val→Ala (HARRIES et al., 1997). O polimorfismo *GSTP1*B* aparece na população com uma frequência alélica de 30 a 35 % (SORENSEN et al., 2003). Esse polimorfismo resulta em menor atividade enzimática e está associado a maiores níveis de adutos de PAHs no DNA de linfócitos humanos (MILLER et al. 2003). Alguns autores relataram uma frequência aumentada de *GSTP1*B* em pacientes homozigotos com câncer de pulmão, oro-faringe, carcinoma de laringe e outras doenças relacionadas à fumaça de cigarro (VIEZZER et al., 1999; MILLER et al., 2003).

A classe μ inclui, pelo menos, cinco genes que codificam para um número igual de enzimas (GSTM1, M2, M3, M4, M5). O gene que codifica para a isoforma GSTM1 é polimórfico e tem quatro variantes alélicas incluindo *GSTM1*A*, **B*, **C*, e **0*. Os dois primeiros não apresentam diferenças com relação ao tipo de substrato, o alelo **C* é extremamente raro e a variante **0*, alelo nulo, acarreta a falta da atividade enzimática quando em homozigose (PAVANELLO & CLONFERO, 2000). Dessa maneira, a presença de, pelo menos, um alelo funcional é suficiente para que a enzima atue desempenhando seu papel. A enzima GSTM1 se expressa em vários tecidos incluindo o fígado, rins, bexiga, estômago, leucócitos e em menor extensão nos pulmões, sendo responsável pela

inativação de uma variedade de intermediários reativos, tais como os derivados dos PAHs (ABDEL-RAHMAN et al., 1998).

O genótipo nulo acomete cerca de 50% da população caucasóide (TANINGHER et al., 1999) e apresenta uma variação de 30 a 70% para diferentes grupos étnicos (SEIDEGARD et al., 1990; BELL et al., 1992). Os resultados obtidos por Rossit (2001) mostraram freqüências similares entre populações das regiões Sudeste e Norte do Brasil para os genótipos homozigotos nulos dos genes *GSTM1/T1*. Tais freqüências são respectivamente de 47,3% e 18,5% em ambas as populações, não diferindo dos valores descritos para a população caucasóide de diferentes países, conforme citado anteriormente. Vários estudos demonstraram associação do genótipo *GSTM1* nulo ao risco de câncer de bexiga (JEONG et al., 2003) e pulmão (PINARBASI et al., 2003; MOHR et al., 2004), embora alguns estudos tenham mostrado resultados conflitantes (SCHNEIDER et al., 2004).

Abordaremos alguns exemplos em que biomarcadores de exposição e suscetibilidade são combinados, para melhor esclarecer o intrincado processo do metabolismo de xenobióticos e risco à populações expostas, podendo assim, proporcionar maior eficiência no estabelecimento de estratégias preventivas.

O trabalho de Hirvonen et al. (1994) mostrou que indivíduos fumantes que herdaram genótipo *GSTM1* nulo apresentavam maior mutagenicidade na urina, comparados aos indivíduos fumantes com genótipo *GSTM1* positivo. Binková et al. (1996) amostraram mulheres de uma área altamente poluída na Polônia, com a finalidade de verificar exposição ambiental a PAHs, encontrando atividade mutagênica urinária aumentada no grupo que apresentou *GSTM1* nulo. Gabanni et al. (1996) mostraram que indivíduos fumantes, trabalhadores de fornos de coqueria, que possuíam fenótipo acetilador lento, ou seja que produzem proteínas que são instáveis, pobremente expressas ou que têm atividade catalítica parcialmente reduzida, associado ao genótipo *GSTM1* nulo apresentavam maior mutagenicidade da urina, comparados aos indivíduos que possuíam o genótipo normal.

Já, em relação à exposição terapêutica, foi observado que a urina de pacientes não fumantes, com genótipo *GSTM1* nulo e portadores de psoríase, tratados topicamente com unguento contendo 2% de alcatrão de carvão, era duas vezes mais mutagênica que a urina de indivíduos portadores do genótipo normal (GABBANI et al., 1999).

Vários estudos têm avaliado a influência dos polimorfismos genéticos nos níveis de 1-OHP urinário nas populações alvo. O trabalho de Binková et al. (1996) que avaliou a exposição ambiental em mulheres não fumantes também quantificou os metabólitos

urinários de alguns PAHs, tais como pireno, benzo(a)pireno, criseno e encontraram um valor médio duas vezes maior em indivíduos *GSTM1* nulo, quando comparados com o grupo *GSTM1* positivo. Entretanto, em outro trabalho na mesma população feminina, os níveis urinários dos metabólitos dos PAHs correlacionaram-se melhor com os níveis de exposição ambiental em indivíduos *NAT2* lento e *GSTM1* nulo (COSTA et al., 1998). Em oposição às expectativas, Hemminki et al. (1997) não encontraram influência dos polimorfismos *CYP1A1*2A*, **2B* e *GSTM1* nos níveis de 1-OHP urinário em indivíduos que trabalham com fundição. Merlo et al. (1998), avaliando policiais do tráfego de cidade de grande porte, não detectaram qualquer influência dos genótipos *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* nos níveis de 1-OHP, embora a excreção desse metabólito tenha sido maior em alguns fumantes (≤ 15 cigarros/dia) com genótipo heterozigoto *CYP1A1-MspI* (*CYP1A1*1A/*2A*), comparados aos homozigotos normais (*CYP1A1*1A/*1A*). Pavanello et al. (1999), avaliando indivíduos expostos a PAHs, como trabalhadores de fornos de coqueria, de indústrias de alumínio e limpadores de chaminé, demonstraram que, dentro de cada grupo, os valores médios de 1-OHP foram maiores em indivíduos *GSTM1* nulo em relação ao grupo *GSTM1* positivo, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Ao contrário dos estudos anteriores, Wu et al. (1998) demonstraram que trabalhadores de fornos de coqueria, homozigotos para o genótipo *MspI* (*CYP1A1*2A/*2A*), apresentaram diferença estatisticamente significativa para os níveis de 1-OHP urinário, em relação aos heterozigotos e homozigotos normais. Alexandrie et al. (2000) associaram os níveis de 1-OHP a vários polimorfismos em um grupo exposto a PAHs que trabalhavam em refinaria de alumínio e demonstraram maiores níveis desse metabólito nos indivíduos com os genótipos *CYP1A1 Ile/Val* e *GSTM1* nulo.

De maneira geral, a população como um todo está constantemente exposta às complexas misturas de compostos químicos ambientais que podem causar danos à saúde, expressos a curto ou longo prazo, acentuando-se ainda mais em indivíduos ocupacionalmente expostos, o que mostra a importância do monitoramento dos mesmos. Assim sendo, a correlação de biomarcadores de suscetibilidade e de exposição interna, é bastante eficiente no estabelecimento de estratégias preventivas para tais grupos.

II. OBJETIVOS

Foram objetivos deste trabalho:

- 1- Investigar as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1** 2A, *2B e *4 em uma população do Noroeste do Estado de São Paulo, comparando-as quanto ao sexo, idade e cor da pele dos indivíduos amostrados.
- 2- Avaliar a possível atividade mutagênica, como marcador de exposição, das amostras de urina de indivíduos que trabalham no corte da cana-de-açúcar queimada (período safra) e da entressafra, por meio do ensaio de microssuspensão, utilizando as linhagens de *Salmonella thyphimurium* TA98, YG1041 e YG1024.
- 3- Investigar a influência dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1* na atividade mutagênica da urina de cortadores de cana-de-açúcar expostos e não expostos aos poluentes da queima de canaviais.
- 4- Quantificar e comparar a excreção do metabólito 1-hidroxipireno em urina de cortadores de cana expostos e não expostos à queima de canaviais, bem com a influência dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1* na excreção desse metabólito.

III. RESULTADOS



EXPOSIÇÃO AMBIENTAL AOS COMPONENTES
QUÍMICOS DA FUMAÇA E RISCO DE CÂNCER:
ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO

III. RESULTADOS

Capítulo Um

Sociedade
Brasileira de
Cancerologia

DEPARTAMENTO DE CANCEROLÓGICA DA ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA

Ano V • N.º 18 • 2.º Trimestre de 2002

**EXPOSIÇÃO AMBIENTAL AOS COMPONENTES
QUÍMICOS DA FUMAÇA E RISCO DE CÂNCER:
ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO**

Capítulo Um

Revista da



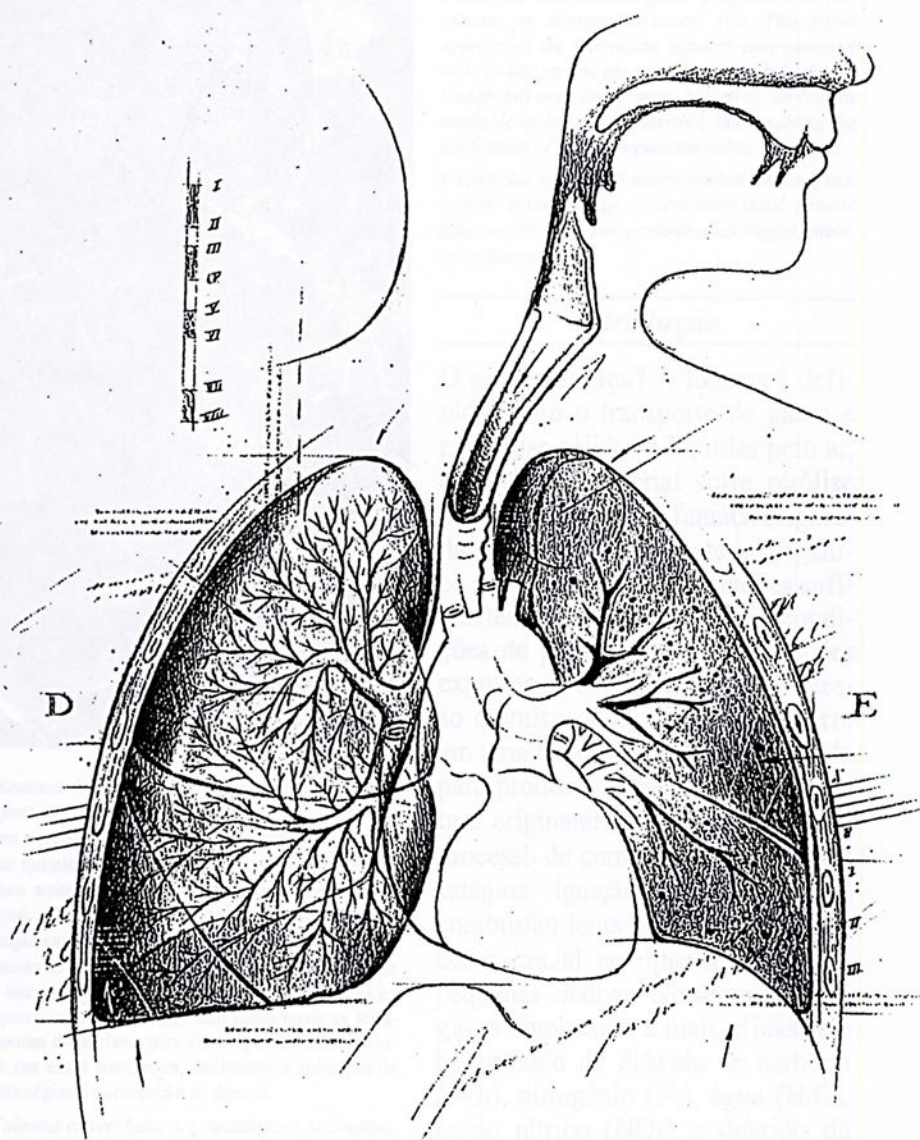
Sociedade Brasileira de Cancerologia

21

ISSN 1415-6725

DEPARTAMENTO DE CANCEROLOGIA DA ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA

Ano V • N.º 18 • 2.º Trimestre de 2002

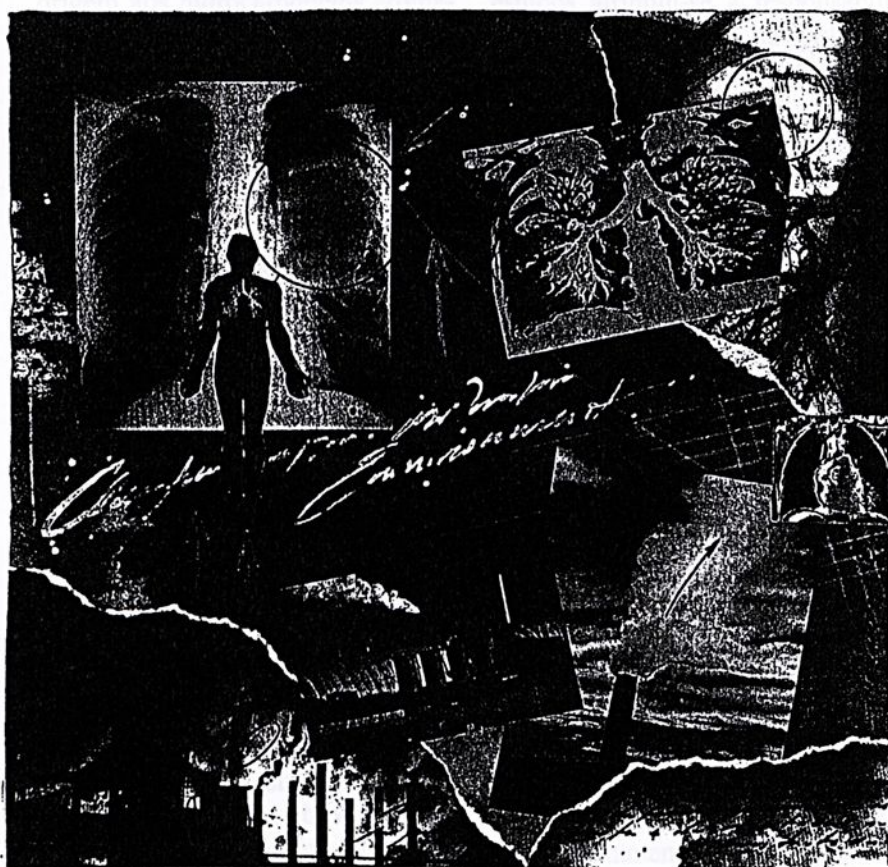


WIORANDINI © 2002



Exposição ambiental aos componentes químicos da fumaça e risco de câncer: estratégias de prevenção

Rosa Maria do Vale Bosso¹, Flávia Cristina. C. Rodrigues²,
Nívea D.T. Conforti-Froes³



Summary: Smoke is defined as air borne liquid, solid particles, and gases resulting from combustion processes. The chemicals emitted during this process constitute an environmental hazard due to their mutagenic and carcinogenic properties, which imposes an increase in cancer risk. This paper approaches the interaction between environmental toxic pollutants and genetic inheritance in both carcinogenesis and cancer onset, as well as the current available tools for risk detection, thus enabling the application of cancer-prevention public strategies.

Keywords: smoke and environmental carcinogens, cancer epidemiology, cancer-associated genetic polymorphism, cancer prevention strategies, molecular biomarkers.

Introdução

O que é fumaça? A fumaça é definida como o transporte de gases e partículas sólidas e líquidas pelo ar, quando um material sofre pirólise ou combustão. Toda fumaça originada da combustão de material orgânico é tóxica e em concentrações suficientemente altas apresenta condições de perigo para as populações expostas. A combustão é um processo químico de oxidação que ocorre em uma taxa suficientemente rápida para produzir elevação da temperatura originando calor ou chama¹. O processo de combustão envolve três estágios: ignição, flamejamento e combustão lenta. A ignição é o processo inicial em que se observam pequenas chamas. No segundo estágio, a combustão é mais eficiente e há emissão de dióxido de carbono (CO₂), nitrogênio (N₂), água (H₂O), óxido nítrico (NO_x) e dióxido de enxofre (SO₂). No terceiro estágio, ocorre um processo de baixa tempe-

Resumo: A fumaça é definida como o transporte de gases e partículas sólidas e líquidas pelo ar, quando um material sofre pirólise ou combustão. Os produtos químicos derivados desse processo representam uma ameaça para o ambiente, em decorrência de suas propriedades mutagênica e carcinogênica, implicando no aumento do risco para o desenvolvimento de inúmeras neoplasias. Esse trabalho aborda a interação entre o ambiente e a herança genética no aparecimento do câncer, bem como quais as ferramentas disponíveis para a detecção do risco imposto por esses compostos, facilitando a aplicação de estratégias de prevenção da doença.

Palavras chave: fumaça e carcinógenos ambientais, epidemiologia do câncer, polimorfismos genéticos associados a câncer, estratégias de prevenção do câncer, biomarcadores moleculares.

ratura e ausência de chama, com a emissão de grandes quantidades de compostos parcialmente oxidados, tais como, monóxido de carbono (CO), metano (CH₄) e outros hidrocarbonetos particulados. Entre os dois últimos estágios ocorre a formação de etino (C₂H₂) e cianogênio (NCCN). O etino sofre polimerização, via radicais livres, até a formação dos núcleos aromáticos, dando origem aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Alguns HAPs contendo menor número de anéis aromáticos, como naftaleno, fenantreno e antraceno, reagem formando outros HAPs de maior peso². Tais compostos representam uma classe importante de poluentes ambientais, reconhecidos por sua ação mutagênica e/ou carcinogênica, pois as lesões resultantes das ligações desses compostos com o DNA, quando não reparadas, poderão iniciar o processo carcinogênico³.

A maior fonte de tais compostos provém da emissão de materiais particulados, em consequência da queima de plantações agrícolas, da fumaça do cigarro, da combustão do carvão, dos motores de veículos e da produção de coque. São, portanto, encontrados no ambiente ocupacional e residencial e, em consequência da dispersão das cinzas, atinge o homem via inalação, através da pele e pela água de rios contaminados⁴.

A fumaça do cigarro é uma mistura complexa que compreende mais de 4000 substâncias das quais, pelo menos, 40 são carcinogênicas. Dentre essas, os HAPs e as nitrosaminas são os principais componentes que podem formar adutos com o material genético. A mutagenicidade do ar interno de áreas públicas, provavelmente atribuída à fumaça de cigarro, é muito maior que a do ar livre. Além disso, calcula-se que um indivíduo que respira o ar de uma área poluída durante um ano,

semelhante à cidade de Los Angeles ou São Paulo, inala a mesma quantidade de material queimado que um fumante pesado, cujo consumo é de dois maços de cigarro diários. Ademais, está claro que a influência do hábito de fumar e outras exposições internas complicam a avaliação epidemiológica do impacto da poluição atmosférica na etiologia de doenças. Na verdade, após alguns estudos atribuiu-se a responsabilidade de 5 a 10% da poluição ambiental nos casos de cânceres do trato respiratório⁵.

Inúmeros fatores ambientais e de estilo de vida que afetam os pais estão associados com o aumento do risco de câncer na infância. Mães que fumam durante a gravidez apresentam descendência com risco aumentado de desenvolver leucemia e outros tipos de cânceres infantís combinados. O uso materno de maconha está relacionado com aumento significativo de leucemia infantil. Efeitos patofisiológicos da fumaça da maconha e seus constituintes canabinóides foram relatados em estudos experimentais *in vivo* e *in vitro*. A fumaça da maconha é mutagênica no teste de Ames e em cultura de tecidos. Em animais, o princípio ativo da maconha, delta 9-tetrahidrocanabinol (THC), produz sintomas de toxicidade neurocomportamental, rompe todas as fases da função reprodutiva e gonadal e é teratogênico. A fumaça da maconha pode ocasionar sintomas de obstrução das vias aéreas, tanto quanto metaplasia escamosa. As manifestações clínicas da patofisiologia devido à fumaça da maconha estão sendo analisadas, como a falha a longo termo de memória em adolescentes, imperfeição prolongada de performance psicomotora, o aumento de seis vezes na incidência de esquizofrenia, câncer de boca, de garganta, língua e pulmão em indi-

víduos jovens (19-30 anos), teratogenicidade e leucemia não linfoblástica em crianças de mães quimicamente dependentes de maconha⁶.

Dessa maneira, muitos compostos químicos mutagênicos e/ou carcinogênicos estão presentes na atmosfera, trazendo à tona não apenas um problema ambiental de significativa importância, como também sérias consequências à saúde da população, como um todo.

Estratégias de prevenção

O câncer é um sério problema de saúde pública. Atualmente, é responsável por cerca de 10 milhões de novos casos anuais, com 6 milhões de mortes a cada ano no mundo. Desse total, 50% dos casos concentram-se em países em desenvolvimento que disponibilizam apenas 5% de seus recursos para o controle da doença. Caso não haja uma estratégia efetiva de prevenção, detecção e cuidados, no ano de 2020 serão 20 milhões de novos pacientes/ano com a doença, estimando-se uma mortalidade anual de 12 milhões⁷.

Com a descoberta das bactérias no século XIX e, posteriormente dos vírus e outros patógenos, foi possível controlar a maioria das doenças infecciosas nos países desenvolvidos, com uma extensão considerável nos países em desenvolvimento no século XX, reduzindo abruptamente as taxas de mortalidade e morbidade. Isto decorreu principalmente do desenvolvimento de novos hábitos de higiene, política sanitária e do advento de vacinas e antibióticos. Como consequência, houve um aumento na expectativa de vida que conduziu ao predomínio de mortes na população por outras categorias de patologias, dentre as quais, as doenças degenerativas crônicas. Ou seja, qualquer doença exceto aque-

las de natureza infecciosa ou acidentada. Dentre as doenças degenerativas, as cardiovasculares e os tumores são responsáveis por mais de 70% das mortes nos países desenvolvidos. Além das doenças degenerativas crônicas apresentarem eminente impacto em relação às taxas de morbidade, também se destacam pela reincidência e invalidez⁸.

Os cânceres demonstram o envolvimento de uma grande variedade de genes que interage com os fatores ambientais. O controle xenogenético, isso é, o controle genético da resposta individual a xenobióticos e a identificação de polimorfismos genéticos que afetam negativamente tal resposta contribuem para a determinação dos fatores de risco associados aos cânceres, cuja etiologia é multifatorial. O estudo e controle são de difícil acesso, devido a uma gama de fatores envolvidos, tais como diversidade, interligação com fatores de múltiplos riscos e de proteção, a longa latência e a patogênese em múltiplos passos, juntamente com a localização multifocal.

Marcadores biológicos de exposição - Os marcadores biológicos são indicadores do risco genotóxico e podem ser usados para se detectar precocemente populações de risco, bem como os agentes danosos presentes no ambiente. São subdivididos em indicadores de exposição, de efeito e de suscetibilidade. De acordo com essa classificação, é possível identificar um indicador biológico em cada passo do caminho de uma substância genotóxica dentro do organismo, desde sua absorção, ataque nucleofílico e conseqüente lesão às moléculas informacionais, fixação do dano e excreção. No monitoramento biológico deve ser feita a distinção entre indicadores de exposição e de efeito. O primeiro

inclui a concentração da substância ou de seus metabólitos em fluidos biológicos, a mutagenicidade da substância excretada e o ataque metabólico ao DNA. Tais indicadores têm o propósito de focalizar a absorção do composto em questão e, se possível, avaliar sua dose interna e biologicamente efetiva (i.e., atividade genotóxica dose-dependente). Já os indicadores de efeito incluem a detecção de sinais pré-clínicos ou clínicos da doença, como o aumento na frequência de aberrações cromossômicas, mutação em oncogenes e genes supressores de tumor, que fornecem o grau das alterações de alvos genéticos importantes, em cromossomos, seqüências gênicas e outros.

Marcadores de suscetibilidade - Os indicadores de suscetibilidade incluem as diferenças individuais no metabolismo de xenotóxicos, no reparo de DNA e a presença de polimorfismos em oncogenes e oncosuppressores. Esses são, atualmente, de grande interesse no campo da medicina ambiental, principalmente devido ao seu papel na modulação da resposta individual à exposição a carcinógenos⁹. A partir do extensivo trabalho de Miller & Miller¹⁰, ficou claro que a maioria dos compostos químicos não é ativa por si só, necessitando de ativação metabólica para tornar-se eletrofílica e interagir com as macromoléculas celulares. Desse processo, decorre a necrose tecidual, carcinogenicidade e outros efeitos tóxicos. Assim sendo, a variação no fenótipo metabólico, que envolve as enzimas de ativação e detoxicação, desempenha um papel importante no desenvolvimento do câncer ambiental. Essa variação está relacionada ao polimorfismo genético, sendo que grande parte desses polimorfismos apresenta relevância clínica e

envolve as enzimas metabolizadoras de carcinógenos¹¹.

Variações polimórficas e suscetibilidade ao câncer

As enzimas metabolizadoras de carcinógenos são classificadas em duas amplas categorias: as de fase I e as de fase II. As enzimas da fase I envolvem quase que exclusivamente os produtos gênicos do citocromo P-450 (CYP-450), que catalisam a inserção de um átomo de oxigênio em substratos relativamente inertes, tornando-os altamente reativos. Por outro lado, as enzimas de fase II, que incluem principalmente as glutatona S-transferases (GSTs), reagem com os eletrofílicos finais, que se tornaram reativos na fase I, catalisando a conjugação desses com substratos endógenos, como glicuronídeos, glutatonas e sulfatos. Portanto, são produzidos intermediários hidrofílicos, facilmente excretáveis da célula, sendo que tais intermediários também possam ser originados por um processo não enzimático¹². Além disso, não se pode deixar de mencionar as N-acetiltransferases (NATs) que são enzimas participantes tanto da ativação quanto da detoxicação dos compostos químicos.

