

ANDRÉA REGINA BAPTISTA ROSSIT

Estudo Molecular de Polimorfismos e
Relacionados ao Metabolismo de
Xenobióticos e ao Reparo do DNA em
Populações Brasileiras

Outubro - 2001

1910001013



ANDRÉA REGINA BAPTISTA ROSSIT

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE POLIMORFISMOS EM
GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE
XENOBIÓTICOS E AO REPARO DO DNA EM
POPULAÇÕES BRASILEIRAS**

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

São José do Rio Preto - SP

UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

Programa de Pós-graduação em Genética

ANDRÉA REGINA BAPTISTA ROSSIT

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE POLIMORFISMOS EM
GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE
XENOBIÓTICOS E AO REPARO DO DNA EM
POPULAÇÕES BRASILEIRAS**



T1013/01

Tese apresentada para obtenção do grau
de Doutor em Genética

Orientadora: Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes

Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto

São José do Rio Preto - SP

L575:577.23
R835i

Assunto CAPES:

2.02.02.00-8 - Genética molecular
e de microrganismos

Genética molecular

O Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
Área de Concentração em Genética, passou a denominar-se
Programa de Pós-Graduação em Genética pela Resolução
UNESP nº RU. 10/01 de 08/03/2001, DOE de 09/03/2001.

Rossit, Andréa Regina Baptista.

Investigação molecular de polimorfismos em genes relacionados ao
metabolismo de xenobióticos e ao reparo do DNA em populações
brasileiras / Andréa Regina Baptista Rossit. – São José do Rio Preto :
[s.n.], 2001.

180 f. : 4 il. ; 30 cm.

Orientador: Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes.

Co-orientador: Cláudia Márcia Aparecida Carareto

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

1. Genética Molecular. 2. Polimorfismos Genéticos. 3. Metabolismo.
4. Reparo do DNA. I. Froes, Nívea Dulce Tedeschi Conforti. II.
Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas. III. Investigação molecular de polimorfismos em genes
relacionados ao metabolismo de xenobióticos e ao reparo do DNA em
populações brasileiras

CDU – 575: 577.23

ANDRÉA REGINA BAPTISTA ROSSIT

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE POLIMORFISMOS EM
GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE
XENOBIÓTICOS E AO REPARO DO DNA EM
POPULAÇÕES BRASILEIRAS**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador.....

2º Examinador.....

3º Examinador.....

4º Examinador.....

5º Examinador.....

São José do Rio Preto, 16 de outubro de 2001



Aos amores Fernando e Júlia, que
preenchem minha existência
de graça e luz.



AGRADECIMENTOS

A conclusão de uma conquista tão marcante quanto a obtenção do grau de Doutor é pontuada por diversas etapas nas quais tem participação diferentes colaboradores. Desejo aqui expressar minha gratidão.

À Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes, que recebeu-me em seu grupo acreditando em minha capacidade profissional e promovendo-me em muitas oportunidades. Sua coragem e perseverança, possibilitaram meu projeto de pesquisar no exterior, bem como a execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, agradeço pelo exemplo de retidão e postura acadêmica. Sou grata ainda pelas proveitosas discussões que auxiliaram minha formação pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Isabel Rosa Cabral (UFPA), grande amiga e exemplar pesquisadora, pela qual tenho admiração crescente, por seu companheirismo, dedicação e sinceridade. Por todas as vitórias, conquistas e insucessos compartilhados, sempre.

Às professoras Dra. Maria de Fátima Sonati (UNICAMP), Dra. Daisy Maria Del Fávero (UNESP/BOTUCATU) e Dra. Rita de Cássia M. Alves da Silva (FAMERP) pela gentileza em auxiliar-me analisando a pró-forma desta Tese.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, seu apoio e seus ensinamentos foram importantes ao longo do curso de pós-graduação. Agradeço também o cuidado na revisão da primeira versão desta Tese, assim como a valorosa entrevista.

À Profa. Dra. Christine Hackel (UNICAMP), por seu espírito acadêmico cooperativo que permitiu a realização de parte deste projeto no CBMEG/UNICAMP e por sua contribuição efetiva, através de seus profundos conhecimentos, durante a elaboração dos artigos para publicação.

Ao Prof. Dr. Sherif Abdel-Rahman (UTMB/EUA), pelo incentivo à carreira científica, freqüente auxílio ao presente trabalho e oportunidade oferecida de realizar profícua pesquisa em seu laboratório na Universidade do Texas.

Ao Dr. Otávio Ricci Júnior, diretor do HEMOCENTRO (FAMERP), pela solicitude ao permitir a seleção dos doadores e coleta de sangue. Extendendo minha gratidão à Profa. Dra. Andréa Borduchi Carvalho Franco de Salles e demais funcionários dessa Instituição pelo auxílio nesses processos.

Aos voluntários doadores de sangue, saudáveis e etilistas cirróticos, pela contribuição desinteressada e fundamental.

Ao Professor Arno Hamel (UFPA), pela pronta cooperação ao ceder as amostras de DNA dos indivíduos paraenses.

Ao Prof. Dr. Antônio José Manzato (DCE-IBILCE/UNESP), pela análise estatística dos dados obtidos neste estudo.

Pela gentileza e profissionalismo com que contribuíram para este trabalho, quero agradecer:

- às enfermeiras Kikuê Kamoe de Oliveira e Maria Aparecida do Carmo Costa, do Ambulatório Médico do IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto;
- à Elza Mitiko Sato, bibliotecária responsável pelo Serviço de Comutação Bibliográfica do IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto;
- aos funcionários Nanci Q. A. Pereira e Oscar J. Marques, da Seção de Pós-graduação do IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto;
- ao Celso Pereira Reis Filho, encarregado de serviços da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética do IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto, em especial às professoras Dra. Eloiza Helena Tajara, Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo e Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira.

Às companheiras do Laboratório de Epidemiologia Molecular do IBILCE/UNESP, pela convivência amigável. Em especial, agradeço às pós-graduandas Ana Regina Chinelato e Lya Bueno de Carvalho, pela participação nos processos de coleta das amostras e extração de DNA. À mestrande Lya Bueno de Carvalho, agradeço ainda a colaboração intensa no preparo do material avaliado na Universidade do Texas.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Genética, particularmente à Profa. Dra. Priscila Belintani por sua amizade sincera e dedicada.

À minha amiga Profa. Dra. Lilian Castiglioni Ruiz, de quem tive apoio incondicional desde a Iniciação Científica, quero agradecer o ombro amigo, a paciência, o estímulo e o companheirismo. Sua presença transformou essa conquista em caminho mais leve.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética do IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto, pela oportunidade.

Ao CNPq, FAPESP e PROPP/UNESP pelo apoio financeiro.



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos queridos genitores **José e Neusa Baptista**, agradeço o amor e a presença, além do exemplo de conduta. Tê-los como avós dedicados proporcionou tranquilidade durante a execução deste trabalho. À minha mãe, credito a crença no sonho e na irrefutável certeza de sua realização.

Ao meu amor **Fernando**, companheiro e maior incentivador, agradeço a compreensão ilimitada em minhas muitas ausências. Sua admiração por minha capacidade profissional e enquanto ser humano me impulsionam às minhas conquistas.

À **Júlia**, estimada filha, sua existência iluminada e alegria infantil trazem a esperança diária de que podemos contribuir por um mundo melhor.

À minha irmã **Daniela**, que espirituosa amenizou as agruras desse período, proporcionando momentos de riso e descontração.

À toda a família Rossit, em especial à minha sogra **Clarice** (in memorian) cuja existência exemplar, amor e constante manifestação de júbilo ante meu crescimento, estimulam o meu prosseguir.

Aos meus tios **Regina e Luís** e aos primos **Ana Luísa e Guilherme**, pelo convívio carinhoso durante minha estadia em Campinas, diminuindo a distância do lar.

À minha querida **Inês**, por sua cooperação incondicional e dedicação à minha família durante a execução deste estudo, contribuindo assim com a harmonia e tranquilidade de nosso lar.

Ao **Percival**, que como poucos entende o significado da amizade.

Ao casal **Sherif e Randa**, pela calorosa acolhida em seu lar durante a realização dos experimentos no Texas, EUA.

Aos companheiros da **Associação Espírita Allan Kardec e Sociedade Creche de Livia**, cuja convivência no exercício do amor contribuiu grandemente para a paz necessária à realização deste trabalho. Em especial, quero agradecer ao casal **Vânia e Alemão Paschoal** pelo incentivo frente aos desafios.

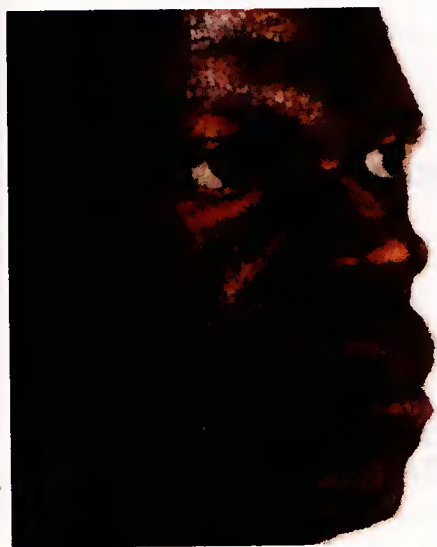
Agradeço a todos que compartilharam deste trabalho, assim lhe atribuindo sentido.



DEUS ME FAÇA BRASILEIRO
CRIADOR E CRIATURA
UM DOCUMENTO DA RAÇA
PELA GRAÇA DA MISTURA
...AS TRÊS RAÇAS DO BRASIL
TÊM A COR DA FORMOSURA...

AS SELVAS TE DERMAM NAS NOITES
TEUS RITMOS BÁRBAROS
E OS NEGROS TROUXERAM DE LONGE
RESERVAS DE PRANTO
OS BRANCOS FALARAM DE AMOR
EM SUAS CANÇÕES
E DESSA MISTURA DE VOZES
NASCEU O TEU CANTO...

...BATOM
NO LÁBIO NORTISTA
O OLHAR VÊ TONS TÃO SUDESTES
E O BEIJO
QUE VÓS ME NORDESTES
ARRANHA CÉU
NA BOCA PAULISTA...



O MEU PAI ERA PAULISTA
MEU AVÔ PERNAMBUCANO
O MEU BISAVÔ, MINEIRO
MEU TATARAVÔ, BAIANO...



...OLHA QUE MARAVILHA
ESSA CRIOULA
TEM O OLHO AZUL
ESSA LOURINHA
TEM CABELO BOMBRILO
AQUELA ÍNDIA
TEM SOTAQUE DO SUL
ESSA MULATA
É DA COR DO BRASIL...

Os trechos das canções pertencem a alguns dos maiores talentos da Música Popular Brasileira:
Chico César, Chico Buarque de Hollanda, David Nasser, Herbert Vianna e Moraes Moreira.
As imagens são fragmentos de algumas obras de Portinari.