O citocromo P450 1A2 (CYP1A2) foi identificado como um fator importante na ativação metabólica de muitos carcinógenos, incluindo a N-oxidação do grupo amino heterocíclico tais como aflatoxina, aminas aromáticas heterocíclicas e alguns compostos nitro-aromáticos. Sua atividade pode ser induzida pela exposição à fumaça do cigarro e carne cozida em altas temperaturas, pela exposição aos HAPs (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) ou aminas aromáticas. A enzima CYP1A2 foi primeiro detectada no fígado e,

mas recentemente, foi também encontrada no cérebro e em células endoteliais do cordão umbilical. Alguns autores têm distinguido indivíduos *CYP1A2* rápido (cerca de 40%) de outros com atividade intermediária ou menor (os 60% restantes). Em razão da grande relevância do produto do gene *CYP1A2* na ativação de muitos carcinógenos ambientais, existem hipóteses de que embora sua expressão principal ocorra no fígado, possa ser um fator de risco para o desenvolvimento de cânceres em outros tecidos alvos para ativação de carcinógenos, como o pulmão, bexiga e cólon⁹.

O gene que codifica a isoenzima humana *CYP1A1* localiza-se no cromossomo 15 e contém 7 éxons. O produto gênico do *CYP1A1* é a aril hidrocarboneto hidroxilase (AHH) que catalisa o primeiro passo do metabolismo dos HAPs em compostos eletrofílicos. O gene é induzido pela exposição a substâncias como dioxinas, benzo(a)pireno (BaP) e outros HAPs. Outro gene relacionado com exposição à fumaça é o *CYP1B1*, onde o polimorfismo do códon 432 pode ser um fator de suscetibilidade ao câncer de cabeça e pescoço (HNSCC). O impacto das variantes polimórficas do gene *CYP1B1* no risco de HNSCC é refletido pela sua forte associação com a frequência de mutações somáticas no gene *p53*. Variantes polimórficas do *CYP1B1* relatam significativa suscetibilidade individual de fumantes a esse tipo particular de neoplasia¹¹.

As glutathione S-transferases (GSTs) podem ser encontradas na maioria dos organismos vivos, incluindo as bactérias, fungos e plantas. No entanto, uma grande quantidade dessas enzimas se expressa nos organismos superiores, como em huma-

nos¹². Dentre as GSTs encontram-se, pelo menos, sete classes, das quais duas estão ligadas à membrana, cinco delas são citosólicas e incluem as alfa (a), mi (m), pi (p), theta (q) e kappa (k). Apesar disso, as mais estudadas são as q (GSTT1), p (GSTP1) e m (GSTM1)^{14,15}.

A deleção homozigota do gene *GSTT1*, isto é, o genótipo nulo (*GSTT1* 0/0) apresenta uma frequência que varia de 9,7 a 38% na população geral, dependendo da origem étnica. Foi observado que a ausência dessa atividade enzimática reduz a idade de início do câncer de cólon (<40 anos) e aumenta o risco para câncer de cabeça e pescoço, bexiga e pulmão¹⁶.

Os polimorfismos do gene *GSTP1* constituem duas variantes alélicas, a *GSTP1*B* e *GSTP1*C*, sendo a *GSTP1*A* o tipo selvagem. A *GSTP1*B* difere da *GSTP1*A* pela transição A>G no nucleotídeo 313, códon 104: Ile>Val e a *GSTP1*C* pela transição C>T no nucleotídeo 341, códon 113: Val>Ala. Alguns autores mostraram uma frequência aumentada de *GSTP1*B* em diferentes pacientes, homozigotos, com câncer de pulmão, oro-faringe, carcinoma de laringe e algumas outras doenças relacionadas à fumaça de cigarro¹⁷.

A classe m inclui, pelo menos, 5 genes que codificam um número igual de enzimas (*GSTM1*, *M2*, *M3*, *M4*, *M5*). O gene que codifica para a isoforma *GSTM1* é polimórfico e tem 4 variantes alélicas (*GSTM1*A*, **B*, **C*, e **0*). Os dois primeiros não apresentam diferenças com relação ao tipo de substrato; o alelo **C* é extremamente raro e a variante **0*, alelo nulo, acarreta a falta da atividade enzimática quando em homozigose⁹. Dessa maneira, a presença de pelo menos,

um alelo funcional é suficiente para que a enzima atue desempenhando seu papel. A enzima *GSTM1* é expressa em vários tecidos, incluindo o fígado, rins, bexiga, estômago, leucócitos e, em menor extensão, nos pulmões, onde destoxifica uma variedade de intermediários reativos, tais como os derivados dos HAPs¹⁶. O genótipo nulo acomete cerca de 50% da população caucasóide¹⁵ e apresenta uma variação de 30 a 70% para diferentes grupos étnicos¹⁸. Resultados obtidos recentemente¹⁹ mostraram frequências similares entre populações das regiões Sudeste e Norte do Brasil para os genótipos homozigotos nulos dos genes *GSTM1/T1*. Tais frequências são respectivamente de 47,3% e 18,5% em ambas as populações, não diferindo dos valores descritos para a população caucasóide de diferentes países, como citado anteriormente.

Os tumores das células sanguíneas também estão relacionados com fatores ambientais. Como exemplo, têm-se as Síndromes Mielodisplásicas (MDS), que são doenças clonais de células da medula óssea, caracterizadas por hematopoiese levando à citopenia e frequentemente progredem para leucemia mieloide aguda (LMA). As GSTs destoxificam vários agentes, incluindo aqueles implicados nas MDS. Indivíduos com genótipo nulo *GSTM1*(0/0) podem ter suscetibilidade aumentada para MDS. Genótipos nulos podem estar associados com possíveis fatores prognósticos²⁰. Além disso, são conhecidos outros polimorfismos relacionados com leucemias, como a repetição de dinucleotídeo localizado no gene *ABL* e a repetição de trinucleotídeo localizado no gene *BCR*²¹.

Matsuzoe et al.²² detectaram mutações no gene K-RAS de indivíduos fumantes com adenocarcinoma de pulmão, mostrando diferença significativa entre pacientes com genótipo *GSTM1* nulo e aqueles com o alelo normal. Isto sugere que a causa da mutação pode dever-se ao acúmulo do epóxido diol de benzo(a)pireno, metabólito oriundo dos compostos da fumaça do cigarro, não detoxificado por indivíduos com o alelo *GSTM1* nulo. Também foi observado que indivíduos com hábito tabagista e mutantes para os alelos *CYP1A1*2* e *CYP1A1*2B* apresentaram uma maior frequência de mutações em dois genes alvo do câncer de pulmão, o *P53* e o *KI-RAS*. Tais efeitos foram ainda mais pronunciados quando esses indivíduos eram *GSTM1* nulo e mutantes homozigoto para o *CYP1A1*, indicando, respectivamente, menor inativação e maior bioativação dos compostos do cigarro nesses indivíduos. A interação sinérgica pode ser explicada pela diminuição da detoxificação dos intermediários reativos, que são formados pela enzima *CYP1A1* alterada, em indivíduos com atividade deficiente de *GSTM1*¹⁴.

As enzimas N-acetiltransferases (NATs) transferem um grupo acetila para o átomo de nitrogênio de aminas aromáticas e hidrazina ou para o átomo de oxigênio de arilaminas hidroxiladas. Dessa forma elas catalisam tanto reações de detoxificação, tais como a N-acetilação, quanto reações de ativação, produzindo metabólitos reativos com o DNA, como a O-acetilação da N-hidroxiarilamina⁹. Os genes *NAT1* e *NAT2* expressam-se polimorficamente; e a variação no loco *NAT2* é responsável pelo polimorfismo clássico da acetilação que identifica os indivíduos como acetiladores rápidos,

intermediários e lentos, sendo assim, o metabolismo melhor estudado. Existe considerável variação étnica na atividade da enzima *NAT2*, de modo que o fenótipo lento varia de 90% na África do Norte a 10-30% nos orientais japoneses e coreanos¹⁴; e 40 a 70% para as populações européias e americanas⁹. A atividade da *NAT2* é expressa nos tecidos do fígado e intestino. Seu polimorfismo ocorre devido a mutações de ponto na região codificadora. Os acetiladores lentos que possuem alelos mutantes *NAT2* produzem proteínas que são instáveis, pobremente expressadas ou que têm atividade catalítica parcialmente reduzida. Já a proteína *NAT1* é encontrada em muitos tecidos, incluindo fígado e bexiga²³.

Tanto o fígado quanto o epitélio da bexiga desempenham um papel importante no metabolismo das aminas aromáticas e heterocíclicas, que são compostos químicos carcinogênicos originados no processo da combustão de matéria orgânica e, portanto encontrados na fumaça do cigarro, carne de churrasco e no ambiente de trabalho. Essas substâncias podem ser nitro-acetiladas no fígado, pela *NAT2*, originando compostos não reativos. No entanto, também nesse órgão, podem ser nitro-hidroxiladas pelas *CYP1A2* e transportadas para o epitélio da bexiga, onde sofrerão óxido-acetilação pelas *NAT1*, originando intermediários altamente reativos. Assim, se um indivíduo é acetilador *NAT2* rápido, as aminas aromáticas podem ser rapidamente detoxificadas no fígado e uma pequena quantidade de arilamina hidroxilada atingiria o epitélio da bexiga. Conseqüentemente, o genótipo *NAT1* teria pouco efeito no risco do câncer de bexiga. Ao contrário, se um indivíduo é acetilador *NAT2*

lento, a detoxificação hepática pode ser incompleta e o excesso de arilamina hidroxilada afetará então o epitélio da bexiga. Desse modo, o genótipo *NAT1* pode ser considerado um importante determinante de risco câncer de bexiga²⁴. A presença de duas cópias de qualquer dos vários alelos mutantes do gene *NAT2* produz um fenótipo acetilador lento e tal fenótipo tem sido associado com alto risco desse tipo de câncer.

Landi et al.²⁵ verificaram que vários tecidos de indivíduos fumantes, incluindo o epitélio da bexiga, apresentam níveis mais altos de adutos de DNA por arilaminas do que os tecidos de não fumantes. Além disso, vários estudos mostraram uma associação entre os polimorfismos de N-acetilação, hábito tabagista e câncer de bexiga²⁴.

Correlação entre exposição e suscetibilidade

A correlação de biomarcadores de suscetibilidade e de exposição é bastante eficiente no estabelecimento de estratégias preventivas. Até o momento, apenas alguns estudos avaliaram a influência dos polimorfismos metabólicos na atividade mutagênica de metabólitos presentes na urina, em indivíduos expostos ocupacional ou ambientalmente aos genotóxicos. O trabalho de Hirvonen²⁶ mostrou que fumantes que herdaram genótipo *GSTM1* nulo, apresentavam urina mais mutagênica que indivíduos fumantes com genótipo *GSTM1* positivo. Binková et al.²⁷ coletaram amostras de mulheres habitantes de uma área altamente poluída na Polônia, com a finalidade de verificar a exposição ambiental aos HAPs. Encontraram atividade mutagênica urinária aumentada no grupo portador do genótipo *GSTM1* nulo.

Gabanni et al.²⁸ mostraram que indivíduos fumantes e que trabalham forninhos de coqueria, com fenótipo acetilador lento e genótipo GSTM1 nulo, apresentavam maior presença de mutágenos na urina do que indivíduos portadores do genótipo normal.

Um outro biomarcador de exposição utilizado na prevenção do câncer é a verificação da presença de adutos de DNA, definidos como o produto da reação covalente de moléculas eletrofílicas com o DNA. Tal biomarcador avalia a dose biologicamente efetiva de risco aumentado para desenvolvimento de doença relacionada à mutação. A detecção de adutos de DNA não fornece apenas evidência direta de que os indivíduos estejam expostos a compostos químicos específicos, mas também de que lesões potencialmente pré-carcinogênicas tenham sido formadas. Os indivíduos com níveis de adutos de DNA mensuráveis são considerados de risco potencialmente maior para o desenvolvimento do câncer, como resultado do processo de exposição⁸.

Vários estudos mostraram a influência do genótipo GSTM1 nos níveis de adutos de DNA, tanto isoladamente, quanto em combinação com outros genótipos. Hou et al.²⁹ relataram adutos de DNA aumentados em relação aos controles, em indivíduos não fumantes que trabalham com manutenção de ônibus. Os níveis de adutos foram maiores em acetiladores lentos com genótipo GSTM1 nulo. Do mesmo modo, foram encontrados em trabalhadores de coqueria, adutos de DNA específicos de HAPs, em níveis superiores ao limite, em indivíduos GSTM1 nulo. A influência do genótipo GSTM1 nulo também foi demonstrada no estudo ambiental de Sram, et al.³⁰.

Há que se ressaltar que devido à existência de muitos genótipos e enzimas polimórficas, com a variação na expressão gênica acrescida da complexidade estrutural dos compostos químicos, a avaliação de uma única enzima não é suficiente. Assim, os indivíduos expostos a carcinógenos devem ser estudados pela combinação de seus genótipos de suscetibilidade ao câncer, bem como pela associação de mais de um biomarcador, na prevenção de doenças³.

Os microsátélites são outros biomarcadores úteis para o mapeamento genético e análise de quantidades pequenas de amostras de tumores com perda de heterozigosidade (LOH). São alterações genéticas bastante observadas nos cânceres e constituem repetições curtas organizadas em *tandem* direto, altamente polimórficas e distribuídas por todo o genoma. A instabilidade em microsátélites, representando mudanças no número de repetições curtas de DNA em *tandem*, foi inicialmente relatada em cânceres cólon-retal esporádico e em cólon hereditário não poliposo, refletindo mutações em genes de reparo de DNA, como os *hMSH2*, *hMLH1*, *PMS1* e *PMS2*. Recentemente, vários estudos têm mostrado alterações de microsátélites em câncer de pulmão; no entanto, falta esclarecer a verdadeira frequência de tais alterações³¹.

Outro estudo em câncer de esôfago revela que a freqüente perda de heterozigosidade (LOH) em 13q12-13 está associada com a metástase de linfonodo, sugerindo que nessa região pode haver um gene supressor de tumor que regula o aparecimento de tal metástase. Recentemente, um novo candidato a supressor de tumor, *AS3*, foi identificado nessa região. Harada et al.³² examinaram alterações no gene *AS3*, sugerindo

que variações polimórficas e LOH nesse locus podem estar associadas com envolvimento do linfonodo em câncer de esôfago.

Conclusão

O conhecimento da prevalência e distribuição dos fatores comuns de suscetibilidade genética aliado à capacidade de identificar indivíduos ou subgrupos altamente suscetíveis terão implicações substanciais na prevenção. Uma vez identificados esses indivíduos, os mesmos podem ser persuadidos a evitar conhecidos fatores de risco, como o uso do tabaco. Políticas públicas de redução na emissão de gases resultantes de combustão automotiva (exigência legal de filtros catalíticos em veículos a diesel, gasolina e álcool); obrigatoriedade de filtros eletromagnéticos em chaminés industriais; equipamentos de proteção para o trabalhador sujeito à exposição ocupacional podem significar uma importante redução na incidência do câncer na população e nos gastos com saúde pública. Do mesmo modo, devem ser implementados os programas voltados ao abandono do hábito tabagista, as estratégias de triagens e quimioprevenção, além da adequação de programas de *screening* apropriados para aplicação na população geral.

Bibliografia

1. Hartzell GE. Overview of combustion toxicology. *TOXICOLOGY* 1996; 115:7-23
2. Hepp H, Siegmann K, Sattler K. New aspects of growth mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbons in diffusion flames. *CHEM. PHYS. LETTERS* 1995; 233:16-22.
3. Bartsch H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. *MUTAT RES* 2000; 462:255-79.
4. Deportes I, Guyod J, Zmirou D. Hazard to man and the environment posed by the use of urban waste compost: a review. *THE SCI OF THE TOTAL ENVIRON* 1995; 172:197-222.

5. De Flora S, Bagnasco M, Izzotti A, D'Agostini F, Pala M, Valerio F. Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon fractions extracted from urban air particulates. *MUTAT RES* 1989; 224:305-18.
6. Zaridze DG. Epidemiology of leukemias in children. *ARKH PATOL* 1997; 59:65-70.
7. Sikora K. Developing a Global Strategy for Cancer. *EUR J CANCER* 1999; 35:1870-7.
8. De Flora S, Izzotti A, Randerath K, Randerath E, Bartsch H, Jagadeesan N, Balansky R, Schooten F, Degan P, Fronza G, Walsh D, Lewtas J. DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *MUTAT RES* 1996; 366:197-238.
9. Pavanello S, Clonfero E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *MUTAT RES* 2000; 465:285-308.
10. Miller E, Miller J. The mutagenicity of chemical carcinogens: correlations, problems and interpretations. In: Hollaender A. (Ed). *CHEMICAL MUTAGEN* New York: Plenum, 1971; 83-119.
11. Perera FP, Weinstein IB. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *CARCINOGENESIS* 2000; 21:517-24.
12. Lang M, Pelkonen O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC* 1999; 148: 13-22.
13. Ko Y, Abel J, Harth V, Brode P, Antony C, Donat S, Fischer HP, Ortiz-Pallardo ME, Thier R, Sachinidis A, Vetter H, Bolt HM, Herberhold C, Bruning T. Association of CYP1B1 codon 432 mutant allele in head and neck squamous cell cancer is reflected by somatic mutations of p53 in tumor tissue. *CANCER RES* 2001; 61:4398-404.
14. Wormhoudt LW, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, Cytochrome P450, Glutathione-S-Transferase, and Epoxide Hydrolase Enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *CRIT REV TOXICOL* 1999; 29:59-124.
15. Taningher M, Malacarne D, Izzotti A, Ugolini D, Parodi S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *MUTAT RES* 1999; 436:227-61.
16. Abdel-Rahman SZ, Anwar WA, Abdel-Aal WE, Mostafa HM, Au WW. GSTM1 and GSTT1 genes are potential risk modifiers for bladder cancer. *CANCER DETECTION PREVENTION* 1998; 22:129-38.
17. Viezzer C, Norppa H, Clonfero E, Gabbani G, Mastrangelo G, Hirvonen A, Celotti L. Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and EPHX gene polymorphisms on DNA adduct level and HPRT mutant frequency in coke-oven workers. *MUTAT RES* 1999; 231:259-69.
18. Bell DA, Thompson CL, Taylor JA, Miller CR, Perera F, Hsieh LL, Lucier GW. Genetic monitoring of human polymorphic cancer susceptibility genes by polymerase chain reaction: application to glutathione transferase m. *ENVIRON HEALTH PERSPECT* 1992; 98:113-7.
19. Rossit AR, Cabral IR, Hackel CB, Da Silva RC, Conforti-Froes N, Abdel-Rahman, S. Polymorphisms In The Dna Repair Gene Xrcc1 And Susceptibility To Alcoholic Liver Cirrhosis In Older Southeastern Brazilians. *CANCER LETTERS*. In press.
20. Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Radloff GA, Ross JA, Perentesis JP. Glutathione S-transferase polymorphisms in children with myeloid leukemia: a Children's Cancer Group study. *CANCER EPIDEMIOL BIOMARKERS PREV* 2000; 9:563-6.
21. Sercan HO, Sercan ZY, Kizildag S, Undar B, Soydan S, Sakizli M. Consistent loss of heterozygosity at 14Q32 in lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia. *LEUK LYMPHOMA* 2000; 39:385-90.
22. Matsuzoe D, Hideshima T, Iwaki A, Yoneda S, Kawahara K, Shim T, Kimura A. Glutathione S-transferase mu1 null genotype is associated with ras gene mutation in lung adenocarcinoma among smokers. *CARCINOGENESIS* 2001; 22: 1327-30.
23. Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *MUTAT RES* 2000; 464:65-76.
24. Taylor JA, Umbach DM, Stephens E, Castranio T, Paulson D, Robertson C, Mohler JL, Bell DA. The role of N-acetylation polymorphisms in smoking associated bladder cancer: evidence of a gene-gene-exposure three-way interaction. *CANCER RES* 1998; 58:3603-10.
25. Landi M, T, Zocchetti C, Bernucci I, Kadlubar FF et al. Cytochrome P4501A2 e induction and genetic control in determining 4-aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels. *CANCER EPIDEMIOL BIOMARKERS PREV* 1996; 5: 693-8.
26. Hirvonen A, Nylund L, Kociba P, Husgafvel-Pursiainen K, Vainio H. Modulation of mutagenicity by genetically determined carcinogen metabolism in smokers. *CARCINOGENESIS* 1994; 15: 813-15.
27. Binková B, Lewtas J, Mlskova I, Rössner P, Cerná M, Mráková G, Peterková K, Mumford Y, Meyer S, Srám R. Biomarker studies in Northern Bohemia. *ENVIRON HEALTH PERSPEC* 1996; 104: 591-97.
28. Gabbani G, Pavanello S, Nardini B, Tognato O, Bordin A, Fornasa CV, Bezze G, Clonfero E. Influence of metabolic genotype GSTM1 on levels of urinary mutagens in patients treated topically with coal tar. *MUTAT RES* 1999; 440: 127-33.
29. Hou SM, Lambert B, Hemminki. Relationship between hprt mutant frequency aromatic DNA adducts and genotypes for GSTM1 and NAT2 in bus maintenance workers. *CARCINOGENESIS* 1995; 16: 1913-17.
30. Sram RJ, Binkova, P, Rossner P. Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. *MUTAT RES* 1999; 428: 203-215.
31. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *BBA* 1998; 1378:F21-F59.
32. Harada H, Uchida N, Shimada Y, Kumimoto H, Shinoda M, Imamura M, Ishizaki K. Polymorphism and allelic loss at the AS3 locus on 13q12-13 in esophageal squamous cell carcinoma. *INT J ONCOL* 2001; 18: 1003-7.

Autores:

Rosa Maria do Vale Bosso - Doutoranda em Genética. Laboratório de Epidemiologia Molecular, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto.

Flávia Cristina. C. Rodrigues - Doutoranda em Genética. Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto.

Nívea D. T. Conforti-Froes - Mestra e Doutora em Genética. Pós-Doutorada em Genética Humana pela Universidade do Texas, Departamento de Medicina Preventiva, EUA. Coordenadora do Laboratório de Epidemiologia Molecular, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto.

Endereço para correspondência: Rosa Maria do Vale Bosso, UNESP/Departamento de Biologia

Rua: Cristóvão Colombo, 2265 - São José do Rio Preto - SP CEP:15055-000

e-mail: rmvb@bio.ibilce.unesp.br

ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* E *CYP1A1* EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Capítulo Dois

Análise dos polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* e *CYP1A1* em uma população brasileira.

Resumo: Polimorfismos dos genes do citocromo P-450 (*CYP*) e glutatíon S-transferase (*GST*) têm sido relacionados à suscetibilidade ao câncer e apresentam alta diversidade nas frequências alélicas entre os grupos étnicos. Avaliamos as frequências dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1* em 99 indivíduos saudáveis do noroeste do estado de São Paulo. Os polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* foram analisados por PCR-Multiplex. Os polimorfismos *GSTP1*, *CYP1A1**2A and *3 foram investigados pelo procedimento PCR-FRLP e os polimorfismos *CYP1A1**2B e *4 por PCR-SSCP. Dentre os indivíduos analisados, 34,3 e 20,2 % apresentaram genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulos, respectivamente. As frequências do polimorfismo do gene *GSTP1* foram 32,3 % para homozigotos selvagem, 58,6 % para os heterozigotos e 9,1 % para os homozigotos mutantes. Essas frequências não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P = 0,02$). A frequência alélica para o polimorfismo *CYP1A1**2A foi de 23%, com valores variando entre 17 % (negros) e 27 % (mulatos). A frequência alélica do polimorfismo *CYP1A1**2B foi de 14%, variando de 8 % (negros) a 17 % (brancos) entre os grupos. Em relação ao polimorfismo *CYP1A1**4, apenas seis indivíduos apresentaram a variante alélica no estado heterozigoto (6 %). Nossos resultados indicam que a origem étnica necessita ser levada em consideração em estudos de interação gene-ambiente envolvendo os polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1*.

Palavras chaves: *CYP1A1**2A, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, enzimas metabolizadoras de xenobióticos, população brasileira.

Artigo a ser submetido à publicação no Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

Keywords: *CYP1A1**2A, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, xenobiotic metabolizing enzymes, Brazilian population.

Analysis of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* and *CYP1A1* polymorphisms focusing a Brazilian population.

Rosa Maria do Vale Bosso¹, Lidia Maria Fonte Amorim^{2,3}, Luis Felipe Ribeiro Pinto³, Cláudia Marcia Aparecida Carareto¹, Nivea Dulce Tedeschi Conforti-Froes⁴.

¹ UNESP-São Paulo State University, Biology Department, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

² Federal University Fluminense, Biology Cellular and Molecular Department, IB, Niterói, RJ, Brazil.

³ University of Rio de Janeiro State, Biochemistry Department, IBRAG, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁴ UNESP-São Paulo State University, Laboratory of Molecular Epidemiology and Mutagenesis, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Abstract

Polymorphisms at the cytochrome P-450 (*CYP*) and glutathione S-transferase (*GST*) genes has been related to cancer susceptibility and present high diversity in allele frequencies among ethnic groups. We evaluated the frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1* polymorphisms in 99 healthy individuals residents in the northwest of São Paulo State. *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms was analyzed by PCR-Multiplex procedure, *GSTP1*, *CYP1A1**2A and *3 polymorphisms by PCR-RFLP and *CYP1A1**2B and *4 polymorphisms by PCR-SSCP. 34.3 % and 20.2 % of the individuals presented null *GSTM1* and *GSTT1* genotypes, respectively. The *GSTP1* polymorphisms frequencies were 32.3 for wild-type homozygous, 58.6 % for heterozygous and 9.1 % for mutant homozygous. This frequencies were not in Hardy-Weinberg equilibrium ($P=0.02$). The allelic frequency for the *CYP1A1**2A polymorphism was 23 % with values varying between 17 % (black) and 27 % (mulattos). For the *CYP1A1**2B polymorphism, the allelic frequency was 14 % and the values varied between 8 % (black) and 17 % (white) among the groups. Regarding to the *CYP1A1**4 polymorphism only six individuals had the variant in heterozygous state (6 %). Our results indicate that ethnic origin needs to be accounted in studies of gene-environment interaction involving the *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1* polymorphisms.

Keywords: *CYP1A1**2A, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, xenobiotic metabolizing enzymes; Brazilian population.

1. Introduction

Cancer is a multifactorial disease whose mortality has been increased in the last two decades. Concerning this issue, one plausible explanation is related to the huge amount of hazardous compounds that human are exposed, intentionally or not. According to that, much effort is increasingly focused on the study of the role of genetic factors and their interactions with environmental ones in the occurrence of this disease, once a growing number of experimental and epidemiological evidences suggest that cancer risk results from the combined effect of genes and environment (Perera and Weinstein, 2000; Norpa, 2003). This concept (gene-environment interaction) is becoming a central theme in epidemiological studies aiming to target appropriate interventions and achieve public health real goal. The prevention of environmental induced diseases relies on identifying risk factors consequently improving welfare and quality of life.

In Brazil, cancer is the second cause of death. In accordance to the National Institute of Cancer (INCA, Brazilian Ministry of Health) more than 400,000 new cases and 126,960 cancer deaths in Brazil are estimated; the State of Sao Paulo shows the highest rates, representing 147,410 new cases and 38,040 deaths (INCA, 2004). As these numbers depict, there is a regional variation in cancer incidence and mortality in Brazil, signaling that the most developed areas show the highest rates (INCA, 2004). Once again, these findings suggest that environmental and/or life style factors seem to play a role in the cancer incidence in Brazil. Consequently, the better understanding of gene-environment interactions is fully appreciated, in order to effectively target intervention strategies.

We all carry variants that increase our susceptibility to some diseases. Polymorphisms in genes that affect the response of an individual to the environment are candidate risk factors in multifactorial disorders. Several human xenobiotic-metabolizing enzymes are genetically polymorphic (Taningher *et al.*, 1999) and may lead to increased enzyme activity, absence of an active protein, or the production of a mutant protein with reduced activity (Labud *et al.*, 1999). Furthermore, many of these polymorphisms are responsible for interindividual differences in the capacity to activate and/or inactivate potential harmful compounds, which may be related to cancer onset (Autrup, 2000).

Glutathione S-transferases (GSTs) is a family of enzymes that detoxify reactive electrophiles, such as epoxides that can act as mutagens (Pinarbasi *et al.*, 2003). At

least seven distinct classes are highly expressed in the mammalian liver, however only three of them are frequently studied with regard to cancer susceptibility, including *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* (Taningher *et al.*, 1999). The *GSTM1* locus was mapped on chromosome 1p13.3 and about 50 % Caucasian individuals presented homozygous gene deletion, which ranges between 30 % and 70 % in different ethnic groups (Seidegard *et al.*, 1990; Bell *et al.*, 1992). The *GSTT1* gene is located on chromosome 22 and homozygous gene deletion has been observed in 10-60 % among different ethnic groups (Nelson *et al.*, 1995). Various studies have shown association between *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes with several types of cancers such as bladder, oral, lung, head and neck carcinomas (Conforti-Froes *et al.*, 1997; Evan *et al.*, 2001; Sreelekha *et al.*, 2001; Jeong *et al.*, 2003; Pinarbasi, *et al.*, 2003; Mohr *et al.*, 2004; Sorensen *et al.*, 2004). The *GSTP1* gene is located on chromosome 11q13 (Rossini *et al.*, 2002). Its encoded GSTP1 enzyme has the highest expression in the lung and highly detoxifies the activated form of benzo(a)pyrene (7,8-diol 9,10-epoxide; BPDE), a major of cigarette smoke carcinogen (Miller *et al.*, 2003). Polymorphisms of the *GSTP1* gene were first reported by Board *et al.* (1989). The *GSTP1**A allele is the wild-type. *GSTP1**B allele consists in an A→G transition at nucleotide 313 in exon 5, which lead to an amino acid substitution Ile105Val (Harries *et al.*, 1997). This substitution results in a lower GSTP1 enzymatic activity that has been associated with increased cancer risk (Harries *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2003) besides liver cirrhosis and pancreatitis development in chronic alcoholics (Burim *et al.*, 2004). The allelic frequency of this polymorphism was 6.9 % in Caucasians (Garte *et al.*, 2001) and 12.2 % in a Brazilian population (Rossini *et al.*, 2002).

Cytochrome P-4501A1 (*CYP1A1*) is expressed mainly in the extra-hepatic tissues (Kim *et al.*, 2004) and plays an important role in the activation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) presented in tobacco smoke, and environmental pollution (Taningher *et al.*, 1999). The gene *CYP1A1* is located on chromosome 15 and posses 7 exons and 6 introns (Kawajiri *et al.*, 1986). Fifteen *CYP1A1* polymorphisms have been identified at the present time (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>), however four of them have been more studied with regard to cancer susceptibility (Cascorbi *et al.*, 1996; Song *et al.*, 2001; Amorim *et al.*, 2002). The *CYP1A1**2A allele, which presents the T3801C transition at the 3' non-coding region, creating an *MspI* cleavage site, has been associated with lung cancer risk in Chinese smokers (Song *et al.*, 2001). This association was not confirmed in studies conducted in Brazilian populations, most likely due to the lower allele frequency (Sugimura *et al.*, 1995; Hamada *et al.*, 1995).

The *CYP1A1**2C polymorphism (A2455G), also denominated *CYP1A1**2B when it is in linkage imbalance with *CYP1A1**2A (T3801C) presents an amino acid substitution of Ile to Val in the heme-binding region that results in increased enzyme activity (Kawajiri *et al.*, 1993). These polymorphisms have shown a significant association with the increased risk of lung cancer in the Brazilian population (Hamada *et al.*, 1995; Sugimura *et al.*, 1995). The *CYP1A1**4 polymorphism, located two bases upstream of the *CYP1A1**2B allele, also presents an amino acid substitution of Thr to Asn in the heme-binding region of the enzyme, despite it has not been associated with the risk to develop lung cancer (Cascorbi *et al.*, 1996). It remains still unclear the effect of this polymorphism on enzyme activity (Song *et al.*, 2001). The *CYP1A1**3 polymorphism (T3205C) is located downstream exon 7, outside the coding region and upstream of the polyadenylation site (Crofts *et al.*, 1993). It is specific of the African population (Garte *et al.*, 1998). The frequency of these mutations also varies among different ethnic groups, with a highest prevalence of *CYP1A1**2A and *2B in Asian populations (37 % and 22 %, respectively) and a lowest rate in Caucasians (12 % and 9 %, respectively) (Garte *et al.*, 1998). On the other hand, the encountered allelic frequency of the *CYP1A1**4 polymorphism in a Turkish population is only 6% (Aynacioglu *et al.*, 1998), 3 % in a Germany population (Cascorbi *et al.*, 1996) and 3 % in a Brazilian population (Amorim *et al.*, 2004).

Brazil presents one of the most heterogeneous populations. This country is composed of South Amerindian, Portuguese, Italian and African descendants with lower number of immigrants from Spain, Germany, Syria, Lebanon and Japan (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Concerning to that, it becomes an ultimate goal to better define and increase the information available on the existence of polymorphisms distribution in genes encoding xenobiotic metabolizing enzymes and the functional significance of these. As mentioned before, the availability of comprehensive information regarding this subject should enable their application to the prevention of adverse risk effects in Brazilian population and pharmacogenomic profiling, as well. Thereafter, this paper aimed at investigating the genotypic and allelic frequencies in seven genetic polymorphisms in a Brazilian population of the northwest of the Sao Paulo State.

2. Material and Methods

2.1. Study Population

The population studied comprised 99 healthy individuals, all residents in the northwest of Sao Paulo State (Southeastern Brazil), including 53 individuals who worked in the harvest of the sugar cane, and 46 individuals (secretary, gardener, driver, maintenance auxiliary). The subjects were recruited from the period of March 2001 to December 2003. Ethnic selection was performed through an interview based on skin color, face and hair characteristics, as well as the ascendancy of the individual. The subjects were grouped in whites (63 %), blacks (26 %) and mulattos (admixture between black and white = 11 %), non-white (mulattos plus blacks = 37 %) and non-black (mulattos plus whites = 75 %).

This study was approved by the National Ethical Committee (n° 1103/2000). All participants signed a term of consent after being informed about the objectives of the study.

2.2. DNA Isolation

Blood was collected in EDTA-containing tubes and DNA was extracted from lymphocytes by proteinase-K/SDS digestion and extraction using a non-organic procedure (Abdel-Rahman *et al.*, 1994).

2.3. Genotype Analysis

2.3.1. *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms

Analysis for the *GSTT1* and *GSTM1* genes was determined simultaneously in a single assay using a PCR multiplex protocol (Abdel-Rahman *et al.*, 1996).

2.3.2. *GSTP1* polymorphisms

The polymorphism of *GSTP1* (Ile105Val) was studied by PCR-RFLP (Harries *et al.*, 1997).

2.3.3. *CYP1A1**2A and *3 polymorphisms

*CYP1A1**2A polymorphism was analyzed by PCR-RFLP as described by Kawajiri *et al.*, 1996.

Part of the population (66 individuals) were also analyzed by PCR-RFLP technique to detect *CYP1A1**2A and *3 simultaneously (Amorin *et al.*, manuscript in preparation). These conditions allow for simultaneous detection of both *CYP1A1**2A and *3 polymorphisms and also allow for detecting, using the same fragment

distribution, whether the polymorphisms occur, on the same or different alleles. Briefly, *CYP1A1* gene region from 2880 bp to 4006 bp was amplified by PCR, using 5' CCT GCT AGG GTT AGG AGG TC 3' and 5' TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT 3' oligonucleotides. The PCR reaction was performed in a 50 µl final volume containing 200 ng of genomic DNA, 0.1 mM dNTP, 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Biotools, RJ, Brazil), and 15 pmol of each oligonucleotide (DNAgency, PA, USA). The PCR cycling conditions were carried out with an initial denaturation step for 3 min at 94°C, followed by 35 cycles consisting of three steps: 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min. A final extension step was performed at 72°C for 3 min.

After amplification, the 1127 bp PCR product (13 µl), was digested with the restriction enzyme *MspI* (Fermentas, Vilnius, Lithuania) for 12 hours at 37°C, then separated through 1% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. *CYP1A1*2A* homozygous individuals presented two fragments of 918 and 205 bp and *CYP1A1*3* homozygous individuals presented two fragments of 799 and 324 bp. Heterozygous individuals of former polymorphisms had one more band of 1123 bp and when *CYP1A1*2A* and *CYP1A1*3* polymorphism were in the same allele three fragments of 549, 324 and 205 bp were created.

2.3.4. *CYP1A1*2B* and **4* polymorphisms

Polymorphisms *CYP1A1*2B* and **4* were analyzed by PCR-SSCP as described by Amorim *et al.* (2004). This technique allows for simultaneous detection of both *CYP1A1*2B* and **4* polymorphisms using different migration patterns observed in PCR-SSCP.

2.4. Statistical analysis

ANOVA was used to compare the averages of gender and age of the different ethnic groups. Expected genotype frequencies for each ethnic group were calculated from the observed allelic frequencies according to the Hardy-Weinberg law. Comparisons between the observed and the expected genotype frequencies for different populations were performed using the GenePop (GenePop Web version 3.1) software. Differences between the frequencies of the polymorphisms in different ethnic groups were calculated by the exact Fisher's test using GraphPad InStat (GraphPad software Inc., CA, USA) for the *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms and (G test using the) GenePop genotype differentiation for *CYPs* and *GSTP1* polymorphisms. Differences

of polymorphism frequencies of already decrypted populations and the frequencies found in this work were tested according to Zar (1974) calculating the differences between two proportions ($H_0: p_1=p_2$; $Z_{0.05} [2] = 1.96$).

3. Results

In this study we analyzed 99 individuals (59 males and 40 females), with a mean age of 38.2 years old, ranging from 19 to 67 years old. When the volunteers were separated by skin color, 62 were classified as white, 26 as black and 11 as mulatto (Table 1). When they were grouped according to gender or skin color, there were no significant differences in the mean age of the individuals, excepting the group of mulatto female, who was significantly younger ($P < 0.05$).

The distribution of the null *GSTM1* and *GSTT1* genotypes and the *GSTP1* polymorphism frequencies in different ethnic groups is shown in Table 2. The null *GSTM1* and *GSTT1* genotypes were found in 34.3 % and 20.2 % of the individuals, respectively, whereas 5 % had the combined null genotype of both genes. The frequencies of the *GSTM1* null genotype was 37.0 % among the white, 30.8 % among the black and 27.3 % among the mulatto individuals. For *GSTT1* null genotypes, the frequencies were 23.1 % among the black and 21.0 % among the white individuals, while only one mulatto individual presented the null *GSTT1*. It was not observed significant statistically differences between the groups.

The *GSTP1* polymorphism frequencies in these individuals were 32.3 % for Ile/Ile genotype, 58.6 % for the Ile/Val genotype and 9.1 % for the Val/Val genotype (Table 3). The Val allele frequency in this Brazilian population was 0.38.

The white individuals showed frequencies of 27.4 % Ile/Ile, 64.5 % Ile/Val and 8.1 % Val/Val genotypes; however, among the non-white sample 40.5 % corresponded to the wild-type genotype, 48.7 % to Ile/Val heterozygous and 10.8 % to Val/Val homozygous. In the white group, the *GSTP1* genotypic frequencies were not in Hardy-Weinberg equilibrium ($P=0.02$) with a frequency of heterozygous individuals higher than the expected. This result is encountered in the non-black group ($P=0.01$), certainly due to the white individuals, once the genotypes in the mulatto group were in Hardy-Weinberg equilibrium. This imbalance was also observed in total group probably caused by white group.

The frequencies found for the *CYP1A1* polymorphisms studied are depicted in Table 3. The allelic frequency for the *CYP1A1**2A polymorphism in the Brazilian

population sample was 23 %. When the individuals were stratified by skin color, the mulattos showed the highest frequency of this polymorphism (27 %), succeeded by the whites (25 %) and the blacks (17 %). For the *CYP1A1*2B* polymorphism, the allelic frequency was 14 % and the white group showed the highest frequency (17 %), followed by the mulatto (10 %) and the black (8 %) groups. Only six individuals had the *CYP1A1*4* polymorphism in heterozygous state (3 %), all of them belonging to the white group (5 %). The frequencies of these polymorphisms were similar among the different ethnic groups ($P>0.05$) and all *CYP1A1* polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. The *CYP1A1*2A* and **2B* alleles showed to be in linkage disequilibrium in 100 % of the individuals. We also analyzed 68 individuals (25% blacks, 12%, mulattos and 63% whites) regarding the *CYP1A1*3* polymorphism, which result in the wild-type allele for all samples, for this reason these samples were discarded considering the statistical analysis.

The frequencies of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* null genotypes estimated in our population were compared with frequencies reported in studies about these polymorphisms in other Brazilian populations (Table 4). The comparisons of the proportions showed significant differences between the frequencies of the null genotypes only regarding to the *GSTM1* polymorphism with populations of Brasília-DF, Pará, Rio de Janeiro, Sao Paulo states and Porto Alegre city.

4. Discussion

There is not much available information concerning *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1* polymorphisms in the Brazilian population. In addition to genes long recognized as being polymorphic, we attempt to bring emerging information about polymorphic genes in our population. According to that, our data broad the understanding of some related complex diseases-metabolizing genes, setting up an outline of the genotypes and allelic frequencies in a healthy group, located in the northwest of the Sao Paulo State. The Brazilian population is quite complex given the high degree of interracial admixture, including people from Amerindian, European and African origins (Alves-Silva *et al.*, 2000; Carvalho-Silva *et al.*, 2001; Parra *et al.*, 2003; Gattás *et al.*, 2004). Furthermore, some State's populations were predominantly white such as São Paulo (70.4 %) and others were predominantly mulatto (61.9 %) such as Bahia indicating different participations of determined ethnic group on origin of these populations (IBGE, 2000). Thus, we have an entirely unique population regarded the

frequencies of polymorphisms in genes encoding carcinogens and therapeutic drugs metabolizing enzymes. The presented frequencies of polymorphic alleles at the *GST* and *CYP1A1* gene loci contribute to enhance the knowledge focused on the genetic risk factors in environmentally induced cancers. There is consolidated information concerning the *GSTs* and *CYP1A1* polymorphisms as associated to cancer and chronic obstructive pulmonary disease susceptibility (Anwar *et al.*, 1996; Chen *et al.* 2003; Sreelekha *et al.*, 2001; Gaspar *et al.*, 2004).

Initially approaching the GSTs family, we have found that 34.3% of a Brazilian population from the northwest region of Sao Paulo State presented deleted *GSTM1* allele. This frequency is similar to those reported in other studies about *GSTM1* polymorphism in some Brazilian populations (Arruda *et al.*, 1998; Rossini *et al.*, 2002; Burim *et al.*, 2004; Gattás *et al.*, 2004). Nevertheless, our encountered frequency was significantly lower than those estimated in other groups of the Sao Paulo and even other Brazilian States (Hatagima *et al.*, 2000; Rossit, 2001; Gaspar *et al.*, 2004). The attributed difference can probably be explained by the ethnic composition of the each sample studied, since the *GSTM1* null genotype has been shown to be more frequent among white Brazilian individuals than in the blacks ones (Gattás *et al.*, 2004; Rossini *et al.*, 2002). At the same time, it is plausible to admit that our study comprised a relative higher number of afro-descendent individuals than the other samples. In addition, when our data is compared with Arruda *et al.* (1998), we could not detect difference between the frequencies of *GSTM1* null genotype. The ethnic composition effect is still strengthened when Arruda *et al.* (1998) observed a higher frequency of *GSTM1* null genotype in Caucasian (55%), compared to blacks (33%). Otherwise, the *GSTM1* null frequencies estimated by these authors were similar between Caucasians (18.5 %) and blacks (19 %); and surprisingly are also similar to those estimated in our sample without (20.2 %) or with (whites: 21.0 %, blacks: 23.1 %) stratification, according to the skin color. Likewise, the general frequency of *GSTM1* null was not different ($P > 0.05$), considering those estimated in other Brazilian samples (Hatagima *et al.*, 2000; Rossit, 2001; Rossini *et al.*, 2002; Gaspar *et al.*, 2004; Burim *et al.*, 2004; Gattás *et al.*, 2004) and in some other populations, including Germany (Schneider *et al.*, 2004) and African-American (Nelson *et al.* 1995), respectively, 18.5 and 21.8 %. In spite of that, they are lower than those described in Chinese (64.4 %) and Korean (60.2 %) populations (Nelson *et al.*, 1995). When the frequencies of the *GSTM1* null genotype were compared to the ones encountered in other countries we detected a similarity to those observed in Indians (33.4 %) (Sreelekha *et al.*, 2001), higher than in

Turkish (18 %) (Pinarbasi *et al.*, 2003) but lower than in Koreans (48.5 %) and German (47.3 %) (Schneider *et al.*, 2001; Joeng *et al.*, 2003).

According to skin color, when the Northwest Sao Paulo State population was grouped we did not observe a statistically significant difference between the polymorphism frequencies. Nevertheless, it was observed a tendency towards a decline in *GSTM1* null frequencies for the non-white group, which corroborate the data reported by Hatagima *et al.* (2000). The described skin color distribution is 70.4 % white, 4.5 % blacks, 22.9 % mulattos, 1.40 % Asian and 0.16 % Amerindian (IBGE, 2000). Most likely due to the relatively small sample, there was lack of statistical power capable to detect the expected group differences. The absence of a rigid distinction between races, due to the intense admixture in our population may be another possible reason (Alves-Silva *et al.*, 2000; Carvalho-Silva *et al.*, 2001; Parra *et al.* 2003; Gattás, 2004).

Regarding the *GSTP1* polymorphism, our results showed that 32.3 %, 58.6 % and 9.1 % presented the genotypes Ile/Ile, Ile/Val and Val/Val, respectively. The variant allelic frequency was similar ($P > 0.05$) when the proportions were compared among other Brazilian groups (Rossini *et al.*, 2002; Burim *et al.*, 2004; Gaspar *et al.*, 2004). However, our results showed different genotypic distribution compared to Rossini *et al.* (2002), studying a population from Rio de Janeiro (49.7 % Ile/Ile, 38.1 % Ile/Val and 12.2 % Val/Val). Thus, we found an increased frequency of the heterozygous, when compared with the above cited study, which revealed a higher frequency of the wild-type homozygous. Thereafter, considering this polymorphism, it has to be emphasized that both populations are not in the Hardy-Weinberg equilibrium, although our data are in agreement with Watson *et al.* (1998), that showed higher genotypic frequencies of the heterozygous between Euro-American and Afro-American individuals.

Previous research (Hatagima *et al.*, 2000) showed that Brazilian groups of Rio de Janeiro and Brasilia are not in the Hardy-Weinberg equilibrium, regarding *GSTM1* genotype, while Burim *et al.* (2004) described a Hardy-Weinberg equilibrium for the *GSTP1* polymorphism in a population of Ribeirao Preto city (northwest of Sao Paulo state).

The *CYP1A1* gene belongs to the cytochrome super family, considering the most versatile and important class of drug metabolizing enzymes in mammalian in response to xenobiotic exposure. Polymorphisms at the *CYP1A1* gene loci have been described in various ethnic groups including Caucasians, Africans, Asians and



Amerindians (Cascorbi *et al.*, 1996; Garte *et al.*, 2001; Gaspar *et al.*, 2002). In this study, we evaluated the *CYP1A1**2A, *2B, *4 and *3 polymorphisms in a sample of the Southeastern Brazil. Regarding to the mutant homozygous *CYP1A1**2A/*2A, we observed a higher frequency (4 %) than in a population of Ribeirao Preto, a city on the Northwest of the Sao Paulo State (1.4%, Burim *et al.*, 2004). Likewise, the allelic frequency was higher than in Caucasians from Germany (0.11 %, Cascorbi *et al.*, 1996) and Sweden (0.3 %, Alexandrie *et al.*, 1994) as well as the Brazilian population of Ribeirao Preto city (17.45 %, Burim *et al.*, 2004). Our study showed the highest frequency of the *CYP1A1**2A allele (27 %) in mulattos, followed by the whites (25 %) and blacks (17 %). This is in agreement with the frequencies obtained by Amorim and colleagues (manuscript in preparation) in the Rio de Janeiro population, which also found a higher allelic frequency in mulattos (26%).

The frequency of the *CYP1A1**2B/*2B genotype in this sample (2.0 %) was similar to those reported in some Brazilian populations, such as groups studied in the Rio de Janeiro State where frequencies of 2 % (Hamada *et al.*, 1995) and 1.2 % (Amorim *et al.*, 2004) were detected. Nevertheless, the allelic frequency observed by us was higher (14 %) than those of the Rio de Janeiro groups, 9 % and 8.75 %, respectively. Even so, the genotypic frequency was, respectively, 1.5 and 2 times lower than the observed in Chinese (3.2 %), and in Japanese (4.2 %) populations. On the other hand, this polymorphism was 4 times higher in Caucasian (0.57 %) and was not found in African populations (Sato *et al.*, 2000; Garte *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2001). The white individuals analyzed in our study showed the highest allelic frequency (17 %) of this polymorphism, when compared with blacks (8 %) and mulattos (10 %) and were even higher than that found in whites (8 %), blacks (5 %) and mulattos (13 %) by Amorim *et al.* (2004) in the Rio de Janeiro State population. Only six individuals had the *CYP1A1**4 polymorphism in heterozygous state (6 %) with a allelic frequency similar (3.05 %) to that population of Rio de Janeiro (3.45 %, Amorin *et al.*, 2004).

This population from Rio de Janeiro also presented the *CYP1A1**4 only in heterozygous state. The allelic frequency in white group registered in this study (5%) was also similar to that reported for a Germany population (6%; Cascorbi *et al.*, 1996). It is interesting stand out that the highest frequency for the first two polymorphisms so far described was observed in a Brazilian study in Amerindian, since the allelic frequencies varied from 81 to 100 % (*CYP1A1**2A) and 54 to 100 % (*CYP1A1**2C) (Gaspar *et al.*, 2002). Similarly, as demonstrated to the *GSTs* loci, we observed that



the *CYP1A1* polymorphisms presented a significant variation, regarding to the geographic origin and ethnic composition of the populations sampled.

In conclusion, our results indicate that ethnic origin needs to be accounted in studies of gene-environment interaction involving the *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1* polymorphisms, although we did not detect differences when the frequencies of *GSTT1* polymorphism in different Brazilian samples were compared. At the same time, additional informational about frequencies of alleles which encode for xenobiotic-metabolizing enzymes is also helpful in the development of better strategies to implement intervention in high risk groups, opening new perspectives focusing disease prevention.

Acknowledgements

This work was supported by (FAPESP) (Grants no. 00/08391-9) and CNPq.

References

- Abdel-Rahman, S.Z. et al. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of *GSTM1* and *GSTT1* genes in population studies. *Cancer Lett.*, v.107, p.229-233, 1996.
- Abdel-Rahman, S.Z. et al. Molecular interaction of (2,3-¹⁴C) acrylonitrile with DNA in gastric tissue of rat. *J. Biochem. Toxicol.*, v. 9, p. 191-8, 1994.
- Alexandrie, A. et al. Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on *CYP1A1* and *GSTM1*: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis*, v.208, p.65 -74, 1994.
- Alves-Silva, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am. J. Genet.*, v. 67, p.444-461, 2000.
- Amorim L. M. F. et al. Analysis of *CYP1A1* exon 7 polymorphisms by PCR-SSCP in a Brazilian population and description of two novel gene variations. *Mutat. Res.*, v. 547, p.35-40, 2004.
- Amorim L. M. F. et al. *CYP1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1* polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Lett.*, v.181, p.179-186, 2002.
- Anwar W. A. et al. Genetic polymorphism of *GSTM1*, *CYP2E1* and *CYP2D6* in Egyptian bladder cancer patients. *Carcinogenesis*, v. 17, p. 1923-1929, 1996.
- Arruda, V.R. et al. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (*GSTM1*) and theta (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clin Genetics*, v. 54, p. 210-214, 1998.

Autrup, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat. Res.*, v. 464, p.65-76, 2000.

Aynacioglu, A. S.; Cascorbi, I. High frequency of CYP1A1 mutations in a Turkish population. *Arch Toxicol*, v. 72, p.215-218, 1998.