SUMÁRIO

CAPÍTULO UM:	
INTRODUÇÃO.....	13
I. A Epidemiologia Molecular e o Câncer.....	14
II. Biomarcadores de Suscetibilidade e a Metabolização Xenobiótica.....	19
II.1. A superfamília citocromo P450.....	23
II.1.1. O gene <i>CYP2E1</i>	25
II.2. As glutatíão-S-transferases.....	28
III. Biomarcadores de Suscetibilidade e o Reparo do DNA.....	30
III.1. O gene <i>XRCC1</i>	32
IV. Polimorfismos em Genes do Biometabolismo e de Reparo do DNA Segundo a Etnia.....	38
V. Objetivos.....	40
 CAPÍTULO DOIS:	
SUSCETIBILIDADE GENÉTICA, BIOMETABOLISMO E O CÂNCER..	41
 CAPÍTULO TRÊS:	
POLIMORFISMOS DE ENZIMAS METABOLIZADORAS DE XENOBIÓTICOS NO BRASIL.....	52
 CAPÍTULO QUATRO:	
CIRROSE HEPÁTICA ALCOÓLICA E OS POLIMORFISMOS NO GENE <i>XRCC1</i>	84

CAPÍTULO CINCO:	
DISCUSSÃO.....	127
I. A Suscetibilidade Genética e o Câncer.....	128
II. Polimorfismos das Enzimas Metabolizadoras de Xenobióticos no Brasil.....	132
III. Cirrose Hepática Alcoólica e os Polimorfismos do Gene <i>XRCC1</i>	137
CAPÍTULO SEIS:	
CONCLUSÕES.....	143
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146
RESUMO.....	180
ABSTRACT.....	181

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

β - Pol	DNA polimerase β
BER	Reparo por Excisão de Bases (do Inglês base excision repair)
BRCT	proteína de suscetibilidade ao câncer de mama homóloga ao terminal C (do Inglês breast cancer susceptibility protein homolog C-terminal)
CHO	células do ovário de Hamster chinês (do Inglês Chinese Hamster ovarian cells)
CYP	citocromo P450
CYP1A1	citocromo P4501A1
CYP2D6	citocromo P4502D6
CYP2E1	citocromo P4502E1
DNA	ácido desoxiribonucleico
GST	glutatião-S-transferase
GSTM1	glutatião-S-transferase, classe mu (μ)
GSTT1	glutatião-S-transferase, classe teta (θ)
NAT	N-acetiltransferase
NNK	nitrosamina, 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona

NTD	domínio N terminal (do Inglês N-terminal domain)
OR	Risco relativo (do Inglês Odds Ratio)
PAH	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (do Inglês polycyclic aromatic hydrocarbon)
PARP	poli(ADP-ribose)polimerase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do Inglês polymerase chain reaction)
RFLP	Polimorfismo no Tamanho do Fragmento de Restrição (do Inglês restriction fragment length polymorphism)
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do Inglês reactive oxygen species)
XRCC1	proteína do grupo 1 raio-X complementar (do Inglês X-ray cross-complementing group 1 protein)

Introdução

Capítulo Um



I. A Epidemiologia Molecular e o Câncer

Durante as três últimas décadas foi possível o delineamento de diversos aspectos da biologia e da patologia do câncer. A hipótese de que o processo carcinogênico é composto por múltiplas etapas que conduzem à transformação celular e subseqüentes estágios malignos, é hoje amplamente aceita. Neste contexto, o papel atribuído aos fatores genéticos evoluiu rapidamente através da estimativa, caracterização e organização da informação genética.

Atualmente, com o Projeto Genoma Humano e, mais recentemente, com o Projeto Genoma Ambiental (NIEHS, 1997), espera-se que a compreensão de que os fatores genético e ambiental se interagem, viabilize novas estratégias de prevenção e tratamento da doença (Yuspa, 2000). Tal avanço reflete a preocupação política, social e científica frente a este problema de saúde pública, já que o câncer representa importante causa de mortalidade e morbidade mundial (Perera, 1997; INCA, 2001).

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de estimar o total de tumores passíveis de prevenção, sendo que tais valores podem atingir 50% de todos os casos em países industrializados (Tomatis *et al.*, 1997). Assim, grande parte das neoplasias é, teoricamente, passível de prevenção, dada a participação de um grande número de fatores etiológicos ambientais (Ames *et al.*, 1995; David & Muir, 1995; Perera, 1996; Venitt, 1996), tais como a exposição esporádica ou seqüencial a carcinógenos químicos, radiação ionizante e não ionizante e os estados inflamatórios crônicos quer sejam bacterianos, virais ou parasitários (Jensen, 1983; Anwar, 1993; Weinberg, 1996; Wild & Kleihues, 1996). O estilo de vida, particularmente o hábito tabagista e a dieta, somam-se aos agentes causais passíveis de controle, constituindo importante alvo das campanhas de prevenção (Perera, 1997; Perera & Weinstein, 2000; Sugimura, 2000). Além desses, fatores como etnia, sexo, idade e estado

nutricional e de saúde, também influenciam nas taxas de incidência e mortalidade (Figura 1).

Torna-se claro, portanto, que grande parte das neoplasias resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo a contribuição exclusivamente genética responsável por apenas 5% de todos os tumores. A fração restante pode ser atribuída a fatores ambientais "externos" que atuam em conjunto com a suscetibilidade genética (Ponder, 1990; Knudson, 1991).

Knudson (1985) propôs a teoria dos oncodemes, que permite classificar os indivíduos e as populações em quatro grupos quanto às participações dos fatores ambiental e genético em seu risco de desenvolver o câncer. Esses grupos são: **1. Ambiente Genético:** seu risco deve-se às mutações ao acaso; **2. Ambiental:** risco deve-se ao contato com carcinógenos; **3. Ambiental/Genético:** risco decorrente da ação dos carcinógenos ambientais em indivíduos geneticamente suscetíveis e **4. Genético:** grupo em que a influência genética é preponderante à ambiental na determinação do risco.

No quarto oncodeme, as mutações conferem alto risco individual de um tipo particular de câncer em algum estágio da vida, independente do ambiente. Os indivíduos dessa população são ditos **predispostos** e constituem a minoria. Entre esses estão os portadores de doenças genéticas, tais como o xeroderma pigmentoso, ataxia telangiectasia e tumor de Wilms (Perera, 1997; Hussaim & Harris, 1998). Por outro lado, existe um grupo maior de pessoas que, comparativamente, têm menores chances para o desenvolvimento de neoplasias, mas seus riscos ainda são mais elevados que os da população geral, pois respondem drasticamente à exposição ambiental (Ponder, 1990). Esses são ditos **suscetíveis**, pertencendo ao terceiro oncodeme (Knudson, 1991; Sinha & Caporaso, 1999). Assim, a

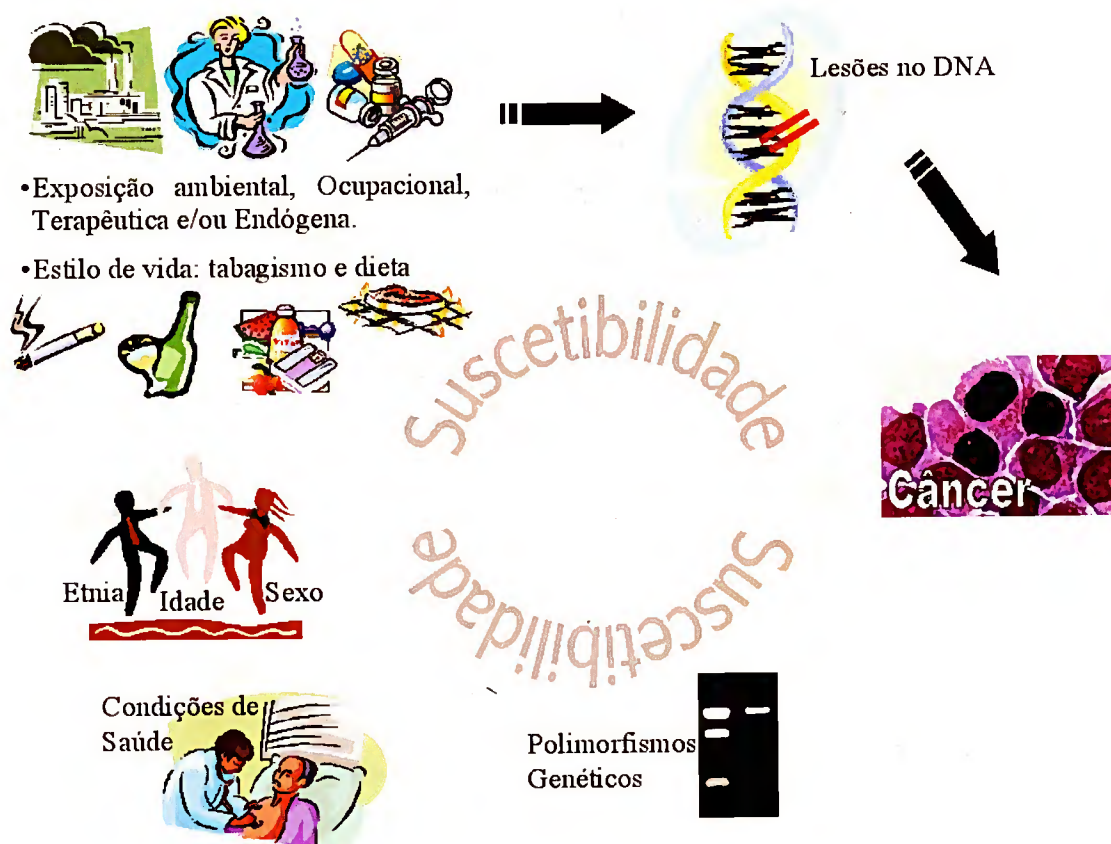


Figura 1. Representação esquemática da influência dos fatores que conferem suscetibilidade no processo de carcinogênese ambiental, iniciando-se com a exposição ambiental, ocupacional, terapêutica e/ou endógena aliadas ou não ao estilo de vida (hábito tabagista e dieta). Os compostos mutagênicos/carcinogênicos presentes interagem com a molécula de DNA, RNA e proteínas e podem causar lesões que, somadas às possíveis alterações em genes críticos (pré-existent ou não), levam ao desenvolvimento do câncer. Sabe-se que toda esta via pode ser influenciada por outras condições tais como etnia, idade, sexo, estado de saúde (doenças crônicas, desnutrição) e ainda por polimorfismos genéticos (modificado de Perera, 1997).

precisa identificação de marcadores de suscetibilidade é de fundamental importância na predição de riscos (Albertini, 1999).

As pesquisas no campo da epidemiologia molecular têm fornecido evidências contundentes da contribuição efetiva do ambiente no surgimento do câncer humano e também sobre as situações de risco fortemente influenciadas pela suscetibilidade genética (Weinberg, 1992; Schork *et al.*, 1998). Tal ramo da ciência alia a metodologia molecular, principalmente a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), os modelos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* e a bioquímica, aos dados obtidos pela epidemiologia clássica, possibilitando não apenas o levantamento rápido dos riscos populacionais, mas também individuais, no surgimento de neoplasias (Kato *et al.*, 1994; Feigelson *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1996). Dessa forma, possibilita a intervenção precoce e a implementação de estratégias eficazes de prevenção, além de fornecer bases para o tratamento das mesmas (Hussaim & Harris, 1998). Para tanto, utiliza-se de biomarcadores como "indicadores sinalizando eventos em amostras ou sistemas biológicos" (Nebert *et al.*, 1996; National Research Council of the National Academy of Sciences, USA, 1997).

Assim sendo, um biomarcador pode ser definido como método, estrutura ou processo que encontra-se na via causal, ou intimamente a ela ligado, entre o momento da exposição e o câncer, em qualquer etapa do processo carcinogênico (Bartsch, 2000). Assim, a presença, a quantidade e o padrão de expressão de determinado biomarcador estão correlacionados com a probabilidade de transformação maligna de uma célula ou tecido (Wogan, 1992).

O Conselho Norte-americano de Pesquisa, definiu três tipos de marcadores disponíveis para os estudos em sistemas biológicos: marcadores de exposição, marcadores de efeito e marcadores de suscetibilidade. Os **marcadores de exposição** fornecem informações sobre a quantidade de xenobióticos (compostos ausentes em sistemas

vivos) a que os indivíduos estão expostos (presença na urina, plasma, saliva). Os **marcadores de efeito** indicam a presença da doença ou de sinais pré-clínicos da mesma, representando momentos isolados do processo que podem ser qualitativa ou quantitativamente avaliados (trocas entre cromátides-irmãs, aberrações cromossômicas, estados hormonais alterados, antígenos tumorais e mutações em oncogenes e genes supressores de tumor). Por sua vez, os **marcadores de suscetibilidade** indicam indivíduos ou populações com diferenças biológicas capazes de afetar a resposta do organismo à agentes ambientais (absorção diferencial de micronutrientes e os polimorfismos nos genes do biometabolismo e de reparo do DNA).

O princípio básico dos marcadores de suscetibilidade reside na diferença interindividual que confere graus de sensibilidade às doenças induzidas pelo ambiente. Esses marcadores podem incluir características genéticas, diferenças no metabolismo ou a capacidade diferencial de um órgão se recuperar de agressões ambientais (Bartsch & Hietanen, 1996; Taningher *et al.*, 1999).

Entre os mais significativos marcadores de suscetibilidade estão as diferenças genéticas na capacidade das células repararem lesões no DNA, causadas por agentes ambientais (Spitz & Bondy, 1993; Kaderlik & Kadlubar, 1995). Um outro tipo relevante de biomarcador de suscetibilidade baseia-se no fato de que muitos compostos mutagênicos/carcinogênicos não são capazes de provocar por si mesmos os efeitos prejudiciais, sendo alterados por enzimas cujas modificações podem aumentar ou diminuir a habilidade dessas substâncias interagirem com as biomoléculas informacionais (Eubanks, 1994; Guengerich, 2000).



II. Biomarcadores de Suscetibilidade e a Metabolização Xenobiótica

Grande parte do conhecimento a respeito da variabilidade genotípica e fenotípica interindividual na regulação dos processos de metabolização xenobiótica teve início a partir de estudos farmacocinéticos (Meyer, 1991; Meyer & Zanger, 1997). A constatação da existência de respostas diferenciais a uma mesma droga ministrada em doses equivalentes e de que alguns desses desvios apresentavam padrão de herança mendeliana simples, fez com que o geneticista alemão Vogel, em 1952, cunhasse o termo farmacogenética (Shields, 1994). A farmacogenética dedica-se, portanto, ao estudo da base genética sobre a resposta não usual do organismo à ação dos medicamentos ou poluentes ambientais (Kalow, 1962).

Um outro conceito relevante é o de **polimorfismo genético** ou seja, traço mendeliano existente numa população em no mínimo dois fenótipos, nenhum dos quais ocorrendo em frequência menor que 1% (Ford, 1940).

Há cerca de vinte anos atrás, a caracterização desses polimorfismos esteve restrita, principalmente, à detecção por eletroforese de variantes enzimáticas sem, contudo, evidenciar sua identidade molecular. Todavia, com a clonagem e o sequenciamento de muitos genes do biometabolismo e a disponibilidade de metodologias com maior sensibilidade para identificação de variantes alélicas ao nível de DNA, tornou-se possível a identificação de inúmeros polimorfismos em diferentes populações (Saiki *et al.*, 1988; Higuchi & Ochman, 1989). Dentre esses, estão aqueles que afetam os níveis de expressão ou a atividade catalítica das enzimas envolvidas, através de diferentes mecanismos moleculares (MacLeod *et al.*, 1997; Meyer & Zanger, 1997). A maioria desses polimorfismos possui relevância clínica, envolvendo enzimas que metabolizam drogas (Hirvonen, 1995), e podem ter

conseqüências diversas. Como exemplo, cabe ressaltar o caso das enzimas que inativam drogas que são terapêutica ou socialmente utilizadas, podem ser observadas reações adversas em indivíduos que apresentam ausência da enzima. Muitos xenobióticos que desempenham papel importante na etiologia de doenças, são ativados ou inativados por enzimas do biometabolismo que podem apresentar versões polimórficas. Assim, dependendo do tipo de reação mediada por essas enzimas, tais polimorfismos poderão conferir vantagem ou desvantagem na suscetibilidade a certas patologias (Daly *et al.*, 1993). A Figura 2 representa alguns desses mecanismos e sua conseqüência no metabolismo de xenobióticos.

Uma vez que a maioria dos agentes mutagênicos/carcinogênicos requer ativação metabólica antes de se ligarem ao DNA, RNA e as proteínas (Rogers, 1994), as variações nos processos de ativação e destoxificação de compostos químicos desempenham papel crucial na tumorigênese ambiental (Bartsch & Hietanen, 1996). Assim, distúrbios no equilíbrio desses processos podem explicar a variabilidade na resposta individual à exposição a tais compostos (Hirvonen, 1995; Anwar *et al.*, 1996). A quantia final efetiva de carcinógenos produzida depende da ação competitiva entre os mecanismos de ativação e destoxificação, envolvendo as enzimas que tomam parte nessas vias bioquímicas da célula (Hayes, 1995).

Desse modo, a variação interindividual na resposta aos agentes xenobióticos, aos quais os indivíduos podem ter sido expostos através da dieta, prescrição terapêutica e/ou ocupação profissional, e os seus efeitos carcinogênicos potenciais são mediados pela predisposição herdada (Vineis, 1995; Wormhoudt *et al.*, 1999). Alguns indivíduos ou subgrupos populacionais, como por exemplo, as diferentes etnias, podem apresentar risco significativamente maior de câncer quimicamente induzido do que a média populacional, devido às diferenças

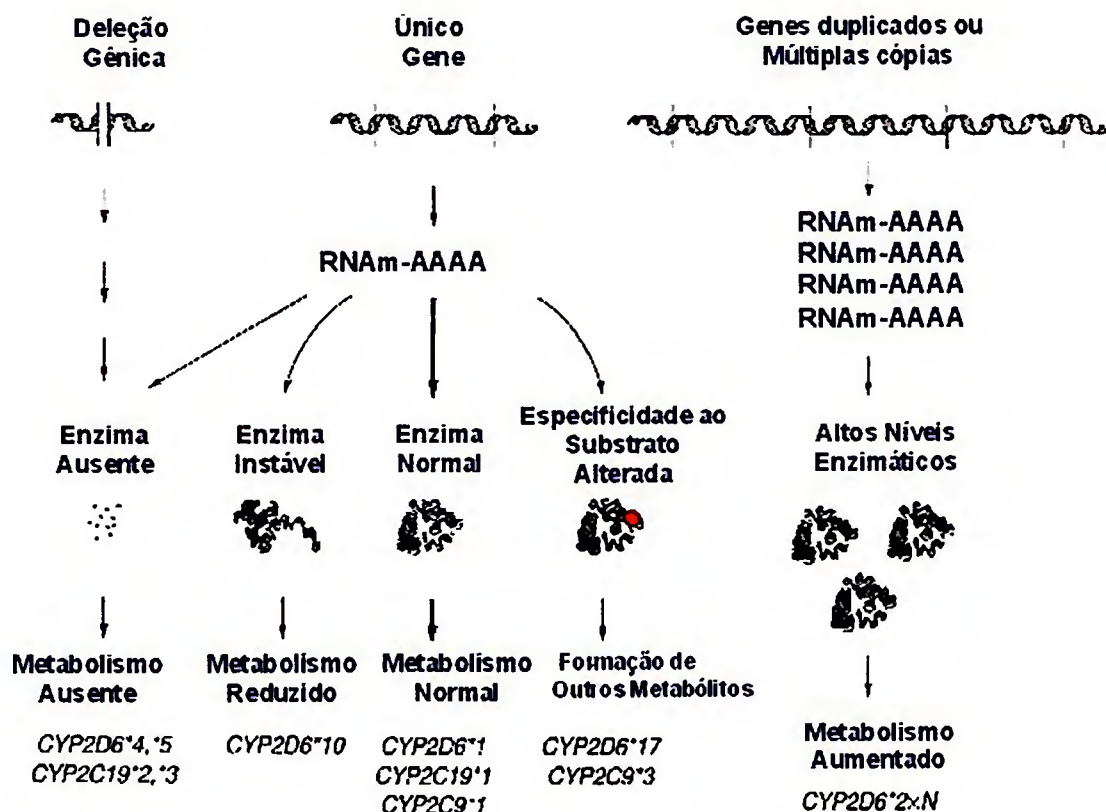


Figura 2. Representação geral de alguns dos principais mecanismos moleculares através dos quais podem ocorrer alterações no metabolismo de xenobióticos. A via de transcrição e tradução, resultando em produção da enzima normal, com metabolismo inalterado, está indicada pelas setas largas. Exemplos de polimorfismos que podem causar produção de enzimas inativas ou ainda ausência das mesmas incluem aqueles resultantes de mutações, deleções gênicas e erros na matriz de leitura. Os polimorfismos que resultam em substituição de aminoácidos podem dar origem a enzimas instáveis ou com sítio ativo alterado (região em vermelho), modificando, assim, a especificidade ao substrato. Além dessas, duplicações sucessivas de genes ativos podem resultar em altos níveis de RNAm e, como consequência, altos níveis enzimáticos, aumentando assim o metabolismo. Exemplos de variantes alélicas resultantes de tais alterações em alguns genes da superfamília P450, estão localizados na parte inferior do diagrama. As barras verticais representam os limites entre os genes e as letras AAAA indicam a cauda poli-A (modificado de Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999).

expressivas nos processos de ativação e destoxificação (Idle, 1991; Gilliland, 1997; Caporaso, 1999).

A maquinaria de metabolização xenobiótica possui dois tipos de enzimas: as de metabolismo oxidativo mediado ou de Fase I e as enzimas conjugadas ou de Fase II. Muitos compostos, tais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), as nitrosaminas e várias drogas medicamentosas, são convertidos à metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas da Fase I, que são principalmente enzimas da superfamília do citocromo P-450 (CYPs).

Dessa forma, através da introdução de um ou mais grupamentos hidroxila ao substrato, um pró-carcinógeno pode tornar-se carcinógeno, como o benzo[a]pireno que é convertido em epóxido de benzo[a]pireno. Em contraponto, as reações da Fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno (glutathione, sulfato, glicose, acetato) através das glutatíon-S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem então como enzimas inativadoras dos produtos da Fase I, convertendo-os a metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção (Umeno *et al.*, 1988; Idle, 1991; Omenn, 1991; Hirvonen, 1993; Persson *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1994; Bois *et al.*, 1995; Kroemer & Eichelbaum, 1995; Raunio *et al.*, 1995).

Assim, o equilíbrio entre as enzimas que aumentam a toxicidade ou inativam os produtos químicos pode conferir sensibilidade individual diferenciada (Albertini, 1999; Wormhoudt *et al.*, 1999). Como consequência dessa variabilidade individual, os modelos de investigação de risco devem considerar a suscetibilidade genética, que torna os indivíduos resistentes ou mais sensíveis à exposição ambiental ou ainda a substratos endógenos, uma vez que tais enzimas também participam do metabolismo de hormônios esteróides e prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio, entre outros (Vineis, 1995).



II.1. A Superfamília Citocromo P450

A superfamília de genes do citocromo P450 representa uma das principais classes de biotransformação da Fase I, através de suas mais de 500 isoenzimas (Lang & Pelkonen, 1999). Tais monoxigenases são divididas em famílias baseadas em sua relação dentro da escala evolutiva, que é determinada pelo grau de homologia entre os genes e, posteriormente, entre as seqüências de aminoácidos das proteínas (Nebert & Gonzalez, 1987; Gonzalez, 1989; Gonzalez, 1990). Essa gama de enzimas participa tanto da biossíntese como da degradação de esteróides, vitaminas, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas, feromônios e metabólitos vegetais (Wolf, 1986). Metabolizam, ainda, inúmeras drogas e carcinógenos/mutágenos químicos, entre outros poluentes ambientais denominados, em seu conjunto, como xenobióticos (Guengerich, 1988).

Estimados em cerca de 250 mil compostos no total, os xenobióticos são substratos potenciais para as enzimas P450, se não indutores ou inibidores das mesmas (Guengerich, 1992). Essas reações ocorrem, principalmente, no fígado, contudo existe expressão não hepática, em menor grau, por todo o organismo incluindo intestino, pulmão e rim, entre outros (Rogers, 1994). Um aspecto curioso dessa superfamília está no fato de que as CYPs podem não apenas catalisar diferentes reações oxidativas, como também metabolizar uma quantidade impressionante de xenobióticos lipofílicos (Lin & Lu, 1998).

As enzimas da superfamília citocromo P450 encontram-se presentes em animais, plantas, leveduras e bactérias e, somente em mamíferos, calcula-se que estejam funcionalmente presentes mais de 200 dessas proteínas. Todos esses genes evoluíram a partir de um ancestral comum, em torno de 2,5 bilhões de anos atrás e o mecanismo que



contribuiu para tal divergência foi, provavelmente, a interação entre plantas e animais (Gonzalez & Nebert, 1990). De acordo com tal hipótese, durante o período em que os animais começaram a se alimentar de plantas, surgiram as toxinas vegetais como proteção. Consequentemente, elas proporcionaram a adaptação animal, com a manutenção de novos genes que metabolizavam a gama de diversos produtos vegetais em constante evolução (Gonzalez & Gelboin, 1994; Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999).