Bell, D. A. et al. Genetic monitoring of human polymorphic cancer susceptibility genes by polymerase chain reaction: application to glutathione transferase μ . *Environ Health Perspect.*, v.98, p.113-117, 1992.

Board P.G. et al. Isolation of cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Ann. Hum. Genet.*, v.53, p.205 -213, 1989.

Burim, R.V. et al. Polymorphisms in glutathione S-transferase *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* and cytochromes P450 *CYP2E1* and *CYP1A1* and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. *Mutagenesis*, v.19, p. 291 - 298, 2004.

Carvalho-Silva, D.R. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am. J. Genet.*, v. 68, p.281-286, 2001.

Cascorbi I., Brockmöler, J., Roots, I.A. A polymorphism in exon 7 of human *CYP1A1*: Population frequency, mutational linkages, and lung cancer susceptibility., *Cancer Res.*, v. 56, p. 4965-4969, 1996.

Chen, S.Y. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in liver tissues of hepatocellular carcinoma patients and controls. *Int. J. Cancer*, v.99, p.14 -21, 2003.

Conforti-froes et al. Predisposing genes and increased chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers. *Mutat. Res.*, v. 379, p.53-59, 1997.

Crofts, F. et al., A novel CYP1A1 gene polymorphism in African-Americans. *Carcinogenesis*, v. 14, p. 1729-1731, 1993.

Evans, A. J. et al. Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck*, v.26, p. 63-70, 2004.

Garte, S. The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis*, v. 19, p. 1329-32, 1998.

Garte, S. et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* v.10, p. 1239-1248, 2001.

Gaspar, P. A. et al. Polymorphisms *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, and *TP3* genes in Amerindians. *Am. J. Physical Anthropology*. v. 119, p. 249-256, 2002.

Gaspar, P. et al. *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *TP3* polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics Mol. Biology*, v. 27, p. 133-138, 2004.

Gattás, G.J.F. et al. Ethnicity and glutathione S-transferase (*GSTM1/GSTT1*) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz. J. Biol. Res.* v. 37, p. 451-458, 2004.

Hamada G.S. et al. The heme-binding region polymorphism of cytochrome P4501A1 (*Cyp1A1*), rather than the RsaI polymorphism of IIE1 (*CypIIE1*), is associated with lung cancer in Rio de Janeiro. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* v.4, p. 63-67, 1995.

Harries, L.W.; et al. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*, v.18, p. 641 - 644, 1997.

Hatagima, H. et al. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphism in two Brazilian populations. *Genetics Mol. Biol.* v. 23, p. 709-713, 2000.

<http://www.imm.ki.se/CYPalleles> cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature committee. Acesso em: outubro 2003.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004). Year 2000 Census Data. <http://www.ibge.gov.br>.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: agosto 2004.

Jeong, H. et al. Association between glutathione S-Transferase M1 and T1 polymorphisms and increased risk for bladder cancer in Korean smokers. *Cancer Lett.*, v.202, p.193 -199, 2003.

Kawajiri, K. et al. The *CYP1A1* gene and cancer susceptibility. *Crit. Ver. Oncol. Hematol.* v. 14, p. 77-87, 1993.

Kawajiri, K. et al. Association of CYP1A1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung cancer. *Cancer Res.*, v.56, p.72-6, 1996.

Kim, Y. et al. Identification of cytochrome P450 isoforms involved in 1-hydroxylation of pyrene. *Environ. Res.* v.94, p. 262-266, 2004.

Labuda, D. et al. Rapid detection of CYP1A1, CYP2D6, and NAT variants by multiplex polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide assay. *Anal. Biochem.* v. 275, p. 84-92, 1999.

Miller, D.P. et al. Smoking and the risk of Lung Cancer: Susceptibility with GSTP1 Polymorphisms. *Epidemiology*, v.14, p.545 -551, 2003.

Mohr, L. C. et al. Glutathione S-Transferase M1 polymorphism and risk of lung cancer. *Anticancer Res.*, v.23, p. 2111 -2124, 2003.

Nelson, H. H. et al. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis*, v.16, p.1243 -1245, 1995.

Norppa, H. Genetic susceptibility, biomarker responses, and cancer. *Mutat. Res.*, v. 547, p.339-348, 2004.

Parra, F. C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS*, v. 100, p.177-182, 2003.



Perera, F. P.; Weinstein, I. B. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis*, v.21, p.517-524, 2000.

Pinarbasi, H. et al. Strong association between the GSTM1-null genotype and lung cancer in a Turkish population. *Cancer Genet. Cytogenet.* v.146, p.125-129, 2003.

Rossini, A. et al. Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. *Genet. Mol. Biol.*, v.1, p.233-240, 2002.

Rossit, A.R.B. Investigação molecular de polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos e ao reparo de DNA em populações brasileiras. Tese (Doutor em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto – SP, p.181, 2001.

Sato, M. et al. Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes. *Oral Oncol.*, v.36, p.267-271, 2000.

Schneider, J. et al. *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. *Cancer Lett.*, v.208, p.65-74, 2004.

Seidegard, J. Isoenzyme (s) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow-up study. *Carcinogenesis*, v.11, p.33-36, 1990.

Song, N. et al. CYP1A1 polymorphism and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case-control study in China. *Carcinogenesis*, v.22, p. 11-16, 2001.

Sorensen, M. et al. Glutathione S-transferase T1 null-genotype is associated with an increased risk of lung cancer. *Int. J. Cancer*, v.110, p.219-224, 2004.

Sreelekha, T. T. et al. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol.*, v.37, p. 593-598, 2001.

Sugimura, H. et al. *CYP1A1* and *CYP2E1* polymorphism and lung cancer, case-control study in Rio de Janeiro, Brasil. *Pharmacogenetics*, v. 5, p. S145-S1489, 1995.

Taningher M. et al. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat Res*, v. 436, p. 227-61, 1999.

Watson, M. A. et al. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*, v.84, p. 135-138, 1998.

Zar, J. H. Biostatistics Analysis. In: ____ *The Binomial Distribution*. Prentice-Hall:Englewood Cliffs, 1974. Cap.20, p. 282-300.



Table 1- Description of analysed population.

Color	Males		Females		Total	
	N	Age	N	Age	N	Age
white	35	39.8	27	40.9	62	40.2
black	18	33.9	8	40.8	26	36.0
mulatto	6	32.2	5	32.2	11	32.2
non-White	24	33.5	13	37.5	37	34.9
non-Black	41	38.7	33	39.4	74	39.0
Total	59	37.2	40	39.8	99	38.2

Non-White include mulatto and black individuals.

Non-Black include mulatto and white individuals.

Table 2. Frequencies (number and (%)) of individuals) of *GSTM1* and *GSTT1* and genotype and allelic frequencies of *GSTP1* polymorphisms in different ethnic groups.

Genotype	white		Black		Mulatto		Non-white ^a		Non-Black ^b		Total	
N	62		26		11		37		74		99	
<i>GSTM1</i> +	39 (63.0)		18 (69.2)		8 (72.7)		26 (70.3)		47 (63.5)		65 (65.7)	
<i>GSTM1</i> -	23 (37.0)		8 (30.8)		3 (27.3)		11 (29.7)		27 (36.5)		34 (34.3)	
<i>GSTT1</i> +	49 (79.0)		20 (76.9)		10 (90.9)		30 (81.1)		60 (81.1)		79 (79.8)	
<i>GSTT1</i> -	13 (21.0)		6 (23.1)		1 (9.1)		7 (18.9)		14 (18.9)		20 (20.2)	
<i>Combinations</i>												
<i>GSTM1</i> +/ <i>GSTT1</i> +	30 (48.4)		13 (50.0)		7 (63.6)		20 (54.1)		37 (50.0)		50 (50.5)	
<i>GSTM1</i> +/ <i>GSTT1</i> -	9 (14.5)		5 (19.2)		1 (9.1)		6 (16.2)		10 (13.5)		15 (15.2)	
<i>GSTM1</i> -/ <i>GSTT1</i> +	19 (30.6)		7 (27.0)		3 (27.3)		10 (27.0)		23 (31.1)		29 (29.3)	
<i>GSTM1</i> -/ <i>GSTT1</i> -	4 (6.5)		1 (3.8)		0 (0.0)		1 (2.7)		4 (5.4)		5 (5.0)	
Genotype	white		Black		Mulatto		Non-white ^a		Non-Black ^b		Total	
	Obs n(%)	Esp n(%)	Obs n(%)	Esp n(%)	Obs n(%)	Esp n(%)	Obs n(%)	Esp n(%)	Obs n(%)	Esp n(%)	Obs n(%)	Esp n(%)
<i>GSTP1</i>												
<i>Ile/Ile</i>	17(27.4)	22(35.5)	11(42.3)	11(42.3)	4(36.4)	4.3(39.1)	15(40.5)	15.5(41.9)	21(28.4)	26.6(35.9)	32(32.3)	37.5(37.9)
<i>Ile/Val</i>	40(64.5)	30.1(48.5)	12(46.2)	12(46.2)	6(54.5)	5.3(48.2)	18(48.7)	17.1(46.2)	47(63.5)	35.7(48.2)	58(58.6)	47.1(47.6)
<i>Val/Val</i>	5(8.1)	10(16.1)	3(11.5)	3(11.5)	1(9.1)	1.3(11.8)	4(10.8)	4.5(12.2)	6(8.1)	11.6(15.7)	9(9.1)	14.5(14.6)
<i>Allelic frequency</i>	0.40		0.35		0.36		0.35		0.40		0.62	
<i>P</i>	0.018*		1.00		1.00		1.00		0.01*		0.03*	

^a – Non-White includes mulatto and black individuals.

^b – Non-Black includes mulatto and white individuals.

P – Referent to the Hardy-Weinberg test.

Table 3. Observed and expected genotypic frequencies and allelic frequencies of *CYP1A1* gene in different ethnic groups.

Genotype	white		Black		Mulatto		Non-white ^a		Non-Black ^b		Total	
	Obs n(%)	Esp n(%)	Obs n(%)	Esp n(%)	Obs n(%)	Esp n(%)	Obs n(%)	Esp n(%)	Obs n(%)	Esp n(%)	Obs n(%)	Esp n(%)
*1/*1	35(56.5)	34.8(56.1)	17(68.1)	17.7(68.1)	5(45.5)	5.7(51.8)	22(59.5)	23.4(63.2)	41(55.4)	41.5(56.1)	57(57.6)	58.3(58.9)
*1/*2A	23(37.1)	23.4(37.7)	9(34.6)	7.6(29.2)	6(54.5)	4.6(41.8)	15(40.5)	12.1(32.7)	29(39.2)	27.9(37.7)	38(38.4)	35.5(35.9)
*2A/*2A	4(6.4)	3.8(6.1)	0(0.0)	0.7(2.7)	0(0.0)	0.7(6.4)	0(0.0)	1.4(3.8)	4(5.4)	4.5(6.1)	4(5.4)	5.3(5.4)
Allelic frequency	0.25		0.17		0.27		0.20		0.25		0.23	
P	1.00		1.00		0.51		0.31		1.00		0.58	
*1/*1	43(69.4)	42.7(68.4)	22(84.6)	22.1(85.0)	9(81.8)	9.1(82.7)	31(83.8)	31.2(84.3)	53(71.6)	52.7(71.2)	74(74.8)	73.8(74.6)
*1/*2B	17(27.4)	17.6(28.4)	4(15.4)	3.8(14.6)	2(18.2)	1.9(17.3)	6(16.2)	5.6(15.1)	19(25.5)	19(25.7)	23(23.2)	23.4(23.6)
*2B/*2B	2(3.2)	1.7(2.7)	0(0.0)	0.1(0.4)	0(0.0)	0.1(0.9)	0(0.0)	0.2(0.5)	2(2.7)	2(2.7)	2(2.0)	1.8(1.8)
Allelic frequency	0.17		0.08		0.10		0.08		0.16		0.14	
P	0.68		1.00		1.00		1.00		0.68		1.00	
*1/*1	56(90.3)	56.1(90.5)	26(100.0)	-	11(100.0)	-	37(100.0)	-	68(91.9)	68.1(92.0)	93(93.9)	93.1(94.0)
*1/*4	6(9.7)	5.8(9.5)	0(0.0)	-	0(0.0)	-	0(0.0)	-	6(8.1)	5.8(7.8)	6(6.1)	5.9(6.0)
*4/*4	0(0.0)	0.1(0.2)	0(0.0)	-	0(0.0)	-	0(0.0)	-	0(0.0)	0.1(0.1)	0(0.0)	0.1(0.1)
Allelic frequency	0.05		0.00		0.00		0.00		0.04		0.03	
P	1.00		-		-		-		1.00		1.00	

^a – Non-White includes mulatto and black individuals.^b – Non-Black includes mulatto and white individuals.**P** – Referent to the Hardy-Weinberg test.

– It was not possible to calculate expected frequencies due to the presence of only one allele.

Table 4 - Comparisons of frequencies (n) of *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes estimated in this study (1) with other Brazilian populations.

Populations	<i>GSTM1</i> null	<i>GSTT1</i> null	<i>GSTM1</i> null/ <i>GSTT1</i> null	<i>GSTP1</i> Val/Val
1. Northwest Sao Paulo State	34.3 (99)	20.2	5.0	9.1
2. Campinas-SP (Arruda et al., 1998)	36.9 (296)	17.7	5.0	nd
3. Brasília-DF (Hatagima et al., 2000)	48.6 (179)	nd	nd	nd
4. Rio de Janeiro-RJ (Hatagima et al., 2000)	46.0 (658)	nd	nd	nd
5. Pará State (Rossit, 2001)	48.8 (174)	18.4	6.9	nd
6. Sao Paulo-SP (Rossit, 2001)	46.5 (314)	18.5	8.3	nd
7. Rio de Janeiro-RJ (Rossini et al., 2002)	42.1 (591)	25.4	9.8	12.2
8. Sao Paulo-SP (Gattás et al., 2004)	43.9 (594)	23.1	9.1	nd
9. Bahia-BA (Gattás et al., 2004)	35.7 (137)	23.8	9.1	nd
10. Porto Alegre-RS (Gaspar et al., 2004)	50.0 (90)	21.1	nd	7.8
11. Ribeirão Preto-SP (Burim et al., 2004)	45.7(221)	19.5	nd	8.1

P-values for differences between proportions (Zar, 1974); $Z_{0.05}(2) = 1.96$. *GSTM1*: $P_1 \times P_2 > 0.05$; $P_1 \times P_3 < 0.05$; $P_1 \times P_4 < 0.05$; $P_1 \times P_5 < 0.05$; $P_1 \times P_6 < 0.05$; $P_1 \times P_7 > 0.05$; $P_1 \times P_8 > 0.05$; $P_1 \times P_9 > 0.05$; $P_1 \times P_{10} < 0.05$; $P_1 \times P_{11} > 0.05$. *GSTT1*: $P_1 \times P_2 > 0.05$; $P_1 \times P_5 > 0.05$; $P_1 \times P_6 > 0.05$; $P_1 \times P_7 > 0.05$; $P_1 \times P_8 > 0.05$; $P_1 \times P_9 > 0.05$; $P_1 \times P_{10} > 0.05$; $P_1 \times P_{11} > 0.05$. *GSTM1/GSTT1*: $P_1 \times P_2 > 0.05$; $P_1 \times P_5 > 0.05$; $P_1 \times P_6 > 0.05$; $P_1 \times P_7 > 0.05$; $P_1 \times P_8 > 0.05$; $P_1 \times P_9 > 0.05$; $P_1 \times P_{10} > 0.05$; $P_1 \times P_{11} > 0.05$. *GSTP1*: $P_1 \times P_7 > 0.05$; $P_1 \times P_{10} > 0.05$; $P_1 \times P_{11} > 0.05$.

EFEITO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* E *GSTP1* NOS NÍVEIS DE 1-HIDROXIPIRENO URINÁRIO E ATIVIDADE MUTAGÊNICA DA URINA DE CORTADORES DE CANA-DE-AÇÚCAR

Capítulo Três

Efeito dos polimorfismos genéticos *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* e nos níveis de 1-hidroxipireno urinário e atividade mutagênica da urina de cortadores de cana-de-açúcar.

Os cortadores de cana-de-açúcar estão expostos a vários compostos genotóxicos incluindo os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), derivados do processo incompleto de combustão dos canaviais. Para avaliar a exposição ocupacional à queima das folhas da cana-de-açúcar e seus efeitos genotóxicos, analisamos urina de 42 cortadores de cana do noroeste do Estado de São Paulo em dois períodos, na safra, quando os trabalhadores estão expostos à fuligem da queima dos canaviais, e na entressafra (época do plantio). Investigamos a mutagenicidade da urina em linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1041 e YG1024, os níveis urinários de 1-hidroxipireno (1-OHP) e a influência dos polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* e *CYP1A1*. Um grupo controle, constituído por indivíduos que não trabalhavam no corte da cana, também foi amostrado. Os resultados mostraram que oito amostras de urina dos cortadores de cana expostos foram mutagênicas ou apresentaram traços de mutagenicidade. Além disso, 41 e 62 % das amostras de urina dos trabalhadores expostos foram tóxicas para as linhagens TA98 e YG1041, respectivamente. Devido a alta toxicidade da urina não foi possível verificar associação entre mutagenicidade urinária e os polimorfismos. Os níveis de 1-OHP urinário foram significativamente maiores ($P < 0,0000$) em cortadores de cana expostos que nos grupos não-exposto e controle; entretanto, não houve influência dos polimorfismos na excreção desses metabólitos. As análises mostraram uma possível interação nos níveis de 1-OHP urinário com os polimorfismos *CYP1A1**2A, *4 e *GSTP1* no grupo exposto. Este estudo indica que os cortadores de cana estão significativamente mais expostos aos PAHs e a compostos mutagênicos no período da safra que na entressafra e que o grupo controle.

Palavras chaves: cortadores de cana-de-açúcar, mutagenicidade urinária, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), 1-hidroxipireno (1-OHP), polimorfismos genéticos.

Artigo a ser submetido à publicação no periódico Mutation Research - Genetics Toxicology and Environmental Mutagenesis.

Effects of *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* genetic polymorphisms on urinary 1-hydroxypyrene levels and mutagenicity in sugarcane workers

Rosa Maria do Vale Bosso¹, Lidia Maria Fonte Amorim^{2,3}, Sandro J. Andrade⁴, Luis Felipe Ribeiro Pinto³, Mary Rosa de Marchi⁴, Carlos Ponce de Leon⁵, Cláudia Marcia Aparecida Carareto¹, Nivea Dulce Tedeschi Conforti-Froes⁶.

¹ UNESP-São Paulo State University, Biology Department, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

² Federal University Fluminense, Biology Cellular and Molecular Department, IB, Niterói, RJ, Brazil.

³ University of Rio de Janeiro State, Biochemistry Department, IBRAG, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁴ UNESP-São Paulo State University, Analytical Chemistry Department, Institute of Chemistry, Araraquara.

⁵ University of Rio de Janeiro State, Epidemiology Department, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁶ UNESP-São Paulo State University, Laboratory of Molecular Epidemiology and Mutagenesis, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Abstract

Sugarcane workers in Brazil are exposed to various genotoxic compounds, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), derivative from incomplete combustion process of burnt sugarcane fields. To evaluate the occupational exposure to burning of the sugarcane fields and their genotoxic effects we evaluated the urine of 42 sugarcane workers of northeastern Sao Paulo State when exposed (harvesting) and when non-exposed (non-harvesting) to burning to the sugarcane fields. The urinary mutagenicity in *Salmonella* TA98, YG1041 and YG1024, the urinary levels of 1-hydroxypyrene (1-OHP) and the influence of *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* genetic polymorphisms were evaluated. Control group, with workers non-related to sugarcane plantation, was also sampled. Our results showed that eight urine samples of the exposed sugarcane workers were mutagenic or presented traces of mutagenicity. Moreover, 41 and 62 % of urine samples of exposed workers were toxic for TA98 and YG1041 strains, respectively. Due this higher toxicity it was not possible to detect association between urinary mutagenicity and polymorphisms. The 1-OHP levels of the exposed sugarcane workers were significantly higher than the non-exposed and control group. No influence regarding to the polymorphisms were observed. The analyses showed a possible interaction between the levels of 1-OHP with *CYP1A1**4, *2A, and *GSTP1* polymorphisms in the exposed group. The present study indicates that the same group of sugarcane workers is significantly more exposed to PAHs and genotoxic compounds during the harvesting period than during the non-harvesting period and than a control group.

Keywords: Sugarcane workers, urinary mutagenicity, 1-hydroxypyrene (1-OHP), genetic polymorphisms, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).

Introduction

Brazil is the world's largest sugarcane producer with about 4.5×10^6 hectares of sugarcane fields and 324 ethanol production plants (Zamperlini *et al.*, 1997). Before the sugarcane harvest, the leaves are burnt in order to make harvesting easier. The burning leads to production of soot that is supposed to increase respiratory problems in the exposed workers. Sugarcane workers are exposed to various genotoxic compounds, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) derivative from incomplete organic combustion process. PAHs undergo metabolic activation by phase I enzymes, mainly cytochrome P4501A1 (CYP1A1), to diol epoxides which are capable to bind covalently to DNA, potentially initiating the carcinogenic process (Hall & Grover, 1990). Activated PAH metabolites can be detoxified by phase II enzymes, such as glutathione S-transferases (GSTs) and uridine diphosphoglucuronosyltransferase (UDP glucuronyl-transferase), which catalyze conjugative reactions of oxidative products (Nerurkar *et al.*, 2000). In humans, a substantial variability in biological response to PAHs is expected, once there is interindividual differences in the rate and metabolism pathways of this carcinogen, determined by genetic polymorphisms of phase I and II enzymes (Alexandrie *et al.*, 2000).

The CYP1A1 gene is characterized by several polymorphisms, two of which are of interest in the biotransformation of PAHs, one in the 3'- non coding region (*CYP1A1*2A*, T3801C) and the other within exon 7 (*CYP1A1*2B*, A2455G). These variants in the *CYP1A1* gene have been extensively studied, especially to evaluate their possible role in DNA damage and cancer promotion (Grzybowska *et al.*, 2000; Gaspar *et al.*, 2004). *CYP1A1*4* (C2453A) polymorphism have shown to produce a variant protein that possess different catalytic activities when compared to the wild type protein (Schwarz *et al.*, 2001) and it was associated with an increased risk of endometrial cancer (Esteller *et al.*, 1997). The *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* genes have also been reported to be polymorphic (Seidgard *et al.*, 1988, Pemble *et al.*, 1994; Harries *et al.*, 1997;). The lack of *GSTM1* activity, caused by an inherited homozygous deletion of the *GSTM1* gene (null genotype), has been associated with an increased lung cancer risk (Pinarbasi *et al.*, 2003; Mohr *et al.*, 2003). Several studies have shown a greater urinary mutagenicity among individuals with null *GSTM1* genotype (Hirvonen *et al.*, 1994; Binková *et al.*, 1996). The *GSTT1* polymorphism is also caused by a deletion that results in total lack of gene product. The null genotype of *GSTT1* was reported to be associated with an increased risk of oral and lung cancer (Sreelekha *et*

et al., 2001; Sorensen *et al.*, 2004). The polymorphism of the *GSTP1* gene, which consists in an A → G transition at nucleotide 313 in exon 5 leads to an Ile → Val substitution in the substrate-binding active site of the enzyme. This substitution has been associated with a reduced conjugating activity of the enzyme (Taningher *et al.*, 1999) and also with higher levels of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-DNA adducts in human lymphocytes (Miller *et al.*, 2003).

Urinary mutagenicity is a biomarker that has been used for more than two decades to evaluate lifestyle and occupational exposure to mutagens and carcinogens (Yamasaki & Ames, 1977; Falck *et al.*, 1980). Although urinary mutagenicity is non-specific, due to its non specificity to identify or test individual mutagens in the urine, it has the advantage of integrating the biological effects of mixtures of mutagenic compounds as they occur in the environment (DeMarini *et al.*, 1997). Urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP) is a widely used biological marker of exposure to PAHs and indicator for internal dose of activated PAHs (Jongeneelen *et al.*, 1987; Adonis *et al.*, 2003). PAH metabolites may be excreted either as free or as conjugated compounds. When 1-OHP is measured after treating the urine with deconjugating enzymes (e.g., β -glucuronidase), the sum of conjugated and deconjugated species are quantified, reflecting the total amount of hydroxylate metabolite. Although 1-OHP itself is not a carcinogen, it can be used as a marker for a major activating step in the metabolism of PAHs (Nerurkar *et al.*, 2000). The mutagenicity assay provides a measure of exposure to a mixture of mutagenic compounds ubiquitous in the environment, where urinary metabolite analysis indicates the exposure to a specific chemical or a class of compounds (Kato *et al.*, 2004).

The aim of the present study was to evaluate 1-OHP concentrations and mutagenic activity in urine as a biological marker of exposure. At the same time, it was also analyzed the influence of *CYP1A1*, *GSTP1* and *GSTM1* and *GSTT1* genetic polymorphisms, single and combined, on the urinary excretion of mutagens in non-smoking sugarcane workers during the harvesting time (when the cane fields were burnt) and the same set of workers during the non-harvesting time. The control group, with 21 subjects that were not sugarcane workers, was also used to compare 1-OHP levels and 1-OHP levels stratified by genotype polymorphisms.

Material and methods

1. Study subjects and sample collection

The study group consisted of 42 sugarcane workers (Table 1) resident in the northwest of Sao Paulo State on Brazil. The workers normally go to the field few hours after the burning of the sugarcane foliages, therefore being exposed to products released from the combustion of the plantations. The subjects were classified as exposed ($n=41$, mean age 33.73 ± 1.68 years old) corresponding to workers whose samples were collected during the harvesting time (April to November), when the sugarcane fields were burnt, while the non-exposed ($n=34$, mean age 35.21 ± 1.89 years old) corresponded to the same set of workers whose samples were collected during the non-harvesting time (December to March), period without exposure to sugarcane combustion products. The control group ($n=21$, mean age 44.48 ± 1.50 years old) are related to subjects at the same Brazilian region that were not sugarcane workers (secretary, gardener, driver, maintenance auxiliary).