Apesar de amplamente aceita, a hipótese da interação entre animais e plantas não elucida questões essenciais tais como aquelas referentes à origem desses locos polimórficos e à participação do ambiente nas frequências distintas dos inúmeros alelos entre as etnias. Sabe-se que um grande número de duplicações em genes P450 ocorreu quando os animais ocuparam a superfície terrestre. Entretanto, acredita-se que, atualmente, tal fenômeno não esteja ocorrendo em resposta aos carcinógenos ambientais, uma vez que tais neoplasias representam uma seleção pós-período reprodutivo.

Estima-se que no genoma humano existam em torno de 60 a 100 genes codificadores de enzimas P450, sendo que cerca de 20 deles estão envolvidos na codificação de enzimas que metabolizam compostos exógenos (Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999). Devido à importância do seu papel na ativação metabólica de inúmeros procarcinógenos, extensiva pesquisa tem sido concentrada na relação entre a distribuição de variantes polimórficas das diferentes enzimas de P450 e a suscetibilidade ao câncer, tendo sido avaliados principalmente os genes *CYP1A1*, *CYP2D6* e *CYP2E1*.

De fato, diferenças individuais na expressão das isoformas de P450 causam variação marcante no nível de carcinógenos ativos na célula. Sabe-se, ainda, que a expressão e atividade dessas enzimas são reguladas por mecanismos genéticos distintos. Além disso,

uma vez que muitas delas têm expressão induzida, tanto o agente indutor como o mecanismo molecular de indução, podem variar, dificultando qualquer generalização. Muitas das substâncias que agem como indutoras são, em realidade, substratos para a enzima P450 que induzem, estimulando assim seu próprio metabolismo bem como o de qualquer outro composto que seja substrato da mesma enzima. Além disso, muitos compostos que induzem as enzimas P450 podem também ativar uma ou mais enzimas da Fase II (Rogers, 1994).

Os polimorfismos de P450 e a suscetibilidade ao câncer podem estar associados ainda, pelo fato dessas isoenzimas participarem também da transformação de compostos endógenos relevantes nos processos de transformação da célula iniciada até o estágio maligno indiferenciado (Rannug *et al.*, 1995).

II.1.1. O gene *CYP2E1*

O gene *CYP2E1*, localizado em 10q24-3-qter, tem a transcrição induzida pelo etanol e seu produto (dimetilnitrosamina desmetilase) está envolvido no metabolismo oxidativo do próprio etanol, bem como de inúmeros carcinógenos ambientais como compostos hidrofílicos de baixo peso molecular, benzeno, cloreto de vinila e as nitrosaminas, entre elas a NNK (4-metilnitrosamino-1-3piridil-butanona), encontradas na fumaça do cigarro (Guengerich *et al.*, 1991; Raunio *et al.*, 1995). Outros xenobióticos incluem drogas medicamentosas (agentes anestésicos, isoniazida, tamoxifeno) e não medicamentosas, como a cocaína (revisto em Lieber, 1997).

Assim, a indução do *CYP2E1* pelo etanol pode interferir na ativação de carcinógenos, que por sua vez podem atuar promovendo neoplasmas em diversos órgãos (Guengerich *et al.*, 1991; Persson *et al.*,



1995). A enzima CYP2E1 encontra-se presente em vários tecidos, entre eles os rins e os pulmões, contudo sua expressão mais significativa é verificada no tecido hepático (Daly *et al.*, 1994).

O polimorfismo do gene *CYP2E1* tem sido considerado como um dos indicadores potenciais da suscetibilidade ao câncer associado ao citocromo P450. Com a utilização de enzimas de restrição (*Pst*I, *Rsa*I, *Dra*I, *Msp*I, *Taq*I) foram descritos diferentes alelos para o *CYP2E1* (McBride *et al.*, 1987; Hayashi *et al.*, 1991; Uematsu *et al.*, 1991). Dentre eles, os mais extensivamente estudados são o polimorfismo *Pst*I ($^{-1019}\text{C}\rightarrow\text{T}$), localizado na região promotora do gene, e o polimorfismo *Dra*I ($^{7766}\text{A}\rightarrow\text{T}$) do íntron 6, que são responsáveis pelos alelos CYP2E1*5B e CYP2E1*6, respectivamente (Tabela 1). Diferentes estudos em populações européias, norte-americanas e asiáticas sugerem que esses polimorfismos estão ligados, ou seja, todos os indivíduos com o polimorfismo *Pst*I também exibem o alelo mutante *Dra*I (Watanabe *et al.*, 1990; Persson *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1995; Hildesheim *et al.*, 1995). Contudo, outros autores mostraram que a presença de um alelo *Dra*I não implica necessariamente em um alelo *Pst*I correspondente em populações sul e norte-americanas, japonesas e afro-americanas (Kato *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1998; Rossit *et al.*, 2001).

O alelo CYP2E1*5B foi relacionado aos níveis aumentados de ativação transcricional do gene com conseqüente super expressão da proteína CYP2E1 (Hayashi *et al.*, 1991; Tsutsumi *et al.*, 1994a). Uma vez que o polimorfismo *Dra*I desse gene não causa alteração estrutural ou funcional na enzima correspondente, seus efeitos devem estar antes relacionados à expressão da mesma. Embora não tenham sido verificadas diferenças nos níveis de expressão do RNA mensageiro ou no metabolismo hepático de compostos CYP2E1 específicos (Uematsu *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1995; Carriere *et al.*, 1996),

Tabela 1: Principais características do alelo CYP2E1*1 e das variantes alélicas CYP2E1*5B e CYP2E1*6.

Alelo Selvagem CYP2E1*1		
Alelo raro	CYP2E1*5B	CYP2E1*6
Mutação	-1019C → T	7766A → T
Enzima de reconhecimento	PstI (+) ou RsaI (-)	DraI (+)
Efeito funcional	Muda a ativação transcricional do gene ^a	Associado à maior formação de adutos de DNA ^b

^aHayashi *et al.*, 1991 e Tsutsumi *et al.*, 1994a.

^bKato *et al.*, 1995.

foram detectados níveis aumentados de adutos de DNA em portadores dessa variante alélica (Kato *et al.*, 1993; 1995).

Em alguns estudos, tais alelos exibem associação epidemiológica ao risco aumentado para diversas lesões como a cirrose hepática alcoólica (Tsutsumi *et al.*, 1994b; Pirmohamed *et al.*, 1995), hepatocarcinoma (Yu *et al.*, 1995; Ladero *et al.*, 1996) e os cânceres de pulmão (Uematsu *et al.*, 1991; 1994; El-Zein *et al.*, 1997a; El-Zein *et al.*, 1997b; Wu *et al.*, 1997; LeMarchand *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999), do trato aerodigestivo superior (Bouchardy *et al.*, 2000) e coloretal (Kiss *et al.*, 2000). Contrariamente, outros autores sugerem ausência dessa correlação (Hirvonen *et al.*, 1993; Sugimura *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1995; Ladero *et al.*, 1996; Savolainen *et al.*, 1997; Katoh *et al.*, 1999; Persson *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2000; Butler *et al.*, 2001) ou ainda, que tais variantes alélicas exercem efeito protetor (Lucas *et al.*, 1996; Le Marchand *et al.*, 1998; Nishimoto *et al.*, 2000).

Essas contradições aparentes podem ser reflexo da distribuição étnica diferencial para os alelos CYP2E1*5B e CYP2E1*6 ou

ainda resultantes das baixas frequências já observadas para os mesmos, em algumas populações.

II.2. As Glutatioão-S-transferases

Dentre as enzimas denominadas de Fase II, envolvidas nos processos de destoxificação, as glutatioão transferases desempenham um papel predominante no metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofilicos reativos. Tais reações ocorrem tanto pela conjugação com as glutathionas como também por ligação não covalente com vários agentes xenobióticos. Entre esses, estão os carcinógenos e drogas citotóxicas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na dieta alimentar e na fumaça do cigarro e vários pesticidas e poluentes ambientais (van Poppel *et al.*, 1992; Brockmöller *et al.*, 1993; Strange *et al.*, 1999).

Esses substratos eletrofilicos reativos podem ser resultantes ainda, de processos endógenos, iniciados, por exemplo, na respiração e em processos inflamatórios, ou ainda por radiação ionizante com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo radicais superóxido e hidroxí (Lang & Pelkonen, 1999). Desse modo, é possível concluir que tais enzimas desempenham uma função protetora contra os compostos carcinogênicos/mutagênicos endógenos e exógenos (Ketterer, 1988; Coles & Ketterer, 1990; Tanningher *et al.*, 1999). Vários quimioterápicos são também substratos para as GSTs e, neste caso, sua conjugação pode levar a uma diminuição do efeito esperado e a manifestação de resistência celular a esses efeitos (Wormhoudt *et al.*, 1999).

Estima-se que existam pelo menos 20 GSTs na espécie humana, estando tais enzimas presentes na maioria dos organismos vivos, incluindo as bactérias, leveduras, fungos e plantas (Mannervik *et al.*, 1985; Buetler & Eaton, 1992). A família das GSTs é composta por



proteínas diméricas solúveis e multifuncionais que podem conjugar-se com moléculas eletrofílicas tornando-as menos tóxicas, já que catalisam o ataque nucleofílico da glutathione sobre esses compostos (Pickett & Lu, 1989; Rushmore & Pickett, 1993; Hayes & Pulford, 1995; Persson *et al.*, 1995). Sua maior concentração é observada no fígado, contudo, encontram-se em menores concentrações em outros órgãos, como pulmões e intestino delgado.

As GSTs humanas foram agrupadas, com base em seu ponto isoelétrico, em quatro classes: alfa (GST2, GSTA), mu (GST1, GSTM1), pi (GST3, GSTP) e teta (GSTT1), cada uma dessas classes contendo produtos de diferentes locos gênicos (Board *et al.*, 1990; Pemble *et al.*, 1994; Hayes & Pulford, 1995; Tan *et al.*, 1995). Encontram-se descritos na espécie humana três polimorfismos para essa família, nos genes codificadores das enzimas GSTM1, GSTT1 e GSTP1.

O gene *GSTM1*, localizado no cromossomo 1, é polimórfico na população humana, com dois alelos funcionais (GSTM1*A e GSTM1*B) e um alelo com atividade nula (GSTM1*0), sendo que aqueles funcionais apresentam a mesma eficácia metabólica (Widersten *et al.*, 1991).

Do mesmo modo que o gene *GSTM1*, o *GSTT1*, localizado no cromossomo 22, também é polimórfico na população humana, apresentando fenótipo nulo por deleção (alelo GSTT1*0). A deleção em homozigose do gene *GSTM1* é observada em taxas médias de 50%, variando de 20% em um grupo indígena brasileiro (Arruda *et al.*, 1998), a 88% em habitantes da ilha de Samoa, na Polinésia (Lin *et al.*, 1994). Para o genótipo *GSTT1* nulo, essa variação foi de 10% em uma população sueca (Warholm *et al.*, 1995), a cerca de 60% em chineses e coreanos (Nelson *et al.*, 1995).

Uma vez que essas enzimas catalisam a conjugação da glutathione com xenobióticos, sua ausência poderia reduzir a capacidade

de um organismo em destoxificar metabólitos reativos. Nessa direção, diversos estudos têm detectado uma frequência elevada do genótipo nulo para *GSTM1* em indivíduos portadores de diferentes neoplasias, tais como câncer de pulmão (Alexandrie *et al.*, 1994; Malats *et al.*, 2001), gástrico (Kato *et al.*, 1996; Saadat & Saadat, 2001), laringe (Jahnke *et al.*, 1996; Hanna *et al.*, 2001), pele (Heagerty *et al.*, 1994) e de bexiga (Brockmüller *et al.*, 1994; Anwar *et al.*, 1996; Brockmüller *et al.*, 1996; Abdel-Rahman *et al.*, 1998). Uma associação positiva foi observada para o genótipo *GSTT1* nulo e o risco de desenvolvimento do câncer colorretal (Deakin *et al.*, 1996) e do carcinoma basocelular cutâneo (Lear *et al.*, 1996). Uma frequência aumentada de portadores do genótipo nulo para ambos os genes também foi descrita em tumores de cabeça e pescoço (Cheng *et al.*, 1999) e laringe (Jourenkova-Mironova *et al.*, 1999), ambos associados ao fumo.

III. Biomarcadores de Suscetibilidade e o Reparo do DNA

Os sistemas de reparo do DNA são responsáveis pela manutenção da integridade do genoma, tanto em células somáticas como nas germinativas, uma vez que atuam minimizando erros no processo de replicação, removendo danos causados à molécula de DNA e reduzindo os rearranjos deletérios surgidos por recombinação anômala. Tais lesões, se não reparadas, podem interferir no metabolismo do DNA, incluindo sua replicação, transcrição e recombinação, bem como em outras funções celulares importantes, tais como a regulação do ciclo e da divisão celular (Benhamou & Sarasin, 2000). Desse modo, o reparo constitui evento crítico na proteção do genoma contra as mutações que predisõem ao câncer e/ou doenças genéticas (Hartwell & Weinert, 1989; Sancar, 1995).

É muito provável, da mesma forma que outros traços fenotípicos, que a variação individual na capacidade de reparo do DNA



seja geneticamente determinada. Sabe-se que alguns indivíduos apresentam um risco muito alto de desenvolver o câncer devido as variações herdadas em genes, cujos produtos estão envolvidos nos processos de reparo e metabolismo do DNA (Bohr, 1995; Ma *et al.*, 1995; Tlsty *et al.*, 1995). Os primeiros indícios de que deficiências nos processos de reparo do DNA estejam relacionadas ao processo maligno, foram obtidos em pacientes com xeroderma pigmentoso, uma doença familiar rara, de herança autossômica recessiva (Cleaver & Kraemer, 1995). Mais recentemente, outra evidência dessa associação foi descrita pela constatação da deficiência no reparo de "mismatch" em famílias afetadas pelo câncer de cólon não poliposo hereditário (Kolodner, 1995). Embora tais estudos tenham conduzido à identificação de genes envolvidos no processo carcinogênico, a grande maioria das neoplasias não é familiar e sim, esporádica (Renan, 1997; Szabo & King, 1997).

De fato, a diminuição na capacidade de reparo do DNA, que tem sido observada em frequências polimórficas na população geral, não poderia ser explicada pelo pequeno número de indivíduos portadores de síndromes, já identificadas, de deficiência nos mecanismos de reparo (Shen *et al.*, 1998). Inúmeras linhas de pesquisa sugerem que a capacidade diferencial de reparo do DNA, entre os indivíduos, reflete diferenças genéticas e tal variação apresenta características compatíveis àquelas esperadas para os chamados genes ou biomarcadores de suscetibilidade ao câncer. Tais características incluem a codificação de proteínas que exibem função reduzida, ao invés de completa incompetência funcional e ainda a existência, na população geral, de alelos polimórficos com penetrância incompleta (Mohrenweiser & Jones, 1998).

Com base nessas informações, Shen *et al.* (1998) iniciaram o sequenciamento de genes codificadores de proteínas envolvidas nas vias de reparo, na tentativa de estimar a ocorrência



dessas variações e, posteriormente, fornecer bases para futuras pesquisas no campo da epidemiologia molecular que correlacionem polimorfismos específicos à capacidade diminuída de reparo e à suscetibilidade individual ao câncer. Seus resultados possibilitaram a identificação de quinze alelos polimórficos, cujas frequências variaram de 0,02 a 0,40, nos exons de nove genes investigados. Posteriormente, outros autores reportaram diferentes polimorfismos em genes de reparo do DNA (Fan *et al.*, 1999; Butkiewicz *et al.*, 2000). A maioria desses polimorfismos ocorre em seqüências evolutivamente conservadas e vários resultam em substituição de aminoácidos, o que sugere seu possível papel na manutenção da função protéica (Shen *et al.*, 1998).

III.1. O gene *XRCC1*

Dentre os polimorfismos já detectados em genes de reparo, encontram-se entre os mais recentemente estudados, aqueles do gene *XRCC1*, cuja proteína foi identificada por restabelecer a capacidade de reparo na linhagem mutante de células de ovário de hamster chinês (CHO) EM9 (Thompson *et al.*, 1985; 1990; revisto em Thompson & West, 2000).

Esse gene localiza-se no braço longo do cromossomo 19 (Mohrenweiser *et al.*, 1989) e codifica a proteína *XRCC1* (X-ray cross-complementing group 1 protein) que forma um complexo com outras enzimas envolvidas no reparo de quebras na fita simples do DNA por excisão de bases (BER): DNA ligase III, DNA polimerase β (β -Pol) e poli(ADP-ribose)polimerase (PARP) (Caldecott *et al.*, 1996; Kubota *et al.*, 1996).

A DNA polimerase β -Pol é responsável pela síntese de DNA em sítios abásicos que foram clivados em sua extremidade 5' (Singhal *et al.*, 1995) e realiza síntese de DNA em pequenas falhas de poucos nucleotídeos (Singhal *et al.*, 1993). A DNA ligase III efetua a

ligação do complexo à extremidade da fita simples clivada enquanto a proteína PARP reconhece regiões clivadas tanto em fita simples como dupla, interagindo com as mesmas (Trucco *et al.*, 1999).

Cada uma dessas proteínas une-se a XRCC1 em domínios protéicos específicos (Figura 3). A interação com β -Pol ocorre no domínio N terminal (NTD) de XRCC1, formado pelos resíduos dos aminoácidos 1 até 183 (Kubota *et al.*, 1996; Marintchev *et al.*, 1999). A DNA ligase III, por sua vez, une-se a XRCC1 através de um domínio C terminal, chamado BRCT-II (breast cancer susceptibility protein-1 homolog C-terminal), anteriormente identificado em mais de 50 outras proteínas que atuam no “checkpoint” do ciclo celular e são sintetizadas mediante danos ao DNA (Bork *et al.*, 1997; Dulic *et al.*, 2001). A heterodimerização da DNA ligase III com XRCC1 mostrou-se necessária à manutenção dos níveis da enzima DNA ligase III ativa na célula (Caldecott *et al.*, 1995; Capelli *et al.*, 1997; Thornton *et al.*, 2001). A união entre XRCC1 e PARP ocorre através de um único domínio central denominado BRCT-I e dessa interação resulta a redução da atividade de PARP, culminando com seu desligamento do sítio do DNA danificado (Masson *et al.*, 1998).

Uma vez que a formação desse complexo prescinde da proteína XRCC1, inicialmente pensou-se que sua função estivesse restrita à organização das proteínas envolvidas no BER e não propriamente como participante ativa desse processo (Rice, 1999). Contudo, recentemente Marintchev *et al.* (1999) demonstraram que a XRCC1 se liga diretamente ao DNA clivado, bem como ao complexo β -Pol - DNA clivado, sugerindo seu envolvimento de modo independente no reconhecimento de danos à molécula de DNA.

Atualmente, sabe-se que o papel da XRCC1 verifica-se em diversas etapas do processo de reparo e que, em todas elas, a atuação dessa proteína otimiza a eliminação das quebras em fitas simples



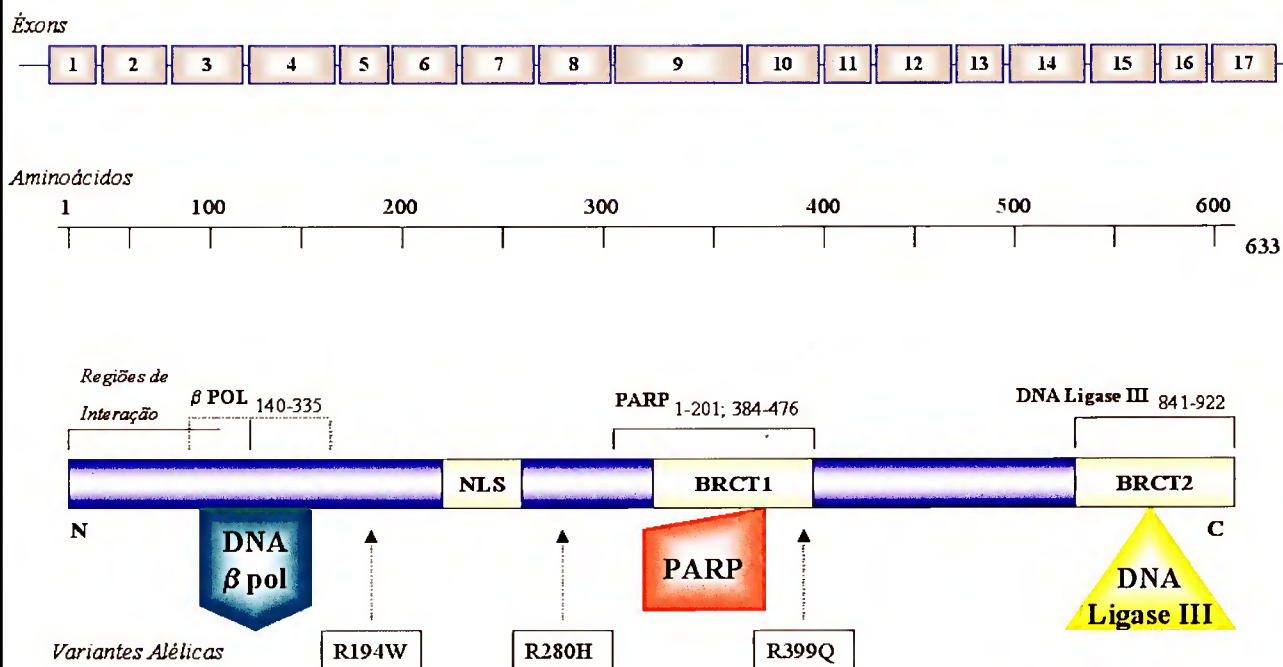


Figura 3. Representação esquemática da proteína e do gene *XRCC1* mostrando as regiões de interação com as proteínas β -Pol, PARP e DNA ligase III, bem como a localização das variantes alélicas R194W, R280H e R399Q (esquema em escala, modificado de Thompson & West, 2000).

do DNA. Tais funções incluem a estabilização da DNA ligase III (Caldecott *et al.*, 1994); a coordenação do BER através da junção das enzimas envolvidas no mesmo (Kubota *et al.*, 1996; Caldecott *et al.*, 1996); a detecção de quebras geradas por ação química, enzimática ou física (Marintchev *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2001); o controle da atividade da β -Pol (Kubota *et al.*, 1996; Marintchev *et al.*, 1999); o favorecimento do reparo de quebras em fita simples específico da fase S do ciclo celular (Taylor *et al.*, 2000) e, possivelmente, a regulação da PARP (Masson *et al.*, 1998).

O sequenciamento de DNA realizado por Shen *et al* (1998), permitiu a identificação de três polimorfismos em regiões codificadoras nos códons 194(Arg $\rightarrow$ Trp), 280 (Arg $\rightarrow$ His) e 399 (Arg $\rightarrow$ Gln), cujas frequências foram de 0,25, 0,08 e 0,25, respectivamente. Os polimorfismos nas regiões R194W (exon 6) e R280H (exon 9) codificam parte da região de ligação entre os domínios da β -Pol e PARP, sendo que a substituição do aminoácido arginina para glicina ocorre em um core hidrofóbico da proteína. A substituição da arginina pela glicina, ocasionada pelo polimorfismo no códon 399 do exon 10, situa-se na extremidade C terminal do domínio tipo BRCT, onde ocorre a ligação da PARP (Figura 3).

O fato de que outras substituições em um único aminoácido, em ambos os domínios de interação (BRCT e β -Pol), provaram resultar em completa perda da função protéica em hamster (Shen *et al.*, 1998) e de que a ausência de atividade de XRCC1 é uma condição letal ao embrião de camundongos (Tebbs *et al.*, 1999), conduziram à conclusão de que esses polimorfismos não causam a completa perda da função protéica (Shen *et al.*, 1998). Contrariamente, codificam alterações de aminoácidos não conservativas em resíduos que são idênticos em hamsters, camundongos e humanos, o que sugere sua relevância funcional, apesar de serem desconhecidas suas



conseqüências para a estrutura e função protéicas (Lamerdin *et al.*, 1995).