This study was approved by the National Ethical Committee and it was obtained a written informed consent from all the individuals who agreed to participate. A questionnaire was addressed to each person in order to obtain information about individual lifestyle. It has to be emphasized that and just nonsmokers were invited to participate of the study. In addition, they were instructed to follow some procedures, such as do not eat fried, grilled or barbecued meat in the 24 h preceding the urine sampling. Urine samples were collected in polyethylene containers at the end of the work shift for at least three consecutive days, and each sample was a pool of several mictions from the same individual. After collection, the samples were stored at -20°C until further processing.

2. Determination of urinary mutagenicity

The urinary mutagenicity was evaluated in 29 exposed and in 25 non-exposed sugarcane workers. The urinary extracts were prepared according to DeMarini *et al.* (1997) with some modifications. After urine thawing at room temperature, the pooled urine samples that were collected from an individual on at least three consecutive days were mixed and filtered once through Whatman nº 41 filter papers. Mega Bond Elut C-18 columns (5 g / 20 mL) (Varian, Harbor, City, USA) were washed with 10mL methanol (Merck) and equilibrated with 20mL of distilled water. One hundred and eighty five milliliters of urine were passed through the column (2-3 mL / min). The



column was washed with 20 mL water in order to remove residual urine and histidine and eluated with 15 mL methanol. All eluates were stored frozen (-20°C) until further use. The metanol was evaporated under a stream of nitrogen and resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO) before testing.

The urine samples were evaluated for mutagenic activity in the microsuspension assay according to Kado *et al.* (1983), which presents a 5-10 times higher sensitivity than the traditional Ames test (Maron & Ames, 1983; Vargas, 2003). These experiments were done with S9 mixture (4%, v/v) that is composed of a homogenate from cells of livers of Sprague-Dawley rats that were pre-treated with a polychlorinated biphenyl mixture (Aroclor 1254) to induce an increase in the P-450 enzymes in this organ (Vargas, 2003). The strains tested were the frameshift strains TA98 (*hisD3052*, *uvrB*, *rfa*, pKM101) and its homologues YG1041, which contains O-acetyltransferase and nitroreductase activities (Hagiwara *et al.*, 1993) and YG1024, with elevated levels of N-acetyltransferase/O-acetyltransferase (Watanabe *et al.*, 1990). The samples were tested at five to seven different doses ranging from 0.06 to 5 mL urine-equivalents (mL-eq) per plate. In test tubes were added urine samples in different doses, 50 μL (5-fold concentrated) bacterial culture, and 50 μL of S9 mix. After pre-incubation for 90 min at 37°C , 2 mL of top agar were added and the content of the tube poured onto minimal agar plates. The assays were performed using triplicate plates. DMSO was used as negative control. Positive control were 2-aminoanthracene at concentrations of 0.625 μg per plate (TA98) and 0.03125 μg per plate (YG1041). The background was carefully evaluated for toxicity using a stereomicroscope. The results were analyzed performing an ANOVA test followed by a linear regression analysis with the Salanal computer program and the mutagenic potencies were calculate from linear portion of dose-response curve and exposed in revertants per milliliter urine equivalent (rev/mL-eq). A sample was considered mutagenic when the ANOVA was significant ($p < 0.05$), the ratio of mutagenicity (RM) was ≥ 2 and the doses used permitted the generation of dose-response curves significant ($p < 0.05$). If ANOVA and dose-response were significant, but the RM was lower than 2 the result was considered marginal (im). When it was possible to repeat the assay and it was maintained, this was considered positive.

3. Analysis of urinary 1-hydroxypyrene

Determination of 1-OHP was done with a modification of the method described by Jongeneelen *et al.* (1987). A 20 mL aliquot of urine was adjusted to pH 5.0 with 1.0

M hydrochloric acid and acetate buffer (0.1 M; pH 5.0) was added to a total volume of 30mL. This mixture was incubated for 2.5 hours with 12.5 μ L of β -glucuronidase / arylsulfatase (30U / mL and 60U / mL, respectively – Merck, Darmstadt/Germany) at 37°C in an electronically controlled rotary shaking bath (210 rpm). The samples were then centrifuged, and the metabolites were extracted and purified through Bond Elut C-18 columns from the supernatant (200 mg / 3 mL) (Varian, Harbor City, USA). The cartridges were activated with 5mL of methanol, followed by 10 mL of distilled water, before applying the hydrolyzed urine sample. The samples were subsequently washed with 8 mL of distilled water and finally eluted with 10 mL of methanol. After 1-OHP elution, the methanol was evaporated to dryness under a gentle nitrogen flow and the residue dissolved in 1.0 mL methanol. All analyses were performed with an HPLC system (Varian, Walnut Creek, USA) consisting of a Pro Star pump, a model 400 autosampler and a model 360 fluorescence detector. Separation was achieved on a 250 mm x 4.6 mm i.d. C18 column (particle size 5 μ m) (Varian, Walnut Creek, USA). Elution was performed with water-methanol gradient (0-15 min linear gradient from 46 to 96% methanol, 15-20 min 96 to 100% methanol). Flow rate was 0.8 mL.min⁻¹, injection volume was 20 μ L. Excitation and emission wavelength were 242 nm and 388 nm, respectively.

The 1-OHP urinary concentrations were exposed as μ mol mol⁻¹ of creatinine to account for differences in urine dilution. The concentration of creatinine was determined with a standard creatinine Kit (Labtest Diagnostica). After analysis, it was possible to obtain results from 39 sugarcane workers on harvesting, 32 sugarcane workers on non-harvesting and 21 subjects on control group.

4. DNA extraction

Genomic DNA samples were obtained from blood lymphocytes using a non-organic extraction procedure (Abdel-Rahman *et al.*, 1994).

5. Determination of metabolizing genotypes

a. *CYP1A1* genotypes

*CYP1A1**2A

The *MspI* polymorphism in the 3'-flanking region (T3801C) of the *CYP1A1* gene was analyzed by PCR-RFLP (Kawajiri *et al.*, 1996). PCR was carried out in a total volume of 25 μ L containing 200 ng genomic DNA, 80 nM each of the upstream and downstream primers (5'-CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT-3' and 5'-TAG GAG TCT TGT



CTC ATG CCT-3'), 2 mM each of four deoxynucleotide phosphates, 1 U *Taq* DNA polymerase, 2 mM $MgCl_2$ and 2.5 μL of 10X PCR buffer (Invitrogen). Amplification comprised of an initial denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min. This was followed by a final step at 72°C for 7 min. The PCR products were precipitated using 100% ethanol at -70°C for 1h, centrifuged and ethanol was evaporated at room temperature for 2 h. This was done because the excess of nucleotides present in the PCR products may reduce the enzyme activity. The amplified fragments were then digested overnight at 37°C with 1 U *MspI* in a total volume of 15 μL , and the products were separated on a 2 % agarose gel and stained with ethidium bromide. The presence of a single 340 bp fragment indicated the wild type genotype (*CYP1A1**1/*1), whereas the presence of a 200 and 140 bp fragments indicated the homozygous polymorphic genotype (*CYP1A1**2A/*2A). Heterozygous individuals had all three types of fragments.

b. *CYP1A1**2B and *CYP1A1**4

The polymorphisms of *CYP1A1**2B and *CYP1A1**4 were studied by PCR-SSCP as described by Amorim *et al.* (2004). For specific amplification of region of the *CYP1A1* gene, from 2289 to 2645 bp, it was used the oligonucleotides sense (5'GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT3') and anti-sense (5'GTA GAC AGA GTC TAG GCC TCA3') described by Kawajiri *et al.* (1996) resulting in an amplifcon of 356 bp. The PCR reaction was performed in a 50 μL final volume containing 200 ng of genomic DNA, 0.1 mM dNTP, 75 mM Tris-HCl (pH = 9.0), 50 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1.0 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), and 15 pmol of each oligonucleotide (DNAgency, PA, USA). The PCR cycling conditions were carried out with an initial denaturation step for 3 min at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 63°C for 1 min and 72°C for 1 min. This was followed by a final step at 72°C for 3 min. PCR products were diluted two-fold with a formamide denaturing buffer (95% formamide, 100 mM EDTA, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol), heated at 95°C for 5 min, chilled on ice for at least 5 min and 7 μL were loaded onto a non-denaturing 10% polyacrylamide gel (49:1 acrilamide:bisacrilamide). The electrophoresis was run at 8 V / cm, using a Vertical Gel electrophoresis Apparatus Model V16-2 (GibcoBRL, MD, USA), in 1 X Tris-borate-EDTA buffer for 24 h, at approximately 24°C, and silver stained as described elsewhere (Bassam *et al.*, 1991). The different patterns observed in the analysis were genotyped by similarity with controls previous genotyped by Amorim *et al.* (2004).

c. *GSTT1* and *GSTM1* genotypes

Analysis for the *GSTT1* and *GSTM1* genes was determined simultaneously in a single assay using a PCR multiplex protocol (Abdel-Rahman *et al.*, 1996), where part of exon 7 of the *CYP1A1* constitutional gene was coamplified as an internal control. Amplification comprised of an initial cycle with denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 2 min, annealing 59°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. A final extension step at 72°C for 10 min terminates the process. PCR products were visualized in ethidium bromide stained 2% agarose gels. The absence of *GSTM1*- or *GSTT1*- specific fragment (bands at 215 and 480 bp, respectively) indicated the corresponding null genotype, whereas the *CYP1A1*- specific fragment (312 pb) corresponded to the positive control.

d. *GSTP1* genotype

The polymorphism of *GSTP1* (Ile105Val) was studied by PCR-RFLP (Harries *et al.*, 1997). Genomic DNA (100 ng) was used as a DNA template in 50 µL of total volume reaction. The PCR products were digested in 25 µL for 2 h at 37°C with 5 U *Alw216* (MBI Fermentas, Lithuania). The digestion products were separated on a 3.5% agarose gel stained with ethidium bromide or on a 10% polyacrylamide gel that was silver stained (Sanguinetti *et al.*, 1994). The presence of a 176-pb fragment indicated the wild type genotype (I/I), whereas 85- and 91-pb fragments indicated the homozygous polymorphic genotype (V/V). Heterozygous individuals had all three types of fragments.

e. Statistical analysis

A log-transformation for the concentration of 1-OHP was used in the analysis so as to normalize the response (Shapiro-Wilk test). In order to assess group differences in log (1-OHP) levels, a one-sample *t* test was used for comparing Harvest with Non-Harvest; and a two-sample *t* test for comparing Harvest with Controls or Non-Harvest with controls. Two-sample *t* tests were also used to compare log (1-OHP) levels in Harvest, stratified by age (young = 19-25 years versus old = 26-67 years), gender or *CYP1A1* or *GST* genotypes. Likewise this test was used for the stratified analysis of Non-harvest and Control groups. Multiple regression analysis was carried out with log (1-OHP) as the dependent variable. The independent variables for genotypes were defined as variants = 1 and wild type = 0. *CYP1A1* *1/*1 = 0; *CYP1A1* *1/*2A or *2A/*2A = 1; *CYP1A1* *1/*2B or *2B/*2B = 1; *CYP1A1* *1/*4 = 1; *GSTM1* (+/+) = 0

or *GSTM1* (0/0) = 1; *GSTT1* (+/+) = 0 or *GSTT1* (0/0) = 1; *GSTP1* (Ile/Ile) = 0 or *GSTP1* (Ile/Val or Val/Val) = 1. The modeling strategy was to fit the model chosen by a forward stepwise method with a minimum *P*-value of 0.25. Residual diagnostic was performed for the model. Statistical analysis was carried out with STATA, version 8.2.

Results

We have evaluated the mutagenicity of urine sample, urinary levels of 1-OHP and metabolizing genotype in nonsmokers exposed and non-exposed sugarcane workers (Tables 2 and 3).

Urinary mutagenicity

Among the 29 samples of urine in the sugarcane workers exposed to burning of the sugarcane fields 12 samples (41 %) were toxic and presented toxicity above 2.5 and 5 mL-eq / plate, 2 subjects (7 %) had mutagenic urine (mutagenic potencies were 100 and 35 rev / mL-eq), 2 samples (7 %) had trace of mutagenic activity, and 13 samples (45 %) were non-mutagenic when the TA98 strain was used. In relation to the YG1041 strain, 18 samples (62 %) were toxic with toxicity above 0.5 mL-eq / plate, 1 urine sample (4 %) was mutagenic (potency was 52 rev / mL-eq), 3 samples (10 %) had trace of mutagenic activity, and 7 samples (24 %) showed no mutagenic activity. Ten samples were evaluated with the YG1024 strain, including the two samples that had shown to be mutagenic for TA98. These two samples were also mutagenic regarding to the strain YG1024 (mutagenic potencies were 12 and 90 rev / mL-eq, respectively). The results showed that 1 sample presented toxicity at 0.5 mL-eq / plate, 5 samples (50 %) was mutagenic and 4 samples (40 %) were not mutagenic (Table 2). Among the 25 samples of urine in the non-exposed sugarcane workers, 3 (12 %) were toxic above 2.5 mL-eq / plate, 1 sample (4%) was mutagenic (mutagenic potency was 30 rev / mL-eq) and 21 samples (84%) were not mutagenic to the TA98. When the samples were evaluated with YG1041, 12 (48 %) presented toxicity in 2.5 and 5 mL-eq / plate, 1 urine sample (4 %) was mutagenic, 2 samples (8 %) presented traces of mutagenic activity and 10 (40 %) were not mutagenic (Table 3). Considering all the samples, eight showed mutagenicity or traces of mutagenic activity and 18 were toxic (Table 4).

Urinary 1-OHP

The concentration of urinary 1-OHP ranged from 0.03 to 2.72 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine in sugarcane exposed workers, from 0.002 to 2.15 in sugarcane the non-

exposed workers (Tables 2 and 3) and from 0.008 to 0.016 in the controls (data not shown). Table 5 shows the geometric means of log (1-OHP). The geometric mean concentration of urinary log (1-OHP) in workers exposed ($0.318 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine) was significantly higher ($P < 0.0000$) than in the non-exposed sugarcane workers ($0.035 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine). The geometric mean value of urinary log (1-OHP) in the exposed sugarcane workers also demonstrated to be significantly higher ($P < 0.0000$) than in controls ($0.041 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine). The log (1-OHP) levels in the non-exposed sugarcane workers compared with control group did not depict significant difference ($P = 0.6957$).

Regarding the individuals age of the sample composition, there was an over representation of elder workers (range 26-67 years old); however, the 1-OHP excretion was significantly higher ($P = 0.0025$) among the younger individuals (range 19-25) in non-exposed situation. It was not found statistically significant difference between genders ($P > 0.05$) in the three groups studied (Table 5).

The effects of genotypes on urinary 1-OHP are shown in Table 6. No significant differences ($P > 0.05$) was found between levels of 1-OHP in any of the polymorphisms in sugarcane workers. Interestingly, in the non-exposed group the 1-OHP excretion was lower for the *CYP1A1* variants, but higher compared to GSTs allelic variants, mainly *GSTM1* and *GSTP1*. The control group with the wild-type genotype (*GSTP1 Ile/Ile*) excreted significantly higher levels of urinary 1-OHP than the individuals carrying at least one *GSTP1 Val* variant allele ($P = 0.0278$).

Multivariate regression analysis (Table 7) was performed with log (1-OHP) using the model chosen by a forward stepwise method adjusting with all the variables with a minimum *P*-value of 0.25. These analyses showed that there is a possible interaction with *CYP1A1*4*, **2A*, and *GSTP1* polymorphisms in the exposed group. When analyzed in combination, all three genotypes had a reduction in its *P* value observed in *t* test analysis, principally *CYP1A1*4* genotype ($P = 0.060$). However, even though the adjust was not possible to depict a significantly contribution of this genotypes related to the urinary 1-OHP excretion. In the non-exposed group the age significantly influenced ($P = 0.002$) the excretion of 1-OHP. Moreover, in the control group the *CYP1A1*2A* and *GSTP1* polymorphisms significantly influenced the concentration of urinary 1-OHP ($P < 0.05$ for all). Individuals with the allele variant *CYP1A1* 2A* excreted significantly higher level of 1-OHP while those carrying the variant *GSTP1* excreted significantly lower levels.

Discussion

Urinary mutagenicity

The mutagenicity tests measure the intrinsic ability of the test chemical or its metabolites to react with DNA to produce a pre-mutagenic lesion. Thus, the *Salmonella* test measures the ability of a chemical to induce mutations, not cancer. Therefore, a positive result in a *Salmonella* test is a true measure of the ability of the test chemical to induce gene mutations. A chemical that is mutagenic in *Salmonella* is presumed to be a rodent carcinogen, and potential human carcinogen (Zeiger *et al.*, 2001). The urinary mutagenicity test is a useful method for assessing the actual human burden of environmental mutagens. This test system has been applied for estimating mutagens exposure in various occupational settings, including workers in the rubber industry (Bos *et al.*, 1989), coke oven workers (Clonfero *et al.*, 1995), charcoal workers exposed to wood smoke (Kato *et al.*, 2004) and in detecting environmental exposures to genotoxins (Cerná *et al.*, 1997).

When the TA98 strain was used, only 2 samples (7 %) of the urine in sugarcane workers exposed to burning of the sugarcane fields were mutagenic. In relation to the YG1041 strain, only 1 sample (4 %) was mutagenic and from 10 samples evaluated with the YG1024 strain, 5 were mutagenic. This low mutagenicity is consistent with few rings PAHs such as pyrene, and suggests a slight contribution of nitrate PAHs to the mutagenicity of urine samples. Moreover, our results showed that 41 % of samples of the exposed sugarcane workers were toxic for TA98 strain and 62 % in relation to the YG1041 strain in dose usually above 5 mL-eq/plate. In the charcoal workers study, the samples that underwent acid or alkaline extractions were not toxic below 12 mL-eq/plate, whereas samples without this kind of extraction, done in our study, presented toxicity at 3 mL-eq/plate. This suggests the presence of acid and basic cytotoxins in the urine of charcoal workers (Kato *et al.*, 2004). Toxic effects were also often observed at higher urine volumes in a group of women working outdoors in the Northern Bohemia exposure to ambient air pollution (Cerná *et al.*, 1997). The frameshift *Salmonella typhimurium* strain TA98 was used to estimate the efficiency of the more sensitive *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1024 strains in this particular occupational setting, thereafter, it was not possible to perform this comparison due to the high toxicity of the samples. Thereby, we suggest the fractionation of urine samples extract of the sugarcane workers. Strain YG1041 used in this study is sensitive to frameshift mutations caused by complex mixtures containing

PAH and aromatic amines, especially nitroarenes and arylamines (Hagiwara *et al.*, 1993), such as those presented in cigarette smoke. It is uncommon the use of this strain to assess mutagenicity in urine samples, and the literature offered only a few examples to which our results could be compared. Only Cerná *et al.* (1997) and Kato *et al.* (2004) used a sample preparation procedure similar to ours. The values reported in these two studies were higher than those of sugarcane workers exposed, when it was possible to observe the positive response in our samples. Kato *et al.* (2004) have shown that exposed workers had increased odds of having toxic urine relative to non-exposed workers. In the evaluation of the mutagenicity of urban air pollution and also of urine of subjects exposed occupationally to outdoor pollution, the YG1041 strain with the addition of S9 was more sensitive than the more traditional TA strains (Cerná *et al.*, 1997). According to Kato *et al.* (2004), this observation suggests more cytotoxic urine, due to the presence of aromatic amines and nitroarenes in the exposed workers relatively to that of the non-exposed workers. Compounds such as these may have accounted for our finding that exposed workers had 62 % of toxic urine compared to 48 % non-exposed workers.

Urinary 1-OHP

Our study assessed the influence of *CYP1A1*, *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* polymorphisms on occupational exposure to PAHs in nonsmokers' sugarcane workers during the harvest time (exposed) and during the non-harvest time (non-exposed). Only nonsmokers were selected for this purpose, once the smoking habit has a profound effect on the urinary concentrations of 1-OHP (Clonfero *et al.*, 1995) and mutagenic activity (Kuenemann-Migeot *et al.*, 1997). The urinary level of the pyrene metabolite 1-OHP has been suggested as a biomarker of PAH exposure due to the high sensitivity of the analytical method and additionally to take into account all the exposure routes. Furthermore, in occupational settings the 1-OHP content in urine may be increased 10-100 fold (Alexandrie *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2004). Large variations in urinary 1-OHP were found among the sugarcane workers. The mean concentration of urinary 1-OHP in the exposed workers was significantly higher than the mean concentration in non-exposed sugarcane workers. The half-life of 1-OHP is reported to be 18.6 h (Lu *et al.*, 2002) and the urine of sugarcane workers during the non-harvest time was collected after three months of the harvest time. There was also significant difference between the excretion of 1-OHP in exposed sugarcane worker groups and controls. The urinary levels of 1-OHP among exposed workers were higher than those

reported for charcoal workers ($0.07 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine), a Brazilian group exposed to wood smoke (Kato *et al.*, 2004), in non-smoking bus drivers ($0.19 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine) and non-smoking mail carriers ($0.11 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine) in a Danish population (Hansen *et al.*, 2004). Nevertheless, lower to the levels ($0.94 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine) were reported for non-smoking in coke oven Italian workers, engaged on various tasks (Clonfero *et al.*, 1995) and $2.81 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine for non-smoking in Koreans coke oven workers (Nan *et al.*, 2001). It can be plausible to observe that it was also lower than nonsmokers individuals exposed to diesel exhaust, including workers of the diesel plants ($2.18 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine) and street vendors ($2.18 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine) in Santiago of Chile urban area (Adonis *et al.*, 2003). Our results showed that the 1-OHP excretions were significantly higher in the younger individuals of non-exposed group. This effect may be due to the reduced creatinine excretion with age (Hansen *et al.*, 2004) or breathing behaviour (Jacob & Seidel, 2002). However, no effect was observed in the exposed sugarcane workers. Hence this effect may be an artifact.

The levels of 1-OHP was higher in the exposed workers carrying *CYP1A1**2A, *2B, *4 and *GSTM1* but the difference was not significant. Our results are in agreement with Pan *et al.* (1998) that showed no influence of *GSTM1* or *CYP1A1* (Ile/Val) polymorphism on 1-OHP excretions in a group of 99 Chinese coke-oven workers. Likewise, no influence of the *CYP1A1**2A and *2B and *GSTM1* genetic polymorphisms on the urinary levels of 1-OHP was detected in workers of two electric steel plants and an iron foundry that were exposed to high levels of PAHs (Apostoli *et al.*, 2003). Hemminki *et al.* (1997) also found no influence of genotypes *GSTM1* or *CYP1A1* on urinary 1-pyreno levels in foundry workers. In contrast, gene-environment interactions on the excretion of 1-OHP were confirmed by Alexandrie *et al.* (2000) in aluminium smelter workers, where *CYP1A1**2B, and *GSTM1* polymorphisms were found to have significant influence on 1-OHP excretion. This study showed that total particulate-associated PAH exposure, use of respiratory protection devices and metabolizing genotype for the *CYP1A1* and *GSTM1* genes significantly determined urinary 1-OHP excretion.

Our study showed no significant differences in the level of 1-OHP in individuals with null *GSTM1*. These data are in agreement with Merloi *et al.* (1998). Actually, *GSTM1* activity is not directly linked to the metabolism of 1-OHP, which is, in fact, mainly excreted as a glucoronide conjugate. Nevertheless, the authors (Alexandrie *et al.*, 2000; Apostoli *et al.*, 2003; Adonis *et al.*, 2003) who demonstrated an effect of

polymorphism on urinary 1-OHP levels explained the positive correlation observed between the null genotype and 1-OHP excretion by suggesting that a deficiency in *GSTM1* activity may increased glucuronidation pathway, as a result of accumulation of PAH derivatives that are not conjugated with glutathione and which may cause the induction of *CYP1A1* and increase the 1-OHP. Considering that the major routes of occupational and environmental exposure to PAHs are inhalation and cutaneous absorption and that extra hepatic CYP1A1 is primarily expressed in the lung, it can be suggested that people working in polluted places, such as sugarcane fields that were burnt, are exposed to high levels of inhalable particle matter and PAHs and might represent at high risk population to develop long term effects such as lung cancer. This effect might be regulated by individual differences in the efficiency to metabolize PAHs such as BaP or pyrene (Adonis *et al.*, 2003).

Multivariate regression analysis showed that the *CYP1A1*2A* and *GSTP1* polymorphisms significantly influenced the excretion of 1-OHP levels in control groups. This may be explained by the higher exposure of the sugarcane workers to PAHs since the effect of the polymorphisms in the 1-OHP excretion is better observed under lower dosage exposure. This observation agrees with the results of Adonis *et al.* (2003) among those smokers individuals exposed to diesel exhaust the *CYP1A1*2A* allele showed a non-significantly higher 1-OHP level than the *CYP1A1*1A* allele. On the other hand, in the non-exposed group a significantly higher 1-OHP level was observed for the *CYP1A1*2A* allele. In this manner, the sample size prevents any ultimate conclusion concerning the role of genotypes and larger and conclusive studies are needed to confirm this date.

The mutagenicity and excretion of 1-OHP in workers urine has shown a high degree of interindividual variability (Einistö *et al.*, 1990; Cerná *et al.*, 1997; Alexandrie *et al.*, 2000), and may be explained by genetic, environmental and/or lifestyle factors. Metabolic activation and detoxification processes have been shown crucial for individual susceptibility to the exposure of genotoxic carcinogens and influence the excretion of mutagens in urine. For example, glutathione S-transferases (GSTs) are important for detoxifying number of mutagenic compounds, including metabolites of PAHs. Increased urinary mutagenicity was encountered in smokers with the *GSTM1* null genotype (Hirvonen *et al.*, 1994) and in individuals exposed to environmental pollutants (Binková *et al.*, 1996), presumably caused by lower levels of detoxification in these individuals. Nevertheless, it was not detected a relationship between



mutagenicity and *GST* genotypes in the individuals with mutagenic urine analyzed in this study.