A partir da publicação da identidade molecular do gene *XRCC1*, diferentes grupos iniciaram pesquisas, *in vivo* e *in vitro*, buscando determinar o possível impacto dos mesmos no BER e, conseqüentemente, na carcinogênese humana. Entre essas encontram-se os estudos de caso-controle que, através da metodologia de PCR-RFLP, avaliaram as freqüências das variantes alélicas do gene *XRCC1* em diferentes lesões e populações humanas (Tabela 2). Apenas um trabalho pôde demonstrar a associação do polimorfismo no códon 280 do gene *XRCC1* à suscetibilidade aumentada ao câncer de pulmão em indivíduos etilistas (Ratnasinghe *et al.*, 2001), enquanto outros autores não puderam detectar tal correlação nos cânceres de esôfago (Lee *et al.*, 2001) ou bexiga (Stern *et al.*, 2001). Por outro lado, três estudos em diferentes populações (norte-americana, egípcia e chinesa) e neoplasias (câncer de cabeça e pescoço, colorectal e gástrico) sugeriram que o polimorfismo no códon 194 confere risco aumentado no desenvolvimento neoplásico (Sturgis *et al.*, 1999; Abdel-Rahman *et al.*, 2000a; Shen *et al.*, 2000).

Contudo, o polimorfismo mais freqüentemente referido como possível marcador de suscetibilidade em diferentes lesões, tanto malignas como pré-malignas, é aquele do códon 399 do gene *XRCC1* (Tabela 2). Recentemente, Lee *et al.* (2001) puderam detectar suscetibilidade aumentada ao câncer de esôfago entre indivíduos abusadores de álcool, portadores da variante alélica desse códon. Outras lesões, também correlacionadas, incluem os cânceres de mama e pulmão, os carcinomas gástrico e colorectal e o câncer de cabeça e pescoço (Sturgis *et al.*, 1999; Duell *et al.*, 2001; Divine *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2000; Abdel-Rahman *et al.*, 2000a) (Tabela 2).

Tabela 2. Risco do câncer associado aos polimorfismos do gene XRCC1 em diferentes lesões e populações humanas.

Publicação	n	População	Lesão	Códons		
				194	280	399
Lee <i>et al.</i> (2001)	105	Taiwanesa	Câncer esofágico	=	=	+A
Duell <i>et al.</i> (2001)	639	Norte-americana	Câncer de mama	=	NA	+B
Matullo <i>et al.</i> (2001)	124	Italiana	Câncer de bexiga	NA	NA	=
Stern <i>et al.</i> (2001)	235	Norte-americana	Câncer de bexiga	-	=	-
Ratnasinghe <i>et al.</i> (2001)	108	Norte-americana	Câncer de pulmão	-	+A	=
Divine <i>et al.</i> (2001)	172	Norte-americana	Câncer de pulmão	NA	NA	+
Shen <i>et al.</i> (2001)	188	Chinesa	Câncer gástrico	+	NA	+
Abdel-Rahman <i>et al.</i> (2000a)	48	Egípcia	Carcinoma coloretal	+	NA	+
Sturgis <i>et al.</i> (1999)	203	Norte-americana	Câncer de cabeça e pescoço	+	NA	+

+: risco aumentado

=: nenhum efeito

-: sugestão de risco reduzido

NA: não avaliado

A: Pacientes consumidores de álcool

B: Negróides ou ascendência negróide

Dada a complexidade da atuação da XRCC1 no BER, são necessários estudos adicionais que avaliem o significado funcional dos polimorfismos moleculares detectados e de suas consequências nas vias bioquímicas da célula. Para tanto, encontram-se em andamento diferentes ensaios, que deverão fornecer subsídios para o entendimento dos resultados obtidos, bem como para o direcionamento de pesquisas futuras, que possam resultar na inclusão dos mesmos no grupo dos biomarcadores de suscetibilidade às doenças humanas.

IV. Polimorfismos em Genes do Biometabolismo e de Reparo do DNA Segundo a Etnia

Para diversos genes do biometabolismo e outros envolvidos no reparo do DNA, foram descritas variações nas frequências de seus alelos polimórficos, segundo a origem étnica da população considerada.

Os alelos CYP2E1*5B e CYP2E1*6, por exemplo, ocorrem em maior frequência em populações asiáticas, quando comparados aos caucasóides americanos ou europeus e afro-americanos (Kato *et al.*, 1992; Persson *et al.*, 1993; Stephens *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1995; LeMarchand *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 1999). O genótipo nulo do gene *GSTM1* é observado em cerca de 50% da população caucasóide de diferentes países, enquanto que tal polimorfismo foi identificado em 20% de uma população de ameríndios brasileiros (Arruda *et al.*, 1998) e em 27,6% de afro-americanos (Chen *et al.*, 1996). Os alelos polimórficos 194Trp e 399Gln do gene *XRCC1*, por sua vez, apresentaram frequências distintas em uma população asiática (Lunn *et al.*, 1999), comparada àquelas obtidas para populações caucasóides, afro-americanas e egípcias (Lunn *et al.*, 1999; Abdel-Rahman *et al.*, 2000a).

O Brasil foi inicialmente colonizado por portugueses no século XVI, período em que teve início a miscigenação entre colonizadores e ameríndias nativas. Posteriormente, com o tráfico de escravos, o negro passou a ser o principal grupo de miscigenação com o branco. Somente nos séculos XIX e XX, o país passou a receber imigrantes de diversas nacionalidades, principalmente européias, mas também asiáticas e do oriente médio. Hoje, o Brasil é um país altamente miscigenado e apresenta intensa heterogeneidade entre suas diferentes regiões (Salzano & Freire-Maia, 1967). Essa heterogeneidade é devida ao padrão peculiar de colonização dessas regiões, uma vez que variou o número de indivíduos que compuseram o estoque genético de cada grupamento étnico parental. A região Norte, por exemplo, é a que exhibe a maior contribuição ameríndia, enquanto que no Sul do país é observada a maior proporção de caucasóides (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). O padrão regional de miscigenação foi consideravelmente alterado pelas correntes de migração interna, fazendo da região Sudeste o principal destino de grande contingente desses imigrantes. Portanto, a população do Sudeste brasileiro apresenta características que se assemelham às do Brasil como um todo.

Assim considerando-se, e pela sugestão de que os genes do biometabolismo e do reparo de DNA exibem diferenças étnicas e ainda, por serem escassas as informações sobre polimorfismos nesses genes na população brasileira, torna-se imprescindível o estudo de polimorfismos genéticos em populações de diferentes regiões brasileiras, a fim de caracterizá-las.



V. OBJETIVOS

São objetivos específicos deste projeto:

- 1- determinar e comparar a frequência de alelos polimórficos dos genes do biometabolismo *GSTT1*, *GSTM1*, *CYP2E1* em uma população do Norte e outra do Sudeste do Brasil;
- 2- determinar as frequências de alelos polimórficos do gene de reparo do DNA *XRCC1* em uma população-referência do Sudeste do Brasil;
- 3- determinar as frequências de alelos polimórficos do gene *XRCC1* em indivíduos portadores de cirrose hepática alcoólica;
- 4- investigar se os polimorfismos no gene *XRCC1*, associados ou não a variáveis ambientais, podem ser considerados marcadores de risco para a cirrose alcoólica na população investigada.



Suscetibilidade Genética, Biometabolismo e o Câncer

Capítulo Dois

Revista da



Sociedade Brasileira de Cancerologia

DEPARTAMENTO DE CANCEROLOGIA DA ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA

Ano III • N.º 10 • 2.º Trimestre de 2000

ISSN 1415-6725



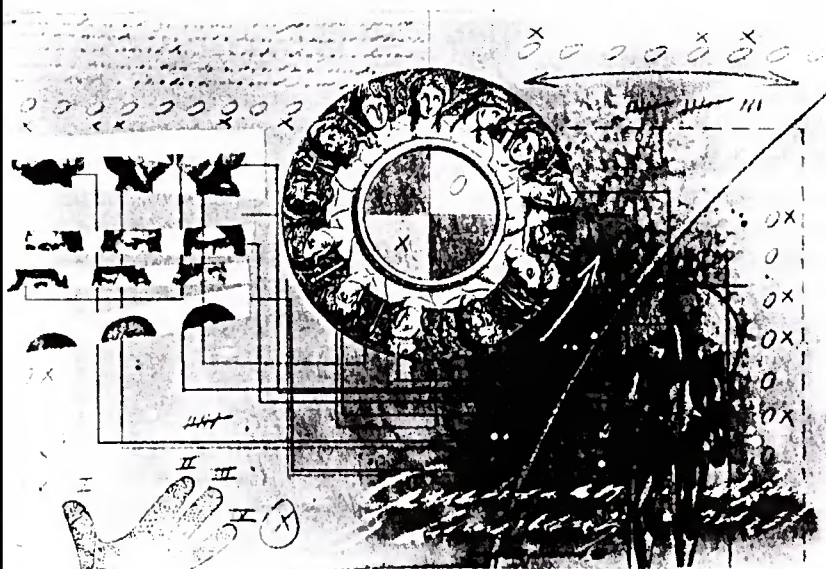
THORANDINI © 2000

50
ANOS

Ciência Básica

Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer

Andréa Rossit, Nívea D. T. Conforti Froes



Further analysis will contribute to the understanding of these genes in human carcinogenesis.

Key-words: Genetics, Molecular epidemiology, Drug metabolism

Introdução

"O que é alimento para uns,
é para outros amargo veneno"

Lucrecius

Durante as três últimas décadas foi possível o delineamento da biologia e patologia do câncer. A hipótese de que o processo carcinogênico é composto por múltiplas etapas, nas quais um conjunto de eventos contribui para a transformação celular e subsequentes estágios malignos, é hoje amplamente aceita. Neste contexto, através da estimativa, caracterização e organização da informação genética, o papel atribuído aos fatores genéticos envolvidos na tumorigênese evoluiu rapidamente. Atualmente, com o Projeto Genoma Humano e, mais recentemente, com o Projeto Genoma Ambiental¹, espera-se que a compreensão da suscetibilidade genética e da interação entre os fatores genético e ambiental esclareça e viabilize novas estratégias de prevenção e tratamento da doença².

Tal avanço reflete a preocupação política, social e científica frente a este problema de saúde pública, já que o câncer representa importante causa de mortalidade e morbidade mundial, sendo responsável pela morte anual de 104.000 pessoas no Brasil, 560.000 nos Estados Unidos e

Resumo: Estima-se que grande parte das neoplasias resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo a contribuição exclusivamente genética responsável por apenas 5% de todos os tumores. A fração restante pode ser atribuída a fatores ambientais que atuam em conjunto com a suscetibilidade genética. Alguns indivíduos ou subgrupos podem apresentar risco aumentado de desenvolver o câncer, devido às diferenças no biometabolismo. O estudo das variações na capacidade de metabolização de xenobióticos já identificou inúmeros polimorfismos genéticos, sendo a maioria desses de relevância clínica. Avaliações subsequentes deverão fornecer subsídios para o melhor entendimento do papel dos genes "biometabolizadores" na carcinogênese humana.

Palavras Chaves: Genética, Epidemiologia Molecular, Biometabolismo

Abstract: Most cancers result from the interaction of genetics and the environment. Genetic factors by themselves are thought to explain only about 5% of all cancer. The remainder can be attributed to external, environmental factors that act in conjunction with genetic susceptibility. Some individuals or subgroups can be at higher risk for cancer because of their metabolism differences. The xenobiotic metabolizing enzymes studies have already identified several genetic polymorphisms with clinical relevance.

de 6, 6 milhões em todo o mundo^{3,4}. A maioria das neoplasias é, teoricamente, passível de prevenção - uma vez que achados epidemiológicos apontam um grande número de fatores etiológicos ambientais, tais como a exposição esporádica ou sequencial a carcinógenos químicos, radiação ionizante e não ionizante e os estados inflamatórios crônicos (bacterianos, virais ou parasitários). O estilo de vida, particularmente o hábito tabagista e a dieta, somam-se aos agentes causadores passíveis de controle, constituindo importante alvo das campanhas de prevenção⁵. Além destes, fatores como etnia, sexo, idade e status nutricional e de saúde, também influenciam as taxas de incidência e mortalidade por câncer³.

Estima-se, portanto, que grande parte das neoplasias resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo a contribuição exclusivamente genética responsável por apenas 5% de todos os tumores. A fração restante pode ser atribuída a fatores ambientais "externos" que atuam em conjunto com a suscetibilidade genética (Figura 1)⁶. Knudson (1985) propôs a *teoria dos oncodemes*, que permite classificar os indivíduos e as populações em quatro grupos quanto às participações dos fatores ambiental e genético em seu risco de desenvolver o câncer. Estes grupos são: 1. Background: mutações ao acaso; 2. Ambiental: contato com carcinógenos; 3. Ambiental/Genético: carcinógenos ambi-

entais agindo em indivíduos geneticamente suscetíveis e 4. Genético: influência genética preponderante à ambiental.

No quarto oncodeme, as mutações conferem alto risco individual de um tipo particular de câncer em algum estágio da vida, independente do ambiente. Os indivíduos desta população são ditos *predispostos* e constituem minoria. Entre estes estão os portadores de doenças genéticas tais como o xeroderma pigmentoso, ataxia telangiectasia e tumor de Wilms^{3,9}. Por outro lado, existe um grupo maior de pessoas que, comparativamente, têm menores chances de desenvolver neoplasias mas, seus riscos ainda são mais elevados que os da população geral, pois respondem drasticamente à exposição ambiental. Esses são ditos *suscetíveis*, pertencendo ao terceiro oncodeme⁷. Assim, a precisa identificação de marcadores de suscetibilidade é de fundamental importância na predição de riscos⁸.

As pesquisas no campo da epidemiologia molecular têm fornecido evidências contundentes da contribuição efetiva do ambiente no surgimento do câncer humano e também sobre as situações de risco fortemente influenciadas pela suscetibilidade genética. Tal disciplina alia a metodologia molecular, principalmente a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), os modelos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* e a bioquímica, aos dados obtidos pela epidemiologia clássica, possibilitando - não apenas o levantamento rápido dos riscos populacionais - mas também dos riscos individuais no surgimento de neoplasias. Dessa forma, possibilita a intervenção precoce e a implementação de estratégias eficazes de prevenção, além de fornecer bases

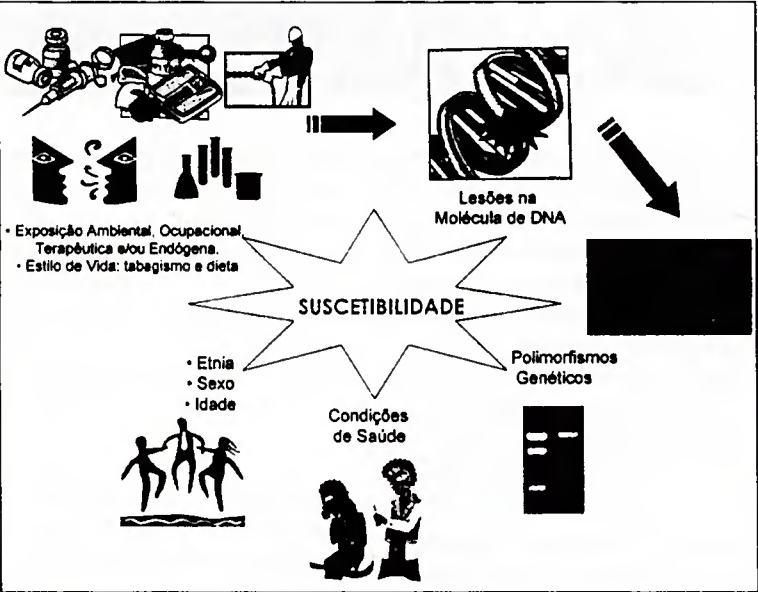
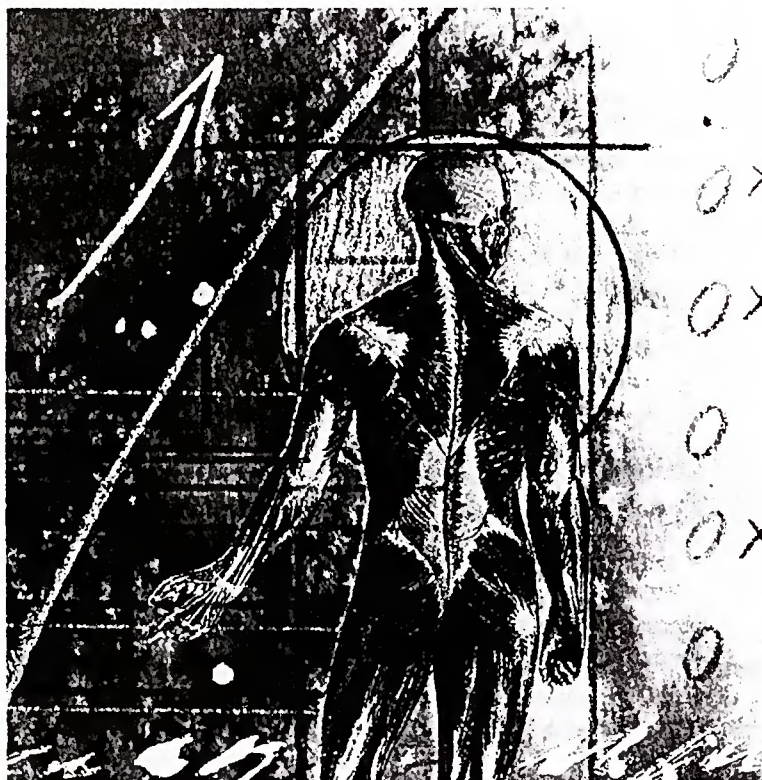


Figura 1. Representação esquemática da influência dos fatores que conferem suscetibilidade no processo de carcinogênese ambiental, iniciando-se com a exposição ambiental, ocupacional, terapêutica e/ou endógena aliadas ou não ao estilo de vida (hábito tabagista e dieta). Os compostos mutagênicos/carcinogênicos presentes interagem com a molécula de DNA, RNA e proteínas e podem causar lesões que, somadas às possíveis alterações em genes críticos (preexistentes ou não), levam ao desenvolvimento do câncer. Sabe-se que toda esta via pode ser influenciada por outras condições, tais como etnia, idade, sexo, estado de saúde (doenças crônicas, desnutrição) e ainda por polimorfismos genéticos. (modificado de Perera, 1997).



para o tratamento das mesmas⁹. Para tanto, faz-se necessário o uso de biomarcadores como “indicadores sinalizando eventos em amostras ou sistemas biológicos”^{10, 11}. O Conselho Norte-Americano de Pesquisa, definiu três tipos de marcadores disponíveis para os estudos em sistemas biológicos:

- 1) **Marcadores de Exposição**, que fornecem informações sobre a quantidade de xenobióticos (compostos estranhos aos sistemas vivos) a que os indivíduos estão expostos (detectados na urina, plasma, saliva, etc.);
- 2) **Marcadores de Efeito**, que indicam a presença da doença ou de sinais pré-clínicos da mesma, representando momentos isolados do processo que podem ser qualitativa ou

quantitativamente avaliados (aberrações cromossômicas, status hormonais alterados e mutações em oncogenes e genes supressores de tumor);

3) **Marcadores de Suscetibilidade**, que indicam indivíduos ou populações com diferenças biológicas capazes de afetar a resposta do organismo a agentes ambientais (absorção diferencial de micronutrientes e os polimorfismos nos genes de reparo e do biometabolismo).

O princípio básico dos marcadores de suscetibilidade reside nas diferenças entre indivíduos, que conferem diferentes graus de sensibilidade às doenças induzidas pelo ambiente. Esses marcadores podem incluir características genéticas, diferenças no metabolismo ou a capacidade diferencial de um órgão se recuperar de agressões ambientais¹². Entre os

mais significativos marcadores de suscetibilidade estão as diferenças genéticas na capacidade das células repararem lesões no DNA causadas por agentes ambientais. Um outro tipo relevante de biomarcador de suscetibilidade baseia-se no fato de que muitos compostos mutagênicos/carcinogênicos não são capazes de provocar por si mesmos os efeitos prejudiciais, sendo alterados por enzimas cujas modificações podem aumentar ou diminuir a habilidade dessas substâncias interagirem com DNA, RNA ou proteínas^{13, 14}.

A genética da metabolização de xenobióticos

Grande parte do conhecimento a respeito da variabilidade genotípica e fenotípica entre indivíduos na regulação dos processos de metabolização xenobiótica teve início a partir de estudos farmacocinéticos. A constatação da existência de respostas diferenciais a uma mesma droga ministrada em doses equivalentes e de que alguns desses desvios apresentavam padrão de herança mendeliana simples, fez com que o geneticista alemão Vogel, em 1952, cunhasse o termo *farmacogenética*¹⁵. A farmacogenética dedica-se ao estudo da base genética sobre a resposta não usual do organismo à ação dos medicamentos ou poluentes ambientais¹⁶. Posteriormente, foi definido o critério de *polimorfismo genético*, i.e., traço mendeliano existente numa população em no mínimo dois fenótipos, nenhum dos quais ocorrendo em frequência menor que 1%.

Há cerca de vinte anos, a caracterização desses polimorfismos esteve restrita, principalmente, à detecção por eletroforese de variantes enzimáticas, sem contudo evidenciar sua identidade

de molecular. Todavia, com a clonagem e seqüenciamento de muitos genes do biometabolismo e a disponibilidade de metodologias acuradas para identificação de variantes alélicas ao nível de DNA, tornou-se possível a identificação de inúmeros polimorfismos em diferentes populações. O estudo de variações individuais na capacidade de metabolização de xenobióticos já identificou inúmeros polimorfismos genéticos, sendo a maioria desses de relevância clínica, envolvendo enzimas que metabolizam drogas¹⁷. Uma vez que a maioria dos agentes carcinogênicos requer ativação metabólica antes de se ligarem às biomoléculas (DNA, RNA e proteínas), as variações nos processos de ativação e detoxicação de compostos químicos e drogas desempenham papel crucial na tumorigênese ambiental¹³. Assim, distúrbios no equilíbrio desses processos podem explicar a variabilidade na resposta individual à exposição a tais compostos. A quantia final efetiva de carcinógenos produzida depende da ação competitiva entre os mecanismos de ativação e detoxicação, envolvendo as enzimas que tomam parte nessas vias bioquímicas da célula¹⁸.

Desse modo, a variação individual na resposta aos agentes xenobióticos e seus efeitos carcinogênicos potenciais é mediada pela predisposição herdada¹⁶. Alguns indivíduos ou subgrupos populacionais podem ter risco significativamente maior de apresentar câncer quimicamente induzido do que a média populacional, devido às diferenças expressivas nos processos de ativação e detoxicação¹⁹.

A maquinaria de metabolização xenobiótica possui dois tipos de enzimas: as de metabolismo oxidativo mediado ou de Fase I; e as enzi-

mas conjugadas ou de Fase II. Muitos compostos são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas da Fase I, que são, principalmente, enzimas da super-família do citocromo P-450 (CYPs). Dessa forma, através da introdução de um ou mais grupos hidroxila no substrato, um pró-carcinógeno pode tornar-se carcinógeno, como o benzo[a]pireno que é convertido em epóxido de benzo[a]pireno. Em contraponto, as reações da Fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno (glutathione, sulfato, glicose, acetato) através das glutathione-S-transferases (GSTs), UDP-glucuroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem então como enzimas inativadoras dos produtos da Fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção^{20,21}. Assim, o equi-

librio entre as enzimas que aumentam a toxicidade ou inativam os produtos químicos pode conferir sensibilidade individual diferenciada⁸ (Figura 2).

Como consequência dessa variabilidade individual, os modelos de investigação de risco devem considerar a predisposição genética que torna os indivíduos resistentes ou mais sensíveis à exposição ambiental ou a substratos endógenos, uma vez que tais enzimas também participam do metabolismo de hormônios esteróides e prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio, entre outros¹⁶. Essas investigações devem considerar ainda que os produtos conjugados denominados "desintoxicados" ou aqueles não metabolizados, podem também ser responsáveis por toxicidade e/ou mutagenicidade²¹ (Figura 3).