Although some PAHs that are human carcinogens have been found in the sugarcane soot (Zamperlini *et al.*, 1997), there are no data about cancer incidence among sugarcane workers. As far we are concerned, this is the first report that evaluated internal exposure comparing the harvesting (when the sugarcane fields are burnt) and non-harvesting periods among sugarcane workers in relation to polymorphisms of xenobiotic-metabolising enzymes. Our study showed that the sugarcane workers during the harvest period received an intense exposure to genotoxic and mutagenic compounds. The present study indicates that sugarcane workers are significantly more exposed to PAH and genotoxic compounds during the harvesting time than the non-harvesting and the control groups, although the differences between the levels of 1-OHP was not significant in the exposed bearing *CYP1A1*2A*, **2B*, **4* and *GSTP1*. These findings indicate a potential risk for this workers associated with respiratory diseases and or lung cancer. Accordingly, prevention strategies, such as the use of respiratory protection, are needed to reduce the toxic compounds inhalation and absorption from burnt sugarcane fields.

Acknowledgements

This work was supported by (FAPESP) (Grants no. 00/08391-9) and CNPq.

References

- Abdel-Rahman, S.Z. et al. Molecular interaction of (2,3-¹⁴C) acrylonitrile with DNA in gastric tissue of rat. *J. Biochem. Toxicol.*, v. 9, p. 191-8, 1994.
- Adonis, M. et al. Susceptibility and exposure biomarkers in people exposed to PAHs from diesel exhaust. *Toxicol lett.*, v.144, p.3-15, 2003.
- Alexandrie, A.K. et al. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms affect urinary 1-hydroxypyrene levels after PAH exposure. *Carcinogenesis*, v.21, p. 669-76, 2000.
- Amorim L. M. F. et al. Análisis of CYP1A1 exon 7 polymorphisms by PCR-SSCP in a Brazilian population and description of two novel gene variations. *Mutat. Res.*, v. 547, p.35-40, 2004.
- Apostoli, P. et al. Influence of genetic polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 on the urinary levels of 1-hydroxypyrene. *Toxicol lett.*, v.144, p.27-34, 2003.
- Bassam, B. J. et al. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.*, v. 196, p. 80-83, 1991.



Binková, B. et al. Biomarker studies in Northern Bohemia. *Environ Health Perspec*, v.104, p.591-97, 1996.

Bos R. P, et al. Mutagens in urine of non-smoking and smoking workers in an aircraft tire retreading plant. Skin exposure as a casual factor? *Mutat Res.*, v. 223, p. 41-8. 1989.

Cerná, M. et al. The use of a urine mutagenicity assay in the monitoring of environmental exposure to genotoxins. *Mutat. Res.*, v.391, p.99-101, 1997.

Clonfero, E. et al. Urinary excretion of mutagens in coke oven workers. *Carcinogenesis*, v.16, p.547-54, 1995.

DeMarini D. M., Urinary mutagenicity as a biomarker in workers exposed to benzidine: correlation with urinary metabolites and urothelial DNA adducts. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 981-88, 1997.

Einistö P, Nohmi T, Watanabe M, Ishidate JrM.. Sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1024 to urine mutagenicity caused by cigarette smoking. *Mutat. Res.*, v. 245, p. 87-92, 1990.

Esteller, M. et al. Germ line polymorphisms in cytochrome-P450 1A1 (C4887) CYP1A1) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 2307-2311, 1997.

Falck K. et al. Mutagenicity in urine of workers in rubber industry. *Mutat Res* v. 79, p.45-52, 1980.

Gaspar, P. et al. *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and TP3 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics Mol. Biology*. v. 27, p. 133-138, 2004.

Grzybowska, E. et al. The effect of the genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTM1* and *GSTP1* on aromatic DNA adduct levels in the population of healthy women. *Mutat. Res.*, v. 469, p. 271-277, 2000.

Hagiwara, M. et al. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutat. Res.*, v.291, p.171-180, 1993.

Hall, M., Grover, P. L. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons:Metabolism, Activation and Tumor Initiation. Cooper, C. S., Grover, P. L. (ed). Handbook of Experimental Pharmacology: chemical carcinogenesis. Verlag, 1990 p. 327-372.

Hansen. A. M. et al. Urinary 1-hydroxypyrene and mutagenicity in bus drivers and mail carriers exposed to urban air pollution in Denmark. *Mutat. Res.*, v. 557, p.7-17, 2004.

Harries, L.W. et al. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 641-4, 1997.

- Hemminki, K. et al. Aromatic DNA adducts in foundry workers in relation to exposure, life style and CYP1A1 and glutathione transferase M1 genotype. *Carcinogenesis*, v.18, p. 345-50, 1997.
- Hirvonen, A. et al. Modulation of mutagenicity by genetically determined carcinogen metabolism in smokers. *Carcinogenesis*, v.15, p.813-15, 1994.
- Jacob, J., Seidel, A. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* v. 778, p. 31-47, 2002.
- Jongeneelen, F. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Science Total Environ.* v.199, p.141-149, 1987.
- Kado, N.Y. et al. A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay. *Mutat Res.*, v.121, p.25-32, 1983.
- Kato, M. et al. Urinary biomarkers in charcoal workers exposed to wood smoke in Bahia State, Brazil. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* v.13, p. 1005-1012, 2004.
- Kawajiri, K. et al. Association of CYP1A1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung cancer. *Cancer Res.*, v. 56, p. 72-6, 1996.
- Kuenemann-Migeot, C. et al. Use of *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 and YG1021 and deconjugating enzymes for evaluating the mutagenicity from smokers' urine. *Mutat. Res.*, v. 390, p.283-91, 1997.
- Lu, P. -L. et al. Urinary 1-hydroxypyrene levels in workers exposed to coke oven emissions at various locations in a coke oven plant. *Arch., Environ. Health.* v. 57, p. 255-261, 2002.
- Maron, D. M., Ames, B. N. Revised methods the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, v.113, p.173-245, 1983.
- Miller, D.P. et al. Smoking and the risk of Lung Cancer: Susceptibility with GSTP1 Polymorphisms. *Epidemiology*, v.14, p.545 -551, 2003.
- Mohr, L.C. et al. Glutathione S-Transferase M1 polymorphism and risk of lung cancer. *Anticancer Res.*, v.23, p. 2111 -2124, 2003.
- Nan, H.-M. et al. Effects of occupation, lifestyle and genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 on urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol concentrations. *Carcinogenesis*, v.22, p. 787-793, 2001.
- Nerukar, P.V et al. CYP1A1, GSTM21 and GSTP1 genetic polymorphisms and urinary 1-hydroxypyrene excretion in non-occupationally exposed individuals. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* v.9, p. 1119-1122, 2000.
- Pan, G. et al. A study of multiple biomarkers in coke oven workers- a cross-sectional study in China. *Carcinogenesis*, v.19, p.1963-1968, 1998.
- Pemble, S. et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.* v. 300, p. 271-276, 1994.

- Pinarbasi, H. et al. Strong association between the GSTM1-null genotype and lung cancer in a Turkish population. *Cancer Genet. Cytogenet.* v.146, p.125-129, 2003.
- Schwarz, D. et al. Differential metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis*, v.22, p.453-459, 2001.
- Seidgard, J. et al. Hereditary differences in the expression of the human glutathione S-transferase activity on trans-stilbene oxide are due to a gene detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* . v. 85, p. 7293-7297, 1988.
- Sorensen, M. et al. Glutathione S-transferase T1 null-genotype is associated with an increased risk of lung cancer. *Int. J. Cancer*, v.110, p.219-224, 2004.
- Sreelekha, T.T. et al. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol.*, v.37, p. 593-598, 2001.
- Taningher M. et al. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat Res*, v. 436, p. 227-61, 1999.
- Vargas, V. M. F. Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environmental and human health. *Mutat. Res.*, v.544, p.313-319, 2003.
- Watanabe, M. et al. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutat. Res.*, v.234, p.337-48, 1990.
- Yamasaki E, Ames B. N. Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc. Natl Acad Sci* v. 74, p. 3555-3559, 1977.
- Zamperlini, G.C.M. et al. Identification of polycyclic hidrocarbons in sugarcane soot by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, v. 46, p. 655-663, 1997.
- Zeiger, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or faulty test ? *Mutat. Res.*, v.492, p.29-38, 2001.



Table 1. Characterization of sugar cane workers according to age, gender and period of exposition to the burning of sugar cane.

Code	Age (years)	Gender	Skin Color	Period of Exposition
1	30	M	W	10 y
2	25	M	W	11 y
3	55	F	W	20 y
4	41	F	W	20 y
5	43	F	W	8 y
6	24	F	Mu	10 y
7	22	M	Mu	2 y
8	39	F	W	3 y
9	20	M	W	2 y
10	33	M	B	12 y
11	45	M	W	30 y
12	41	F	W	8 y
13	44	F	B	15 y
14	26	F	W	4 y
15	44	F	Mu	24 y
16	41	M	W	15 y
17	36	F	B	16 y
18	29	F	Mu	8 y
19	36	F	Mu	12 y
20	51	F	W	8 y
21	45	F	B	18 y
22	32	F	W	10 y
23	30	F	W	13 y
24	20	M	B	5 m
25	37	M	W	12 y
26	45	F	W	14 y
27	37	M	Mu	7 y
28	20	M	Mu	2 y
29	44	F	W	20 y
30	34	M	W	10 y
31	21	M	Mu	2 y
32	67	M	B	20 y
33	22	M	W	5 m
34	34	M	W	12 y
35	26	M	B	6 y
36	33	M	B	4 y
37	29	F	W	18 y
38	25	M	B	8 y
39	23	M	B	4 y
40	23	M	B	2 y
41	20	M	B	2 y
42	35	F	W	23 y

F= female; M= male; W= White; Mu= mulatto; B= black; y= years; m= months.

Table 2. Urinary levels of 1-OHP, mutagenicity in urine and metabolizing genotype in exposed sugar cane workers.

Code	1-OHP	Urinary Mutagenic Activity ^a						Metabolizing Genotype								
		TA98		YG1041		YG1024		CYP1A1			GST					
		E1	E2	E1	E2	E1	E2	*2A	*2B	*4	M1	T1	P1			
1	0.955	-	nd	nd	tox	-	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*4	+/+	+/+	I/V			
2	0.386	-	nd	im (15)	tox	+	(5)	+	(8)	*1/*2A	*1/*2B	*1/*1	0/0	+/+	I/V	
3	0.367	tox	nd	tox	-	+	(11)	+	(10)	*1/*1	*1/*1	*1/*1	+/+	+/+	I/V	
4	0.410	im (2)	nd	im (20)	tox	+	(18)	+	(4)	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0/0	+/+	I/V	
5	0.755	-	nd	-	nd	-	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0/0	+/+	+/+	I/V		
6	0.287	tox	tox	tox	nd	-	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0/0	+/+	+/+	I/V		
7	0.519	+	(110)	+	(100)	tox	tox	+	(90)	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	+/+	+/+	I/V
8	0.493	+	(29)	+	(35)	tox	tox	+	(12)	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	+/+	+/+	I/I
9	1.265	-	nd	-	nd	-	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*4	+/+	+/+	I/I			
10	0.868	tox	tox	tox	tox	tox	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0/0	+/+	V/V			
11	0.519	tox	nd	tox	nd	nd	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*1	+/+	+/+	I/V			
12	1.363	tox	nd	+	(52)	nd	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*1	0/0	+/+	I/V			
13	0.502	tox	nd	tox	nd	nd	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*1	+/+	0/0	I/I			
14	0.070	-	nd	tox	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	+/+	0/0	I/I			
15	0.357	tox	nd	-	nd	nd	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*1	+/+	0/0	I/I			
16	0.473	tox	nd	tox	nd	nd	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*1	+/+	0/0	V/V			
17	0.204	-	nd	tox	nd	nd	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*1	+/+	0/0	I/V			
18	0.205	tox	nd	tox	nd	nd	nd	*1/*2A	*1/*1	*1/*1	+/+	+/+	I/I			
19	2.716	tox	nd	tox	nd	nd	nd	*1/*2A	*1/*1	*1/*1	0/0	+/+	I/I			
20	0.118	-	nd	tox	nd	nd	nd	*2A/*2A	*1/*1	*1/*1	+/+	+/+	V/V			
21	0.026	-	nd	-	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0/0	+/+	I/I			
22	0.106	-	nd	-	nd	nd	nd	*2A/*2A	*1/*2B	*1/*1	+/+	+/+	I/I			
23	0.229	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*4	+/+	+/+	I/I			
24	0.337	-	nd	-	nd	nd	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*1	+/+	+/+	I/I			
25	0.109	-	nd	tox	nd	nd	nd	*2A/*2A	*2B/*2	*1/*1	0/0	0/0	I/V			
26	0.109	-	nd	nd	im (39)	nd	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*1	+/+	+/+	I/V			
27	2.039	im (8)	nd	nd	-	nd	nd	*1/*2A	*1/*1	*1/*1	+/+	+/+	V/V			
28	0.125	tox	tox	nd	tox	nd	nd	*1/*2A	*1/*1	*1/*1	+/+	+/+	I/V			
30	nd	tox	nd	nd	tox	nd	nd	*2A/*2A	*2B/*2	*1/*1	+/+	+/+	I/V			
31	nd	-	nd	nd	tox	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0/0	+/+	I/V			
32	0.303	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0/0	+/+	I/V			
33	0.072	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0/0	+/+	V/V			
34	0.098	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0/0	+/+	I/I			
35	0.242	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	+/+	+/+	I/I			
36	0.061	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0/0	+/+	I/V			
37	0.114	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	+/+	+/+	I/V			
38	0.408	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*1/*2A	*1/*1	*1/*1	+/+	+/+	V/V			
39	0.222	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*1/*2A	*1/*1	*1/*1	+/+	+/+	I/I			
40	0.580	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	+/+	0/0	I/V			
41	0.458	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0/0	0/0	I/V			
42	0.260	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*1	+/+	+/+	I/V			

^a S9 mediated; E: experiment; -: mutagenic activity absent; +: mutagenic activity present; im: trace of mutagenic activity; tox: toxic sample; (): mutagenic potencies in rev/mL-eq (results interpreted according to SBMCTA norms); nd: not determined.
*1/*1, I/I: wild-type allele; *1/*2A, *1/*2B,*1/*4, I/V: heterozygous; *2A/*2A, *2B/*2B, V/V: homozygous for mutant allele; +/+ : present gene; -/-: absent gene.



Table 3. Urinary levels of 1-OHP, mutagenicity in urine and metabolic genotype in non-exposed sugar cane workers.

Code	1-OHP	Urinary Mutagenic Activity ^a				Metabolizing Genotype					
		TA98		YG1041		CYP1A1			GST		
		E1	E2	E1	E2	*2A	*2B	*4	M1	T1	P1
2	0.030	-	nd	-	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*	0/0	+/+	I/V
3	0.003	-	nd	-	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	+/+	+/+	I/V
4	0.004	-	nd	-	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	0/0	+/+	I/V
6	0.114	+ (30)	+ (6)	+ (88)	tox	*1/*1	*1/*1	*1/*	0/0	+/+	I/V
7	0.049	-	nd	tox	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	+/+	+/+	I/V
8	0.103	-	nd	tox	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	+/+	+/+	I/I
9	0.007	-	nd	-	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	+/+	+/+	I/I
10	0.029	-	nd	im (19)	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	0/0	+/+	V/V
11	0.003	-	nd	-	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*	+/+	+/+	I/V
12	0.032	-	nd	-	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*	0/0	+/+	I/V
13	0.013	-	nd	tox	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*	+/+	0/0	I/I
14	0.029	-	nd	tox	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	+/+	0/0	I/I
15	0.005	-	nd	nd	-	*1/*2A	*1/*2B	*1/*	+/+	0/0	I/I
16	0.034	-	nd	nd	im (5)	*1/*2A	*1/*2B	*1/*	+/+	0/0	V/V
17	0.027	tox	nd	tox	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*	+/+	0/0	I/V
18	0.002	-	nd	nd	tox	*1/*2A	*1/*1	*1/*	+/+	+/+	I/I
19	0.049	-	nd	tox	nd	*1/*2A	*1/*1	*1/*	0/0	+/+	I/I
20	0.027	-	nd	tox	nd	*2A/*2A	*1/*1	*1/*	+/+	+/+	V/V
21	0.042	-	nd	-	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	0/0	+/+	I/I
22	0.011	-	nd	-	nd	*2A/*2A	*1/*2B	*1/*	+/+	+/+	I/I
23	0.088	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	+/+	+/+	I/I
25	0.005	tox	nd	tox	nd	*2A/*2A	*2B/*2	*1/*	0/0	0/0	I/V
26	0.174	-	nd	tox	nd	*1/*2A	*1/*2B	*1/*	+/+	+/+	I/V
27	0.030	-	nd	-	nd	*1/*2A	*1/*1	*1/*	+/+	+/+	V/V
29	0.056	nd	nd	nd	nd	*1/*2A	*1/*1	*1/*	I/I	0/0	I/I
30	0.046	tox	nd	tox	nd	*2A/*2A	*2B/*2	*1/*	+/+	+/+	I/V
31	0.119	-	nd	nd	tox	*1/*1	*1/*1	*1/*	0/0	+/+	I/V
32	0.045	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	0/0	+/+	I/V
33	0.378	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	0/0	+/+	V/V
34	0.021	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	0/0	+/+	I/I
37	0.125	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	+/+	+/+	I/V
38	0.354	nd	nd	nd	nd	*1/*2A	*1/*1	*1/*	+/+	+/+	V/V
40	2.153	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	+/+	0/0	I/V
41	0.203	nd	nd	nd	nd	*1/*1	*1/*1	*1/*	0/0	0/0	I/V

S9 mediated; E: experiment; -: mutagenic activity absent; +: mutagenic activity present; im: trace of mutagenic activity; tox: toxic sample; (): mutagenic potencies in rev/mL-eq (results interpreted according to SBMCTA norms); nd: not determined.
*1/*1, I/I: wild-type allele; *1/*2A, *1/*2B, *1/*4, I/V, heterozygous; *2A/*2A, *2B/*2B, V/V, homozygous for mutant allele; +/+: present gene; -/-: absent gene.

Table 4. Results of microsuspension assays with the strains TA98, YG1041 and YG1024 in urine of exposed and non-exposed sugar cane workers.

Group	Urinary Activity ^a	Total Numbers					
		TA98		YG1041		YG1024	
		E1	E2	E1	E2	E1	E2
Exposed	toxic	12	3	14	9	1	null
	mutagenic	2	2	1	null	5	3
	trace of mutagenicity	2	null	2	1	null	null
Non-Exposed	toxic	3	null	10	3	nd	nd
	mutagenic	1	1	1	null	nd	nd
	trace of mutagenicity	null	null	1	1	nd	nd

^a interpreted according to SBMCTA norms; nd: not determined.

Table 5. Geometric means of urinary 1-OHP levels ($\mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine) in all subjects and in relation to age and gender.

Groups	Exposed		Non-exposed		Controls		P-value ^a	P-value ^b	P-value ^c
	N	Geometric Mean	N	Geometric Mean	N	Geometric Mean			
All subjects	39	0.318	34	0.035	21	0.041	0.0000	0.0000	0.6957
Age 19-25	11	0.331	9	0.126		nd	0.1965	nd	nd
Age 26-67	28	0.313	25	0.022		nd	0.0000	nd	nd
P-value ^d		0.8782		0.0025		nd			
Men	20	0.337	16	0.050	11	0.034	0.0022	0.0000	0.4868
Women	19	0.299	18	0.026	10	0.051	0.0000	0.0001	0.1704
P-value ^d		0.7186		0.2286		0.258			

^a P-value calculated between exposed and non-exposed.^b P-value calculated between exposed workers and controls.^c P-value calculated between non-exposed workers and controls.^d P-value calculated between two groups of the lines above.

nd, not determined.

Table 6. Geometric means of urinary 1-OHP levels ($\mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine) in different genotypes.

Groups	Exposed		Non-exposed		Controls		P-value ^a	P-value ^b	P-value ^c
	N	Mean	N	Mean	N	Mean			
<i>CYP1A1 MspI</i>									
*1A/*1A	20	0.267	17	0.055	11	0.030	0.0079	0.0000	0.2591
*1A/*2A or *2A/*2A	19	0.382	17	0.023	10	0.058	0.0000	0.0000	0.0560
P-value ^d		0.2851		0.0989		0.0565			
<i>CYP1A1 Ile/Val</i>									
*1B/*1B	27	0.296	23	0.048	17	0.035	0.0005	0.0000	0.4423
*1B/*2B or *2B/*2B	12	0.374	11	0.018	4	0.081	0.0000	0.0039	0.0325
P-value ^d		0.5181		0.0857		0.0588			
<i>CYP1A1 Thr/Asp</i>									
*1/*1	36	0.300	32	0.036	18	0.044	0.0000	0.0000	0.6071
*1/*4	3	0.652	2	0.025	3	0.025	0.3841	0.0053	0.9953
P-value ^d		0.2134		0.7454		0.2570			
<i>GSTT1</i>									
Present (+/+)	31	0.330	25	0.034	21	0.041	0.0000	0.0000	0.6130
Null (-/-)	8	0.277	9	0.039	0	-	0.0168	nd	nd
P-value ^d		0.6785		0.8219					
<i>GSTM1</i>									
Present (+/+)	26	0.340	22	0.032	14	0.034	0.0000	0.0000	0.9016
Null (-/-)	13	0.279	12	0.041	7	0.057	0.0066	0.0121	0.5728
P-value ^d		0.5784		0.6649		0.1779			
<i>GSTP1</i>									
Ile/Ile	14	0.255	12	0.021	10	0.061	0.0009	0.0021	0.0212
Ile/Val or Val/Val	25	0.360	22	0.047	11	0.028	0.0001	0.0000	0.3444
P-value ^d		0.3204		0.1413		0.0278			

^a P-value calculated between harvest workers and non-harvest workers.^b P-value calculated between harvest workers and controls.^c P-value calculated between non-harvest workers and controls.^d P-value calculated between two groups of the lines above.

nd, not determined.

Table 7. Multivariate regression analysis followed by stepwise procedure ($P = 0.25$).

Group	Independent variable	β^a	β SE	P-value
Exposed	genotype			
	<i>CYP1A1</i> *2A	0.550	0.331	0.105
	<i>CYP1A1</i> *4	1.228	0.632	0.060
	<i>GSTP1</i>	0.483	0.337	0.160
Non-Exposed	Age	-1.734	0.527	0.002
Control				
	<i>CYP1A1</i> *2A	0.621	0.289	0.046
	<i>GSTP1</i>	-0.716	0.289	0.024

^a Regression coefficient.

IV. DISCUSSÃO

IV. DISCUSSÃO

Muitos agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos conhecidos são detectados na atmosfera e os riscos de cada um deles são de difícil determinação, devido à grande variedade e complexidade de interações que podem ocorrer (DEMARINI *et al.*, 1994; FARMER *et al.*, 2003),

As partículas de diâmetro menor que 10 μm , por exemplo, residem por longo tempo na atmosfera e são facilmente inaladas pelo homem (CHRISP & FISHER, 1980; LEWTAS *et al.*, 1997). Tais partículas são, em geral, eficientemente depositadas nos alvéolos pulmonares e lentamente removidas dessa região não ciliada do trato respiratório, expondo o organismo aos compostos mutagênicos por um período significativo. Por outro lado, o risco potencial de absorção das partículas maiores do que 10 μm não deve ser completamente desprezado, pois seus componentes podem ser solubilizados, absorvidos pelo intestino até a circulação sistêmica e apresentar riscos para outros tecidos, além dos pulmões (CHRISP & FISHER, 1980).

A exposição a altos níveis de partículas por longos períodos aumenta o risco de câncer, doenças respiratórias e arteroscleroses, enquanto que, picos de exposição a períodos curtos causam exacerbação de bronquite, asma e outras doenças respiratórias, bem como, alterações do ritmo cardíaco. O mecanismo exato de como as partículas exercem seus efeitos tóxicos em nível celular não está completamente entendido e várias hipóteses têm sido sugeridas (SØRENSEN *et al.*, 2003).

Além da atmosfera nas grandes cidades e nas indústrias, que contêm altos níveis de poluentes, algumas áreas rurais têm revelado a presença desses compostos. A prática da queima da palha de cana-de-açúcar, para facilitar a operação de corte manual dos colmos, acarreta problemas de poluição do ar em razão da grande emissão de fumaça e fuligem que, dependendo das condições atmosféricas, atingem os centros urbanos, trazendo transtornos às populações das cidades das regiões canavieiras, assim como para os próprios cortadores de cana.

Devido à exposição diária dos cortadores de cana aos compostos da fuligem, pode-se sugerir que eles constituem população de risco para o desenvolvimento de doenças. Tal sugestão encontra suporte em um levantamento efetuado pela Fundação Oncocentro de uma incidência aumentada de tumores malignos nas regiões canavieiras. Do mesmo modo, há registros de aumento na incidência de doenças respiratórias, por ocasião da queima de canaviais (ZAMPERLINI *et al.*, 1997). Sabe-se, que a intensa exposição à poluição do ar aumenta o risco de doenças respiratórias, câncer de pulmão e outros cânceres relacionados (SANDFORD & SILVERMAN, 2002; SØRENSEN *et al.*, 2003), sendo a intensidade do efeito proporcional à concentração de poluentes e duração da exposição. Contudo, somente nos anos mais recentes, essa teoria foi ampliada e aprendeu-se que o processo da exposição ao aparecimento da doença é modulado por fatores genéticos (TANINGHER *et al.*, 1999). Com o objetivo de averiguar os efeitos dos poluentes e os riscos para a saúde humana, inúmeros ensaios têm sido conduzidos. Watanabe *et al.* (1997), por exemplo, testaram a ação mutagênica de muitos nitro-PAHs presentes no ar e observaram a indução de transversões C-G → A-T em linhagens de *Salmonella typhimurium*. Essa mutação é a substituição de base mais freqüente no gene supressor de tumor *TP53* em câncer de pulmão.

Em nosso entendimento, o presente estudo parece ser o primeiro em que a influência dos genótipos *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* e *CYP1A1* foi avaliada, tanto para a atividade mutagênica da urina, quanto para os níveis de 1-OHP urinário em cortadores de cana queimada, portanto, expostos aos HAPs, excluindo-se o hábito tabagista como fator de viés.

Na tentativa de aumentar a probabilidade de detecção do efeito da exposição aos compostos genotóxicos liberados na queima da plantação da cana, a linhagem TA98, um indicador padrão de mutagenicidade, que causa mudança na matriz de leitura para compostos mutagênicos urinários (PASQUINI *et al.*, 1990), foi complementada com suas derivadas, as linhagens YG1041, supostamente mais sensível em detectar compostos mutagênicos na urina, uma vez que superproduz nitrorredutase e O-acetiltransferase (Cerná *et al.*, 1997) e YG1024 que superproduz O-acetiltransferase (WATANABE *et al.*, 1990). Além da linhagem, a sensibilidade do teste, visando os objetivos propostos neste estudo, também foi aumentada usando-se o ensaio de microsusensão (KADO *et al.*, 1983). Vários ensaios realizados com amostras de urina de trabalhadores

ocupacionalmente expostos aos HAPs, utilizando a TA98, mostraram resultados negativos, observando-se o contrário, apenas em trabalhadores fumantes (RECIO *et al.* 1984; VENIER *et al.*, 1985, CLONFERO *et al.*; 1995). Também tem sido observado, pelo teste de mutagenicidade, que a urina de indivíduos ocupacionalmente expostos a PAHs e demais compostos originados da combustão mostra-se mais mutagênica do que aquela de indivíduos controle (MIELZYNSKA *et al.*, 1997; YIN, *et al.*, 1998; ALEXANDRIE, *et al.*, 2001). O mesmo foi demonstrado para indivíduos fumantes (SMITH *et al.*, 1995; KUENEMANN-MIGEOT *et al.*, 1996; KUENEMANN-MIGEOT *et al.*, 1997; MURE *et al.*, 1997). No presente estudo, a grande maioria das amostras foi tóxica quando testada em altas doses, no entanto, tal resultado também foi observado por outros grupos e justificado pela presença de componentes citotóxicos na urina (CLONFERO *et al.*, 1995; GABBANI *et al.*, 1999; KATO *et al.*, 2004).

O nível urinário do metabólito 1-OHP tem sido utilizado como um biomarcador de exposição interna a PAHs pela alta sensibilidade do método analítico e por levar em consideração todas as rotas de exposição. Em ambientes ocupacionais, o conteúdo de 1-OHP urinário pode estar aumentado cerca de 10 a 100 vezes (ALEXANDRIE *et al.*, 2001). Nos cortadores de cana-de-açúcar amostrados no período da safra, o nível médio de 1-OHP log transformados foi de $0,318 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinina, variando de 0,03 a $2,72 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinina, no período da safra. A concentração média dos níveis de 1-OHP em motoristas de ônibus e carteiros que trabalhavam no centro de Copenhague, Dinamarca foi de 0,19 e $0,11 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinina, respectivamente e variou de 0,05 a 1,60 em motoristas e 0,02 a $0,75 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinina em carteiros (HANSEN *et al.*, 2004). A concentração de 1-OHP em urina de indivíduos expostos a exaustão de diesel variou de não detectada a $9,24 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinina em não fumantes amostrados em Santiago do Chile. Já, em uma população rural não fumante tais níveis variaram de 0,23 a $3,7 \mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinina (ADONIS *et al.*, 2003).

Existe pouca informação sobre as frequências dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* e *CYP1A1* na população brasileira. Tais polimorfismos são responsáveis pelas diferenças interindividuais na capacidade de ativar e/ou inativar xenobióticos que estão relacionados com o início de câncer (AUTRUP, 2000). Vários estudos têm demonstrado associação entre esses polimorfismos e muitos tipos de cânceres, tais como bexiga, oral, pulmões e cabeça e pescoço (CONFORTI-FROES *et al.*, 1997; SREELEKHA *et al.*, 2001;

SONG *et al.*, 2001; JEONG *et al.*, 2003; PINARBASI, *et al.*, 2003; MOHR *et al.*, 2004; SORENSEN *et al.*, 2004). O Brasil apresenta uma das populações mais heterogêneas dado o alto grau de mistura entre grupos étnicos. A população brasileira é composta por descendentes de ameríndios, portugueses, italianos e africanos com menor número de imigrantes da Espanha, Alemanha, Síria, Líbano e Japão (CARVALHO-SILVA *et al.*, 2001; PARRA *et al.*, 2003). Desse modo, somos uma população única em relação às frequências dos polimorfismos em genes que codificam enzimas que metabolizam carcinógenos e drogas terapêuticas. Portanto, o conhecimento das frequências alélicas desses genes em grupos brasileiros é de grande aplicação na prevenção de efeitos adversos a saúde. Dentre os indivíduos analisados neste estudo, 34,3 % e 20,2 apresentavam os genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulos, respectivamente. A frequência alélica para o polimorfismo *GSTP1* foi de 38 %. As frequências alélicas para os polimorfismos *CYP1A1**2A e *2B foram de 23 % e 14 %, respectivamente. Em relação ao polimorfismo *CYP1A1**4 apenas seis indivíduos apresentaram a variante no estado heterozigoto.

A atividade das GSTs é um importante caminho de destoxificação para uma ampla classe de mutagênicos, tais como os metabólitos de HAPs; desse modo, a exposição a esses compostos induz a atividade do produto do gene *GSTM1*. Alguns estudos avaliaram a influência dos polimorfismos genéticos na atividade mutagênica da urina em indivíduos ocupacional ou ambientalmente expostos à compostos genotóxicos. Os trabalhadores de fornos de coqueria com ausência do genótipo *GSTM1* apresentaram uma maior mutagenicidade urinária, quando comparados aos que tinham o gene (GABBANI *et al.*, 1996). O trabalho de Binková *et al.* (1996), por exemplo, demonstrou a influência do genótipo *GSTM1* nulo na mutagenicidade da urina em mulheres que moravam em uma área altamente poluída na Polônia. Outros dados corroboram a importância do gene *GSTM1* no metabolismo de compostos PAHs. A exposição terapêutica de pacientes não fumantes, portadores de psoríase, tratados topicamente com ungüento contendo 2% de alcatrão de carvão, confirma isso, uma vez que os valores da mutagenicidade urinária nos indivíduos com genótipo nulo foram, em média, o dobro daqueles portadores do genótipo favorável (GABBANI *et al.*, 1999). Os dados do presente estudo mostraram não ser possível estabelecer associação entre os polimorfismos estudados e mutagenicidade urinária dos cortadores de cana devido a alta toxicidade da urina desses indivíduos. No

entanto, dos oito cortadores de cana queimada em que a urina foi mutagênica, ou apresentou traço de mutagenicidade, três tinham genótipos *GSTM1* nulo.

Os estudos de epidemiologia molecular sugerem que indivíduos com ausência do gene *GSTM1* têm um risco maior de desenvolver câncer de bexiga e de pulmão (BROCKMOLLER *et al.*, 1998) estômago e cólon (STRANGE *et al.*, 1991). No caso da exposição voluntária ou ocupacional que aumenta a atividade mutagênica da urina, o efeito da modulação e proteção pelo genótipo *GSTM1* é dobrado. Além disso, para um menor número de compostos mutagênicos eletrofílicos atacar a bexiga, existe a maior capacidade de destoxificação do urotélio, em indivíduos com o genótipo *GSTM1* positivo (GABBANI *et al.*, 1996).

O envolvimento do gene *GSTT1* no metabolismo dos HAPs ainda não está claro (VIEZZER *et al.*, 1999). Tal genótipo parece estar mais envolvido com a destoxificação de hidrocarbonetos menores, como óxido de etileno e diepóxibutano (LEE *et al.*, 2002). Entre os oito cortadores de cana que a urina amostrada no período da safra foi mutagênica ou apresentou traço de mutagenicidade apresentavam o genótipos *GSTT1*+/. Já em relação ao genótipo *GSTP1*, um indivíduo era homozigoto mutante e seis deles eram heterozigotos.

Com relação à participação dos polimorfismos do gene *CYP1A1* já foi demonstrado um aumento na atividade enzimática em indivíduos com o genótipo variante do gene *CYP1A1**2A (CROFTS *et al.*, 1994). Além disso, foi relatado, em câncer de pulmão, que o polimorfismo *CYP1A1**2A está associado a níveis de adutos de DNA-HAPs (HEMMINKI *et al.*, 1997) e com maior frequência de mutações no gene *p53* (KAWAJIRI *et al.*, 1996), sugerindo que os metabólitos reativos de carcinógenos são produzidos em maior quantidade em indivíduos com o alelo variante (TANIMOTO *et al.*, 1999). O genótipo homozigoto mutante *CYP1A1**2A /*2A está associado como fator de risco para o carcinoma da célula escamosa e, em menor extensão ao adenocarcinoma em populações japonesas (TANINGHER *et al.*, 1999), fato confirmado em populações brasileiras (HAMADA *et al.*, 1995; SUGIMURA *et al.*, 1995). No presente estudo, observou-se que dos oito indivíduos com urina mutagênica ou com traços de mutagenicidade três deles eram heterozigotos para ambos os polimorfismos *CYP1A1**2A e *2B.

Vários estudos têm avaliado a influência dos polimorfismos genéticos nos níveis de 1-OHP urinário nas populações alvo. Em oposição às expectativas, Hemminki *et al.* (1997)



não encontraram influência dos genótipos *CYP1A1* ou *GSTM1* nos níveis de 1-OHP urinário. Merlo *et al.* (1998), avaliando policiais do tráfego de Gênova (Itália), não detectaram qualquer influência do genótipo *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* nos níveis de 1-OHP, embora a excreção tenha sido maior em alguns fumantes (≤ 15 cigarros/dia) com genótipo heterozigoto (*CYP1A1**1/*2A), comparados aos indivíduos com genótipo selvagem (*CYP1A1**1/*1). Pavanello *et al.* (1999), avaliando indivíduos expostos a HAPs, como trabalhadores de fornos de coqueria, de indústrias de alumínio e limpadores de chaminé, mostraram que dentro de cada grupo os valores médios de 1-OHP foram maiores em indivíduos *GSTM1* nulo em relação ao grupo *GSTM1* positivo, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Resultado semelhante também foi observado em nosso estudo, uma vez que os cortadores de cana com alelos variantes *CYP1A1**2A, *2B, *4 e *GSTP1* Ile/Val e Val/Val mostraram maiores níveis de 1-OHP urinários no período da safra, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa. Ao contrário dos estudos anteriores, Wu *et al.* (1998) demonstraram que trabalhadores de fornos de coqueria homozigotos para o genótipo *CYP1A1**2A/*2A mostraram diferença estatisticamente significativa para os níveis de 1-OHP urinário, em relação aos heterozigotos e homozigotos normais. Em relação aos nossos dados, foram unidos os indivíduos heterozigotos (*CYP1A1**1/*2A) e os homozigotos (*CYP1A1**2A/*2A), mas não houve diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos.

O polimorfismo *GSTP1* é esperado ser importante em determinados efeitos de exposição aos PAHs. Na verdade, ele tem sido associado com a inativação do principal metabólito reativo do benzo(a)pireno, isto é, o benzo(a)pireno diol epóxido e outros agentes tóxicos advindos da fumaça do cigarro. O estudo de Viezzer *et al.* (1999) em trabalhadores italianos de fornos de coqueria, não pode avaliar com propriedade a importância do polimorfismo *GSTP1*, devido ao pequeno número de indivíduos com o genótipo de risco. Nosso estudo não mostrou diferença significativa entre os cortadores de cana *GSTP1* Ile/Ile e aqueles com o alelo variante. A análise de regressão multivariada mostrou uma possível interação em relação aos níveis de excreção de 1-OHP urinários e os polimorfismos *CYP1A1**2A, *4 e *GSTP1* em cortadores de cana amostrados no período da safra. Quando analisados em combinação, os três genótipos mostraram uma redução do valor de P em relação ao valor obtido na análise com o test t, principalmente em relação ao genótipo *CYP1A1**4 ($P = 0,06$). Entretanto, mesmo com o ajuste não foi

possível mostrar uma contribuição significativa dos genótipos em relação a excreção de 1-OHP.

Nossos resultados sugerem que a população de cortadores de cana está exposta a complexas misturas de compostos químicos, principalmente aquelas ricas em PAHs. Ao mesmo tempo, revelam a real necessidade da combinação de biomarcadores, ou seja, associar o de exposição com o de suscetibilidade. Além disso, pôde-se notar que ao escolher o teste de Kado para a avaliação de mutagenicidade é importante o emprego de, pelo menos duas linhagens diferentes, uma vez que a sensibilidade dessas pode variar, dependendo do genótipo do indivíduo e do tipo de mistura poluentes de testada. Ainda quanto ao marcador de exposição de dose interna, a quantificação do 1-OHP em urina mostrou-se, com base no que foi observado, como um biomarcador eficiente e rápido.

Em relação a resposta diferencial dos indivíduos frente à exposição a compostos químicos é importante considerar a análise tanto de genes envolvidos nos passos de ativação, como no de destoxificação do metabolismo de xenobióticos, uma vez que a interação gene-ambiente é um dos principais focos no entendimento da etiopatogênese de doenças.

Muitos estudos têm demonstrado a importância dos polimorfismos fenotípicos no metabolismo dos compostos químicos como fatores de risco no desenvolvimento tanto do câncer quanto de outras doenças associadas à exposição aos poluentes químicos. Paralelamente a esses estudos, as bases genéticas de muitos dos polimorfismos foram elucidados e métodos não invasivos, como a genotipagem, foram desenvolvidos, com a vantagem de serem aplicados em grandes populações. A identificação de fatores genéticos que, agindo independentemente ou em conjunto com a exposição ambiental, aumenta o risco de toxicidade ou câncer, tem importante implicação na prevenção, diagnóstico precoce e intervenção com doenças humanas, pois uma vez identificados os grupos suscetíveis, esses podem ser persuadidos a evitar conhecidos fatores de risco. Políticas públicas de redução na emissão de gases resultantes de combustão automotiva (exigência legal de filtros catalíticos em veículos a diesel, gasolina e álcool), obrigatoriedade de filtros eletromagnéticos em chaminés industriais, equipamento de proteção para o trabalhador sujeito à exposição ocupacional podem significar uma importante redução na incidência do câncer e outras doenças na população e nos gastos com saúde pública.



Conclusões

- 1- A análise térmica deve ser levada em consideração em estudos de compatibilidade entre polímeros e polímeros, G377L, G377L, G377L e G377L, em particular, para avaliar a estabilidade térmica dos materiais quando submetidos a condições de uso.
- 2- Os dados de estabilidade térmica que se obtiveram em estudos de estabilidade térmica, em particular, para avaliar a estabilidade térmica dos materiais quando submetidos a condições de uso.
- 3- Os dados de estabilidade térmica que se obtiveram em estudos de estabilidade térmica, em particular, para avaliar a estabilidade térmica dos materiais quando submetidos a condições de uso.
- 4- Os dados de estabilidade térmica que se obtiveram em estudos de estabilidade térmica, em particular, para avaliar a estabilidade térmica dos materiais quando submetidos a condições de uso.
- 5- Os dados de estabilidade térmica que se obtiveram em estudos de estabilidade térmica, em particular, para avaliar a estabilidade térmica dos materiais quando submetidos a condições de uso.

V. CONCLUSÕES

Conclusões

- 1- A origem étnica deve ser levada em consideração em estudos de interação gene-ambiente envolvendo os polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* e *CYP1A1*. As frequências foram tanto similares quanto diferentes daquelas obtidas em outras populações brasileiras e de outros países.
- 2- Os ensaios de microsuspensão indicaram que os cortadores de cana-de-açúcar apresentam urina altamente tóxica no período da safra.
- 3- Em decorrência da alta toxicidade da urina dos cortadores de cana, os índices de mutagenicidade obtidos foram baixos, não sendo possível investigar a influência dos polimorfismos GSTs e CYP1A1 na atividade mutagênica da urina.
- 4- Os cortadores de cana-de-açúcar estão significativamente mais expostos durante o período da safra que na entressafra, assim como o grupo controle, uma vez que os níveis do metabólito urinário 1-OHP, excretados pelo grupo amostrado na safra foi estatisticamente significativo quando comparado com os níveis do grupo amostrado na entressafra e controles.
- 5- Não houve influência dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* e *CYP1A1* na excreção urinária de 1-OHP.

VI. REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, S. Z. et al. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.*, v. 107, p. 229-233, 1996.
- ABDEL-RAHMAN, S. Z. et al. GSTM1 and GSTT1 genes are potential risk modifiers for bladder cancer. *Cancer Detect Prev.*, v. 22, p. 129-138, 1998.
- Adonis, P. et al. Susceptibility and exposure biomarkers in people exposed to PAHs from diesel exhaust. *Toxicol Lett.*, v. 144, p.3-15, 2003.
- ALDO-MERIE, A. E. et al. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms affect urinary 1-hydroxypyrene levels after PAH exposure. *Chemosphere*, v. 21, p. 659-676, 2000.
- AMORIM, L. M. F. et al. Analysis of CYP1A1 exon 3 polymorphisms by PCR-SSCP in a Brazilian population and description of two novel gene variations. *Mutat. Res.*, v. 547, p. 35-40, 2004.
- ANKER, B. K. et al. Case-Control study of lung cancer among sugar cane farmers in India. *Chin. Environ. Med.*, v. 95, p. 548-552, 1994.
- ANDRE, V. et al. Overloading of mutagenicity with the Ames test: improvement of the extraction/enrichment method. *Mutat. Res.*, v. 520, p. 199-205, 2002.
- AUTPUP, H. et al. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat. Res.*, v. 464, p. 65-76, 2001.
- AYNACIOGLU, A. S. et al. high frequency of CYP1A1 mutations in a arid population. *Arch. Toxicol.*, v. 72, p. 215-218, 1998.
- BABA, J. P. A. et al. Genomics and proteomics in cancer. *Eur. J. Cancer*, v. 39, p. 1199-1215, 2003.
- BALMAIN, A. et al. The genetics and genomics of cancer. *Nat. Genet.*, v. 31, p. 238-244, 2003.

VI. REFERÊNCIAS

- BART, J. et al. Genetic polymorphisms in cancer etiology and prevention: a summary and challenges. *Int J Cancer*, v. 70, p. 1-10, 1997.
- BILL, D. A. et al. Genetic mapping of human polymorphic cancer susceptibility genes by polymerase chain reaction: application to glutathione transferase. *J. Environ. Health Perspect.*, v. 90, p. 111-117, 1992.
- BIRNBAUM, B. et al. Bonaparte studies in Northern Canada. *Environ. Health Perspect.*, v. 104, p. 351-37, 1996.
- BONFETTA, P. et al. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*, v. 8, p. 444-472, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, S. Z. et al. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.*, v. 107, p. 229-233, 1996.
- ABDEL-RAHMAN, S. Z. et al. GSTM1 and GSTT1 genes are potential risk modifiers for bladder cancer. *Cancer Detect Prev.*, v. 22, p. 129-138, 1998.
- Adonis, M. et al. Susceptibility and exposure biomarkers in people exposed to PAHs from diesel exhaust. *Toxicol Lett.*, v. 144, p. 3-15, 2003.
- ALEXANDRIE, A. K. et al. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms affect urinary 1-hydroxypyrene levels after PAH exposure. *Carcinogenesis*, v. 21, p. 669-676, 2000.
- AMORIM, L. M. F. et al. Analysis of CYP1A1 exon 7 polymorphisms by PCR-SSCP in a Brazilian population and description of two novel gene variations. *Mutat. Res.*, v. 547, p. 35-40, 2004.
- AMRE, D. K. et al. Case-Control study of lung cancer among sugar cane farmers in India. *Occup. Environ. Med.*, v. 56, p. 548-552, 1999.
- ANDRE, V. et al. Biomonitoring of mutagenicity with the Ames test: improvement of the extraction/concentration method. *Mutat. Res.*, v. 520, p. 199-205, 2002.
- AUTRUP, H. et al. Genetic polymorphisms in human xenobiotics metabolising enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat. Res.*, v. 464, p. 65-76, 2000.
- AYNACIOGLU, A. S. et al. High frequency of CYP1A1 mutations in a Turkish population. *Arch. Toxicol.* v. 72, p. 215-218, 1998.
- BAAK, J. P. A. et al. Genomics and proteomics in cancer. *Eur. J. Cancer*, v. 39, p. 1199-1215, 2003.
- BALMAIN, A. et al. The genetics and genomics of cancer. *Nat. Genet.*, v. 33, p. 238-244, 2003.
- BARTSCH, H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. *Mutat. Res.*, v. 462, p. 255-279, 2000.
- BELL, D. A. et al. Genetic monitoring of human polymorphic cancer susceptibility genes by polymerase chain reaction: application to glutathione transferase μ . *Environ. Health Perspect.*, v. 98, p. 113-117, 1992.
- BINKOVÁ, B. et al. Biomarker studies in Northern Bohemia. *Environ. Health Perspect.*, v. 104, p. 591-97, 1996.
- BOFFETTA, P. et al. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*, v. 8, p. 444-472, 1997.



BOSSO, R. M. V. *Avaliação da atividade mutagênica da fuligem sedimentável proveniente da queima da cana-de-açúcar e da urina dos cortadores de cana através de ensaios com mutação gênica reversa em Salmonella typhimurium*. 2000. 146 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto -SP.

BROCKMÖLLER, J. et al. Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition. *Toxicol lett.*, v. 102-103, p. 173-83, 1998.

CANELLA, K.; PELTONEN, K.; DIPPLE, A. Identification of (+) and (-) anti benzo(a)pyrene dihydrodiol epoxide-nucleic acid adducts by the 32p-postlabeling assay. *Carcinogenesis*, v. 12, p. 1826-1831, 1991.

CARVALHO-SILVA, D. R. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am. J. Genet.*, v. 68, p.281-286, 2001.

CASCORBI I., BROCKMÖLER, J., ROOTS, I. A. Polymorphism in the human *CYP1A1* gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and T to C in the 3' - flanking region. *Clin. Invest.*, v. 72, p. 240-248, 1994.

CASCORBI I., BROCKMÖLER, J., ROOTS, I.A. C4887A polymorphism in exon 7 of human *CYP1A1*: Population frequency, mutational linkages, and lung cancer susceptibility., *Cancer Res.*, v. 56, p. 4965-4969, 1996.

CERNÁ, M. et al. The use of a urine mutagenicity assay in the monitoring of environmental exposure to genotoxins. *Mutat. Res.*, v. 391, p. 99-101, 1997.

CHEN, S. Y. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in liver tissues of hepatocellular carcinoma patients and controls. *Int. J. Cancer*, v. 99, p. 14 -21, 2003.

CHRISP, C. E.; FISHER, G. L. Mutagenicity of airborne particles. *Mutat Res.*, v. 76, p. 143-164, 1980.

CLONFERO, E. et al. Urinary excretion of mutagens in coke oven workers. *Carcinogenesis*, v.16, p. 547-554, 1995.

COHEN, L. A. Diet and Cancer. *Sci. Am.*, v. 257, p. 42-48, 1987.

CONFORTI-FROES et al. Predisposing genes and increased chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers. *Mutat. Res.*, v. 379, p.53-59, 1997.

COSTA, D. J. et al. Influence of GSTM1 and NAT2 genotypes on the relationship between personal exposure to PAHs and biomarkers of internal dose. *Biomarkers*, v. 3, p. 411-24, 1998.

CROFTS, F. et al. Functional significance of different human CYP1A1 gene. *Jpn J Cancer*, v. 15, p. 2961-2963, 1994.

CYP1A1 allele nomenclature. Disponível em: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>. Acesso em: 21 out. 2003.

DELCLOS, K. B. et al. 32P- postlabelling in studies of arylamine and nitroaromatic hydrocarbon activation and mutagenesis. *IARC*, v. 124, p. 79-86, 1993.

DEMARINI, D. M.; SHELTON, M. L.; BELL, D. A. Mutation spectra in *Salmonella* of complex: comparison of urban air to benzo(a)pyrene. *Environ Mol Mutagen.*, v. 24, p. 262-75, 1994.

DEPORTES, I.; GUYOD, J.; ZMIROU, D. Hazard to man and the environment posed by the use of urban waste compost: a review. *Sci. Total Environ.*, v.172, p.197-222, 1995.

DIPPLE, A.; CHAUCHENG, S.; BIGGER, A. Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens. In: *Mutagens and Carcinogens in the Diet*. Wiley-Liss, Inc, 1990. p.109-27.

DIPPLE, A.; MOSCHEL, R. Chemistry of DNA alkylation and aralkylation. In: *Mutation and Environmental*. Wiley-Liss Inc; 1990. p. 71-80.

DOERJER, G.; BEDELL, M.A., OESCH, F. DNA adducts and their biological relevance. In: OBE, G. (Ed.) *Mutations in man*. Berlin: Springer-Verlag,. 1984. p. 20-34.

DOR, F. et al. Validity of Biomarkers in Environmental Health studies: the case of PAHs and benzene. *Crit. Ver. Toxicol.*, v. 29, n. 2, p. 129-168, 1999.

ELCI, O. C. et al. *J. Occup. Environ. Med.* v. 45, p. 1100-1106, 2003.

Environmental Protection Agency (EPA). *Method TO-13A determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) In ambient air using gas chromatography/mass spectrometry, (GC/MS)*. Washington, 1999. 78 p. (Compendium of methods for determination of toxic organic compounds in ambient air. EPA 625/R-96/010b).

EVANS, A. J. et al. Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck*, v. 26, p. 63-70, 2004.

FARMER, P. B. et al. Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. *Mutat. Res.*, v. 544, p. 397-401, 2003.

FRIEDBERG, G. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W. DNA Damage. In: _____. *DNA repair mutagenesis*. Washington:ASM Press, 1995. cap. 1, p. 2-58.

GABBANI, G. et al. *GSTM1* and *NAT2* genotypes and urinary mutagens in coke oven workers. *Carcinogenesis*, v. 17, p. 1675-1681, 1996.

GABBANI, G. et al. Influence of metabolic genotype *GSTM1* on levels of urinary mutagens in patients treated topically with coal tar. *Mutat. Res.*, v. 440, p. 27-33, 1999.

GARTE, S. The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis*, v. 19, p. 1329-1332, 1998.



HAMADA, G. S. The heme-binding region polymorphism of cytochrome P4501A1 (*CYP1A1*), rather than the *RstI* polymorphism of IIE1 (*CYP1IE1*), is associated with lung cancer in Rio de Janeiro. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, v. 4, p. 63-67, 1995.

Hansen. A. M. et al. Urinary 1-hydroxypyrene and mutagenicity in bus drivers and mail carriers exposed to urban air pollution in Denmark. *Mutat. Res.*, v. 557, p.7-17, 2004.

HARRIES, L. W. et al. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 641-644, 1997.

HARTZELL, G. E. Overview of combustion toxicology. *Toxicology*, v. 115, p. 7-23, 1996.

HATJIAN, B. A. et al. Ambient, biological and biological effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Toxicol. Lett.*, v. 77, p. 271-279, 1995.

HAYASHI, S. I. et al. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J. Biochem.*, v. 110, p. 407-411, 1991.

HEMMINKI, K. et al. Aromatic DNA adducts in foundry workers in relation to exposure, life style and CYP1A1 and glutathione transferase M1 genotype. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 345-350, 1997.

HEPP, H.; SIEGMANN, K.; SATTLER, K. New aspects of growth mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbons in diffusion flames. *Chem. Phys. Lett.*, v. 233, p. 16-22, 1995.

HIRVONEN, A. et al. Modulation of mutagenicity by genetically determined carcinogen metabolism in smokers. *Carcinogenesis*, v. 15, p. 813-815, 1994.

HUNG, R. J. et al. GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population. *Int. J. Cancer*, v. 110, p. 598-604, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: agosto 2004.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Disponível em <http://www.monographs.iarc.fr>. Acesso em 02 agosto. de 2004.

JEONG, H. J. et al. Association between glutathione S-Transferase M1 and T1 polymorphisms and increased risk for bladder cancer in Korean smokers. *Cancer Lett.*, v. 202, p. 193-199, 2003.

JONGENEELLEN, F. Biological Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: 1-hydroxypyrene in urine of people. *Toxicol. Lett.*, v. 72, p. 205-211, 1994.

JONGENEELLEN, F. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH- mixtures. *Sci. Total Environ.*, v. 199, p. 141-149, 1987.



- KADO, N.Y., LANGLEY, D., EISENSTADT, E. A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay. *Mutat Res.*, v. 121, p. 25-32, 1983.
- KATO, M. et al. Urinary Biomarkers in Charcoal Workers Exposed to Wood Smoke in Bahia State, Brazil. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 13, p. 1005-1012, 2004.
- KAWAJIRI, K. et al. Association of CYP1A1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung câncer. *Cancer Res.*, v. 56, p.72-76, 1996.
- KAWAJIRI, K. et al. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of cytochrome P450 1A1 gene. *FEBS Lett.*, v. 263, n. 3, p. 131, 1990.
- KAWAJIRI, K. et al. Structure and drug inducibility of the human cytochrome P-450c gene. *Eur J Biochem.*, v. 159, p. 219-225, 1986.
- KAWAJIRI, K. et al. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, v. 14, p. 77-87, 1993.
- KEOHAVONG, P. et al. K-ras mutations in lung carcinomas from nonsmoking women exposed to unvented coal. *Lung cancer*, v. 41, p. 21-27, 2003.
- KIM, S. J. et al. An efficient route to N6 deoxyadenosine adducts of diol epoxide of csrclinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 3, n. 6, p. 811-822, 1995.
- KRIEK, E. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk. *Mutat Res.*, v. 400, p. 215-231, 1998.
- KUENEMANN-MIGEOT, C. et al. Urinary promutagens of smokers: comparison of concentration methods and relation to cigarette consumption. *Mutat Res.*, v. 368, p. 141-147, 1996.
- KUENEMANN-MIGEOT, C. et al. Use of *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 and YG1021 and deconjugating enzymes for evaluating the mutagenicity from smokers' urine. *Mutat. Res.*, v. 390, p. 283-91, 1997.
- LANG, M.; PELKONEN, O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC*, v. 148, p. 13-22, 1999.
- LEE, J. et al. Influence of *GSTM1* genotype on association between aromatic DNA adducts and urinary PAH metabolites in incineration workers. *Mutat. Res.*, v. 514, p. 213-21, 2002.
- LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOLGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, v. 396, p. 646-649, 1998.
- LEWIN, B. Oncogenes and cancer. In: _____. *Genes VI*. Oxford: Oxford University Press, 1997. p. 1130-1172.



LEWTAS J. et al. Air pollution exposure-DNA adduct dosimetry in humans and rodents: evidence for non-linearity at high doses. *Mutat Res.*, v. 378, p. 51-63, 1997.

LEWTAS, J. et al. Sources of genotoxicity and cancer risk in ambient air. *Pharmacogenetics*, v. 2, n. 6, p. 288-296, 1992.

MARON, D. M., AMES, B. N. Revised methods the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, v. 113, p. 173-245, 1983.

MERLO, F. et al. Urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a marker for exposure to urban air levels of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 7, p. 147-55, 1998.

MIELZYNSKA, D. et al. Exposure of coke-oven workers to polycyclic aromatic hydrocarbons based on biological monitoring results. *Am Ind Hyg Assoc J.*, v. 58, p. 661-666, 1997.

MILLER, D. P. et al. Smoking and the risk of Lung Cancer: Susceptibility with GSTP1 Polymorphisms. *Epidemiology*, v. 14, p. 545 -551, 2003.

MILLER, E.; MILLER, J. The mutagenicity of chemical carcinogens: correlations, problems and interpretations. In: HOLLAENDER A, (Ed.). *Chemical mutagen*. New York:Plenum, 1971. p.83-119.

MOHR, L.C.; RODGERS, J.K.; SILVESTRI, G.A. Glutathione S-Transferase M1 polymorphism and risk of lung cancer. *Anticancer Res.*, v. 23, p. 2111 -2124, 2003.

MOTYKIEWICZ, G. et al. cytogenetic study of men environmentally and occupationally exposed to airborne pollutants. *Mutat. Res.*, v. 280, p. 253-259, 1992.

MROZIKIEWICZ, P. M. et al. *CYP1A1* mutations 4887A, 4889G, 5639C and 6235C in the Polish population and their allele linkage, determined by peptide nucleic acid-mediated PCR clamping. *Pharmacogenetics*. v. 7, p. 303-307, 1997.

MURE K. et al. Heavy cigarette smokers show higher mutagenicity in urine. *Mutat Res.*, v. 373, p. 107-111, 1997.

NEBERT, D.W., INGELMAN-SUNDBERG, M., DALY, A.K. Genetic epidemiology of environmental toxicity and cancer susceptibility: human allelic polymorphisms in drug-metabolizing enzyme genes, their functional importance, and nomenclature issues. *Drug. Metab. Rev.* v. 31, p. 467, 87, 1999.

NELSON, H. H. et al. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis*, v. 16, p. 1243 -1245, 1995.

NIOSH. *Polynuclear aromatic hydrocarbons by HPLC*: method 5506. Cincinatti, 1998. 9p. (NIOSH manual of analytical methods).

PARRA, F. C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS*, v. 100, p.177-182, 2003.



PASQUINI, R. et al. Urine mutagenicity and biochemical parameters as markers of exposure to petroleum pitch using a rat model. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 15, p. 56-66, 1990.

PAVANELLO, S. et al. Influence of *GSTM1* genotypes on anti-BPDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of humans exposed to PAHs. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, v. 72, p. 238-246, 1999.

PAVANELLO, S.; CLONFERO, E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat Res.*, v. 465, p. 285-308, 2000.

PELTONEN, K.; DIPPLE, A. Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry of DNA adduct formation. *J. Occup. Environ. Med.*, v. 37, n. 1, p. 52-58, 1995.

PERERA, F.P.; WEINSTEIN, I. B. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis*, v. 21, p. 517-524, 2000.

PINARBASI, H. et al. Strong association between the *GSTM1*-null genotype and lung cancer in a Turkish population. *Cancer Genet. Cytogenet.* v. 146, p. 125 -129, 2003.

PINTO, L. F. R. et al. Mechanisms of esophageal cancer development in Brazilians. *Mutat. Res.*, v. 544, p. 362-373, 2003.

RAMEL, C. Pollution, carcinogenesis and cancer prevention. *Acta Oncol.*, v. 30, p. 27-33, 1991.

RECIO, L. et al. Application of urine mutagenicity to monitor coal liquefaction workers. *Mutat. Res.*, v. 136, p. 201-207, 1984.

ROSSINI, A. et al. Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. *Genet. Mol. Biol.*, v. 1, p. 233-240, 2002.

ROSSIT, A. R. B. *Investigação molecular de polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos e ao reparo de DNA em populações brasileiras*. 2001. 181 f. Tese (Doutor em Genética) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto – SP.

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

SAKIARA, K. A. Otimização e validação de metodologia para determinação de 1-hidroxipireno em urina. 2001. 4 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Araraquara - SP.

SANDFORD, A. J.; SILVERMAN, E. K. Chronic obstructive pulmonary disease. 1: Susceptibility factors for *COPD* the genotype – environment interaction. *Thorax*, v. 57, p. 736-41, 2002.

SARASIN, A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, v. 544, p. 99-106, 2003.

- SATO, M. I. et al. Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial areas of Sao Paulo, Brazil. *Mutat. Res.*, v. 335, p. 317-330, 1995.
- SCHNEIDER, J. et al. *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. *Cancer Lett.*, v. 208, p. 65-74, 2004.
- SCHOKET, B. DNA damage in humans exposed to environmental and dietary polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.*, v. 24, n. 2, p. 143-153, 1999.
- SCHWARZ, D. et al. Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis*, v. 22, p. 453-459, 2001.
- SEIDEGARD, J. et al. Isoenzyme (s) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow-up study. *Carcinogenesis*, v. 11, p. 33-36, 1990.
- SIKORA, K. Developing a Global Strategy for Cancer. *Eur. J. Cancer*, v. 35, p. 1870-1877, 1999.
- SINGH, R. et al. A rapid and simple method for the analysis of 1-hydroxypyrene glucuronide: a potential biomarker for polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Carcinogenesis*, v. 16, n. 12, p. 2909-2915, 1995.
- SMITH, B. A. et al. DNA adduct formation and T-lymphocyte mutation induction in F344 rats implanted with tumorigenic doses of 1,6-dinitropyrene. *Cancer Res.*, v. 55, p. 2316-2324, 1995.
- SONG, N. et al. CYP1A1 polymorphism and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case-control study in China. *Carcinogenesis*, v. 22, p. 11-16, 2001.
- SORENSEN, M. et al. Glutathione S-transferase T1 null-genotype is associated with an increased risk of lung cancer. *Int. J. Cancer*, v. 110, p. 219-224, 2004.
- SØRENSEN, M. et al. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat. Res.*, v. 544, p. 255-271, 2003.
- SREELEKHA, T. T. et al. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol.*, v. 37, p. 593-598, 2001.
- STRANGE, R. C. et al. The human glutathione S-transferases: a case-control study of the incidence of the GST1 0 phenotype in patients with adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, v. 12, p. 25-28, 1991.
- Sugimura, H. et al. *CYP1A1* and *CYP2E1* polymorphism and lung cancer, case-control study in Rio de Janeiro, Brasil. *Pharmacogenetics*, v. 5, p. S145-S1489, 1995.
- TANIMOTO, K. et al. Polymorphisms of the CYP1A1 and GSTM1 gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with a cigarette dose. *Oral Oncology*, v. 35, p. 191-196, 1999.



TANINGHER, M. et al. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat Res.*, v. 436, p. 227-261, 1999.

ÚNICA. Disponível em: <http://www.unica.com.br/files/informacaounica/unica57.pdf>. Acesso em 20 fev. 2004.

ÚNICA. Disponível em: http://www.unica.com.br/pages/sociedade_desenvol1.asp. Acesso em: 20 fev. 2004.

VAN HOUDT, J. J. Mutagenic activity of airborne particulate matter in indoor and outdoor environments. *Atmos. Environ.*, v. 24B, p. 207-220, 1990.

VARGAS, V. M. F. et al. Mutagenic activity of airborne particulate matter from the urban area of Porto Alegre, Brazil. *Genet. Mol. Biol.*, v. 21, p. 247-253, 1998.

Venier, P. et al. Mutagenic activity and polycyclic aromatic hydrocarbon level in urine of workers exposed to coal tar pitch volatiles in an anode plant. *Carcinogenesis*, v. 6, p. 749-52, 1985.

VIEZZER, C. et al. Influence of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *EPHX* gene polymorphisms on DNA adduct level and HPRT mutant frequency in coke-oven workers. *Mutat. Res.*, v. 431, p. 259-269, 1999.

VO DINH, T. Chemical analysis of polycyclic aromatic compounds. In: VICENT, J. H. (Ed.). *Aerosol samplim*. New York: John Wiley, 1989. p.17-21.

WARHOLM, M. et al. Genotypic and phenotypic determination of polymorphic glutathione transferase T1 in a Swedish population. *Pharmacogenetics*, v. 5, p. 252-254, 1995.

WATANABE, M.; ISHIDATE Jr. M.; NOHMI, T. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutat. Res.*, v. 234, p.3 37-48, 1990.

WATANABE, T. et al. Comparison of the mutational specificity induced by environmental genotoxin nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in *Salmonella typhimurim* his genes. *Mutat Res.*, v. 394, p. 103-12, 1997.

WESTON, A. et al. Fluorescence detection of lesions in DNA. In: SUTHERLAND, B.; WOODHEAD, A. (Ed.). *DNA damage and repair in human tissues*. New York: Plenum, 1990. p. 63-81.

WHO.. *Selected non-heterocyclic aromatic hydrocarbons*. Genova, 1998. p. 883. (Environmental health criteria, 155).



- WORMHOUDT, L. W.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit. Ver. Toxicol.*, v. 29, p. 59-124, 1999.
- WRIGHT, A. The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. *Mutat. Res.*, v. 75, p. 215-241, 1980.
- WU, M.T. et al. Cytochrome P450 1A1 *MspI* polymorphism and urinary 1-hydroxypyrene concentrations in coke-oven workers, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 7, p. 823-29, 1998.
- YAMASAKI, H. et al. Nongenotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project. *Mutat. Res.*, v. 353, p. 47-63, 1996.
- YAN, P. P. et al. Dissecting complex epigenetic alterations in breast cancer using CpG island microarrays. *Cancer Res.*, v. 61, p. 8375-8390, 2001.
- YIN, X. J. Mutagenicity of urine from individuals exposed to LPG combustion products. *Biomed Environ Sci.*, v.11, p. 251-257, 1998.
- ZAMPERLINI, G. C. M.; SILVA, M. R. S.; VILEGAS, W. Identification of polycyclic hydrocarbons in sugar cane soot by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, v. 46, p. 655-663, 1997.

VII. RESUMO

BOSSO, R.M.V. Investigação de biomarcadores de suscetibilidade e de exposição ambiental em indivíduos ocupacionalmente expostos à queima de canaviais. São José do Rio Preto, 2004. 106p. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

No presente estudo investigou-se as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*2A*, **2B* e **4* em uma população (n=99) do noroeste do Estado de São Paulo. Para tanto, foram empregadas as técnicas PCR multiplex, PCR-RFLP e PCR-SSCP. Adicionalmente, foi avaliada a atividade mutagênica das amostras de urina de parte dessa população, constituída de cortadores de cana-de-açúcar, comparando-se os períodos da safra, quando os trabalhadores cortam cana queimada (expostos) e entressafra, época do plantio (não expostos). O 1-hidroxipireno urinário (1-OHP) foi usado como marcador de exposição interna a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), e a influência dos polimorfismos na excreção desse metabólito foi analisada. Nossos resultados mostraram que as frequências dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulo foram 34,3 % e 20,2 %, respectivamente. Essas frequências mostraram-se similares quando comparadas as de outras populações brasileiras. Encontramos uma alta frequência de heterozigotos para o genótipo *GSTP1* e mostramos que essa população não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências alélicas para os polimorfismos *CYP1A1*2A*, **2B* e **4* foram respectivamente 0,23; 0,14 e 0,03. Dentre as 29 amostras de urina dos cortadores de cana-de-açúcar expostos à queima de canaviais oito mostraram-se mutagênicas ou com traços de mutagenicidade e 16 foram tóxicas; no entanto, não foi possível investigar a influência dos polimorfismos em relação a atividade mutagênica da urina devido a alta toxicidade das amostras. Os níveis de 1-OHP urinário foram significativamente maiores ($P < 0,0000$) em cortadores de cana expostos que no grupo não exposto e controle. Não houve influência dos polimorfismos na excreção de 1-OHP urinário. Conclui-se que os trabalhadores estão significativamente mais expostos ao PAHs e a compostos genotóxicos no período da safra que na entressafra. Estes resultados reforçam a necessidade desses trabalhadores usarem protetores respiratórios, óculos de proteção e roupas que minimizem a absorção dos compostos presentes na fumaça e fuligem originados com a queima de canaviais.

Palavras chaves: cortadores de cana-de-açúcar, mutagenicidade urinária, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), 1-hidroxipireno (1-OHP), polimorfismos genéticos.



BOUEN, P.M.V. Biomarkers of susceptibility and environmental exposure investigation in individuals exposed occupationally to burnt sugarcane fields. São José do Rio Preto, 2004, 105p. (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

The present study aimed to investigate the genotypic and allelic frequencies in *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1* *2A, *2B and *4 polymorphisms in a population (n=95) of the northwest of the São Paulo State Brazil. To do so, we employed PCR, multiplex, PCR-RFLP and PCR-SSCP. In addition, it was evaluated the possible mutagenic activity of urine samples of 8000h sugarcane workers and non-exposed to burnt of sugarcane fields. Urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP) was used as marker of internal exposure of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). We also analyzed the influence of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *CYP1A1* polymorphisms in the 1-OHP excretion. Our results showed that the frequencies of the *GSTM1* and *GSTT1* genotypes were 34.3 % and 20.2 %, respectively. These frequencies were similar when compared to other Brazilian populations. We found high frequency of the heterozygous for the *GSTP1* genotype and showed that this population was not in Hardy-Weinberg equilibrium. The allelic frequencies of the *CYP1A1* *2A, *2B and *4 polymorphisms were 0.23, 0.14, and 0.03, respectively. Among the 25 urine samples of sugarcane workers exposed to burnt of sugarcane fields, eight showed mutagenicity or traces of mutagenicity and 16 were toxic. However, it was not possible to investigate the influence of the polymorphisms regarding to urinary mutagenic activity due the high toxicity of the samples. The 1-OHP urinary levels in exposed sugarcane workers were significantly higher ($P < 0.0001$) than in the non-exposed workers and control group. No influence of *GSTs* and *CYP1A1* polymorphisms was observed in the 1-OHP levels studied. In conclusion, the group of sugarcane

VIII. ABSTRACT

harvesting period than the non-harvesting one. These data reinforce the need of the use of protection devices such as respiratory protectors, gloves and clothes by these workers in order to minimize the absorption of compounds present in smoke and dust of burnt sugarcane fields.

Keywords: Sugarcane workers, urinary mutagenicity, 1-hydroxypyrene (1-OHP), genetic polymorphisms, urinary, aromatic hydrocarbons (PAHs).



BOSSO, R.M.V. Biomarkers of susceptibility and environmental exposure investigation in individuals exposed occupationally to burnt sugarcane fields. São José do Rio Preto, 2004. 106p. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

The present study aimed to investigate the genotypic and allelic frequencies in *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1**2A, *2B and *4 polymorphisms in a population (n=99) of the northwest of the São Paulo State Brazil. To do so, we employed PCR multiplex, PCR-RFLP and PCR-SSCP. In addition, it was evaluated the possible mutagenic activity of urine samples of exposed sugarcane workers and non-exposed to burnt of sugarcane fields. Urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP) was used as marker of internal exposure of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). We also analyzed the influence of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *CYP1A1* polymorphisms in the 1-OHP excretion. Our results showed that the frequencies of the null *GSTM1* and *GSTT1* genotypes were 34.3 % and 20.2 %, respectively. These frequencies were similar when compared to other Brazilian populations. We found high frequency of the heterozygous for the *GSTP1* genotype and showed that this population was not in Hardy-Weinberg equilibrium. The allelic frequencies of the *CYP1A1**2A, *2B and *4 polymorphisms were 0.23, 0.14, and 0.03, respectively. Among the 29 urine samples of sugarcane workers exposed to burnt of sugarcane fields, eight showed mutagenicity or traces of mutagenicity and 16 were toxic. However, it was not possible to investigate the influence of the polymorphisms regarding to urinary mutagenic activity due the high toxicity of the samples. The 1-OHP urinary levels in exposed sugarcane workers were significantly higher ($P < 0.0000$) than in the non-exposed workers and control group. No influence of *GSTs* and *CYP1A1* polymorphisms was observed in the 1-OHP urinary levels studied. In conclusion, the group of sugarcane workers are significantly more exposed to PAH and compounds genotoxic during the harvesting period than the non-harvesting one. These data reinforce the need of the use of protection devices such as respiratory protectors, glasses and clothes by these workers in order to minimize the absorption of compounds present in smoke and dust of burnt sugarcane fields.

Keywords: Sugarcane workers, urinary mutagenicity, 1-hydroxypyrene (1-OHP), genetic polymorphisms, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).



UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

INSTITUTO DE BIOLÓGICAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA CIENTÍFICA

Eu, deixo de haver receio de participar voluntariamente, da pesquisa que vem sendo realizada pelo Instituto de Biológicas, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto - SP. Respeitando, portanto, a minha

liberdade de escolha de não participar e sem qualquer tipo de coerção ou pressão. Este estudo poderá ser apresentado em publicações científicas sob a minha identificação.

São José do Rio Preto, _____ de _____ de _____

IX. ANEXOS

nome

assinatura



UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

**CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO EM
PESQUISA CIENTÍFICA**

Estou ciente de haver concordado em participar, voluntariamente, da pesquisa que vem sendo realizada pelo Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto - SP. Para tanto, fornecerei sangue e urina.

Fui informado também de que os resultados a serem obtidos só serão válidos quando analisados em conjunto, nunca individualmente. Esse estudo poderá ser apresentado em publicações científicas sem a minha identificação.

São José do Rio Preto, ____ de ____ de ____.

nome

assinatura

Para Uso do Pesquisador

Número Código Data/...../.....

QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL

Por favor, leia as seguintes questões cuidadosamente e responda-as o mais completo e corretamente possível. A informação dada não será associada com seu nome em nenhum documento público e será revelada somente ao investigador responsável por este estudo. As respostas que você fornecer podem ter um papel direto na interpretação de nossos resultados.

HISTÓRIA PESSOAL

1.Nome:

.....

2.dade:

.....

3.Data de Nascimento:

...../...../.....

Dia

Mês

Ano

4. Sexo: () Masculino () Feminino

5. Grupo Étnico:

a)cor da pele:.....

b)descendência:

HISTÓRICO DE EXPOSIÇÃO

6. Exposição Ocupacional

.....

Por quantos anos.

7. Você tem sido exposto, em seu emprego, a algum dos seguintes compostos químicos?

7.1. Quando você foi exposto pela primeira vez? (meses ou anos)

7.2. Quando você foi exposto pela última vez? (meses ou anos)

7.3. Quanto tempo em termos de dias, meses ou anos, no total, você foi exposto?



Asbestos	() sim	1.....
(amianto)	() não	2.....
		3.....
Radiação	() sim	1.....
	() não	2.....
		3.....
Produtos de	() sim	1.....
Carvão	() não	2.....
		3.....
Cinzas (de	() sim	1.....
madeira, couro ou	() não	2.....
partículas finas de		3.....
metal)		
Pesticidas	() sim	1.....
/Herbicidas	() não	2.....
		3.....
Produtos de	() sim	1.....
petróleo	() não	2.....
		3.....
Tintura	() sim	1.....
	() não	2.....
		3.....
Solventes	() sim	1.....
	() não	2.....
		3.....
Outros químicos	() sim	1.....
(especificar no	() não	2.....
item 15)		3.....

HISTÓRICO DE TABAGISMO

8. Você fuma constantemente? () sim () não

Se **sim**:

a) Há quanto tempo você
fuma?.....



b) Você fuma atualmente? () sim () não

Se sim proceda em diante.

Se não, quando parou de fumar?

Há quanto tempo parou de fumar?

c) Você fuma cigarros? () sim () não

Se sim, quantos cigarros por dia

9. Você está tomando algum medicamento ? (por exemplo: comprimidos para pressão sanguínea, antibióticos, antiinflamatórios, antidepressivos, insulina, tranquilizantes, relaxantes musculares e etc.)

Se sim qual o tipo de medicação, a dose, a quantidade/dia e o período de tempo (mês de início e de término)?

10. Você já teve ou tem alguma das seguintes enfermidades?

- () Câncer
- () Hepatite
- () Herpes
- () Aids
- () Meningite
- () Doença cardiovascular
- () Diabetes
- () Outras enfermidades

HISTÓRIA DA DIETA

(deve refletir somente hábitos frequentes)

11. Você come carne?

() sim () não

Se sim, como você come frequentemente os seguintes alimentos:

Dias/semana

nunca 1-2 3-4 5-6 todo dia

Cozida.....

Assada

Frita

Churrasco.....

Outros.....

12. Você toma bebida alcoólica? () sim () não

Se sim quantas:

Obs.

Garrafas ?.....

Doses ?

Copos ?.....

OBRIGADA