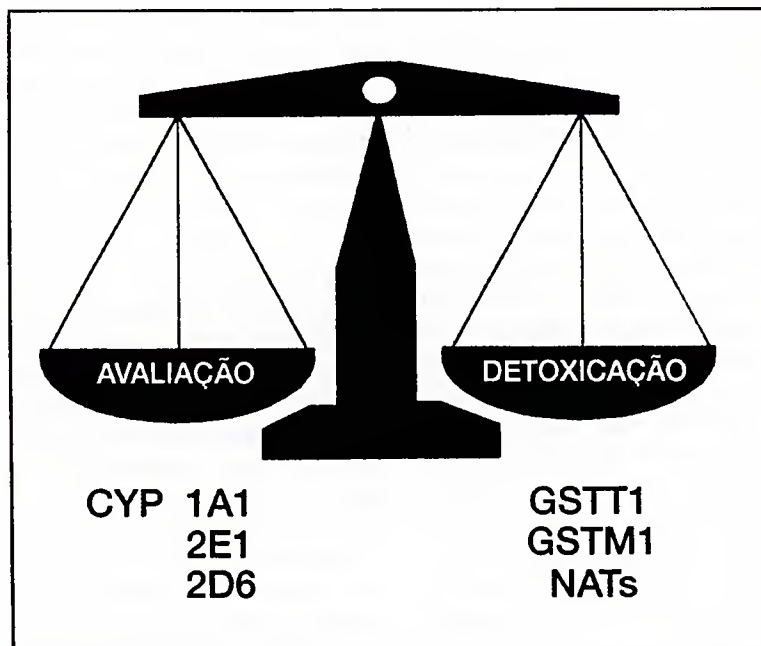


Figura 2. Representação do equilíbrio entre as enzimas do biometabolismo responsáveis pela ativação e detoxicação de xenobióticos e substratos endógenos. Entre elas as citocromo P450 oxidases CYP1A1, CYP2E1 e CYP2D6 e as glutathione-S-transferases GSTM1 e GSTT1 e as N-acetiltransferases.

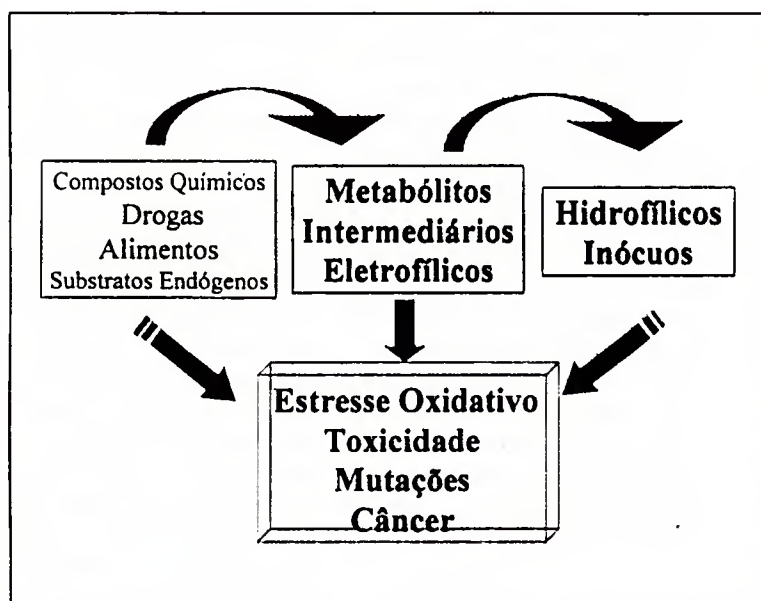


Figura 3. Diagrama mostrando a interação entre as enzimas metabolizadoras de Fase I e Fase II e o modo pelo qual o estresse oxidativo participa contribuindo para toxicidade, mutação e câncer. (modificado de Nebert et al., 1991).

A superfamília citocromo P450

A super-família de genes do citocromo P450 representa uma das principais classes de biotransformação da Fase I, através de suas mais de 500 isoenzimas. Tais monooxigenases participam tanto da biossíntese como da degradação de esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas, feromônios e metabólitos vegetais. Metabolizam ainda, inúmeras drogas e carcinógenos/mutágenos químicos, entre outros poluentes ambientais. Essas reações ocorrem, principalmente, no fígado; contudo existe expressão não hepática em menor grau por todo o organismo, incluindo intestino, pulmão e rim, entre outros. Um aspecto curioso dessa super-família está no fato de que as CYPs podem não apenas catalisar diferentes reações oxidativas, como também metabolizar uma quantidade impressionante de xenobióticos lipofílicos²².

Essas enzimas encontram-se presentes em animais, plantas, leveduras e bactérias e estima-se que há mais de 200 enzimas P450 funcionais em mamíferos. Todos esses genes evoluíram a partir de um ancestral comum, 2,5 bilhões de anos atrás, e o mecanismo que contribuiu para tal divergência foi, provavelmente, a interação entre plantas e animais²¹.

Devido à importância do seu papel na ativação metabólica de inúmeros procarcinógenos, extensiva pesquisa tem sido concentrada na relação entre a distribuição de variantes polimórficas de diferentes isoenzimas de P450 e a suscetibilidade ao câncer, tendo sido principalmente avaliados os genes CYP1A1, CYP2D6 e CYP2E1. De fato, diferenças individuais na expressão das formas de P450 causam variação marcante no nível de carcinógenos ativados na célula. Sabe-se que a expressão e atividade dessas enzimas está sob regulação através de mecanismos genéticos distintos.

Uma vez que muitas dessas enzimas têm expressão induzida, tanto o agente indutor como o mecanismo molecular de indução, podem variar, tornando perigosa qualquer generalização. Muitas das substâncias que agem como indutoras são, em realidade, substratos para a enzima P450 que induzem-nas, estimulando assim seu próprio metabolismo, bem como o de qualquer outro composto que seja substrato da mesma enzima P450. Além disso, muitos compostos que induzem as enzimas P450 podem também induzir uma ou mais enzimas da Fase II²³. Os polimorfismos de P450 e a suscetibilidade ao câncer podem estar associados pelo fato dessas isoenzimas participarem da transformação de compostos endógenos que são importantes durante os processos de diferenciação da célula iniciada até o estágio maligno²⁴.

CYP2D6 - O polimorfismo genético relacionado ao metabolismo da droga anti-hipertensiva debrisoquina foi o primeiro descrito para um gene da superfamília CYP. Um polimorfismo genético no loco do gene CYP2D6 afeta 5-10% da população Caucasiana e é responsável por uma atividade reduzida da debrisoquina hidroxilase¹⁸. A determinação tem sido convencionalmente realizada pela administração de uma droga e subsequente análise do valor metabólico na urina. De acordo com esse valor, os indivíduos foram classificados como pobres metabolizadores (PMs) ou extensivos metabolizadores (EMs) para a debrisoquina. O loco CYP2D6 é altamente polimórfico e geralmente consiste de uma cópia ativa do gene e dois pseudogenes. Através da técnica de PCR-RFLP, foram determinados mais de 20 alelos, sendo três comumente associados ao fenótipo PM: o

alelo CYP2D6*4, responsável por até 80% dos fenótipos PM; o alelo CYP2D6*3 e o alelo CYP2D6*5, onde há uma deleção completa do gene²⁴.

Vários estudos têm demonstrado que alguns alelos do gene CYP2D6 exibem distribuição étnica diferencial, como o CYP2D6*3 e CYP2D6*4 que ocorrem quase que exclusivamente em caucasoídes^{25,26}. Da mesma forma, há fortes sugestões de frequências diferenciais desses alelos em outros grupos populacionais, como por exemplo entre os portadores de determinadas neoplasias. Nessa direção, o fenótipo EM tem sido associado ao risco aumentado para alguns tipos de câncer, principalmente ao câncer de pulmão²⁶. É importante mencionar que entre os produtos metabolizados pela enzima debrisoquina 4-hidroxilase estão o pró-carcinógeno tabaco-específico NNK, a esparteína, o dextrometorfan e mais de 30 drogas de relevância clínica tais como codeína, antidepressivos tricíclicos, bloqueadores β -adrenérgicos, neurolepticos e inibidores seletivos da reabsorção da serotonina entre outros²⁷.

CYP2E1 - O gene CYP2E1 tem a transcrição induzida pelo etanol e seu produto (desmetilase de dimetilnitrosamina) está envolvido no metabolismo oxidativo do próprio etanol, bem como de inúmeros carcinógenos ambientais - como compostos hidrofílicos de baixo peso molecular, nitrosaminas, benzeno, cloreto de vinila - e outros xenobióticos, como drogas medicamentosas (agentes anestésicos, isoniazida) e drogas ilícitas (cocaína). Assim, a indução do CYP2E1 pelo etanol pode interferir na ativação de carcinógenos que, por sua vez, podem atuar promovendo neoplasias em diversos órgãos²⁸. A enzima CYP2E1 está localizada em

vários tecidos, entre eles cérebro e pulmões, sendo sua expressão mais significativa no tecido hepático. O polimorfismo do gene CYP2E1 foi recentemente considerado um dos indicadores potenciais da suscetibilidade no homem aos cânceres associados ao citocromo P450. Com a utilização das enzimas de restrição (PstI, DraI) foram descritos diferentes alelos para o CYP2E1, como os alelos CYP2E1*c2 e CYP2E1*C que, em alguns estudos, exibem associação epidemiológica ao risco aumentado para diversos neoplasias, como câncer de pulmão e fígado, exibindo também distribuição étnica diferencial^{28,30} (Figura 4).

As glutionas-s-transferases

Dentre as enzimas denominadas de Fase II, envolvidas nos processos de desintoxicação, as glutionas transferases desempenham um papel predominante no metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofílicos reativos, tanto pela conjugação com as glutionas como também por ligação não cova-

lente com vários agentes xenobióticos, incluindo carcinógenos e drogas citotóxicas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na dieta alimentar e na fumaça dos cigarros, impedindo a ligação destes ao DNA²⁹. A família das GSTs é composta por proteínas diméricas solúveis e multifuncionais que podem conjugar-se com moléculas eletrofílicas, para torná-las menos tóxicas, já que catalisam o ataque nucleofílico da glutatona³⁰. Sua maior concentração é observada no fígado, mas ocorre em menores concentrações em outros órgãos, como pulmões e intestino delgado.

Dentre as enzimas GST mais conhecidas estão as GSTM1 e GSTT1. O gene GSTM1, localizado no cromossomo 1, é polimórfico na população humana, com dois alelos funcionais (GSTM1*A e GSTM1*B) e um alelo com atividade nula (GSTM1*0), sendo que aqueles funcionais têm a mesma eficácia metabólica. Assim como o gene GSTM1, o GSTT1 também é polimórfico na população humana, podendo apresentar fenótipo nulo por deleção. A

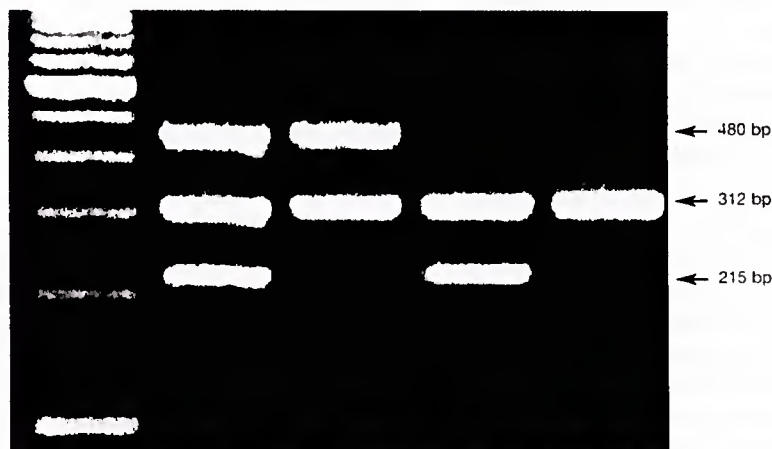


Figura 4-A: Fotografia de gel sob luz UV, apresentando os genótipos observados para os genes GST T1/M1. Na linha 2, +/+; linha 3, +/0; linha 4, 0/+ e linha 5, 0/0. Na linha 1, tem-se o marcador de peso molecular (100bp).



Figura 4-B: Fotografia de gel sob luz UV, apresentando os genótipos observados para o gene *CYP2E1* após digestão com a enzima *Pst*I. Na linha 1, o marcador de peso molecular 100bp, linhas 2 e 4, o genótipo homozigoto *c1/c1* e na linha 3 o genótipo heterozigoto *c1/c2*.

deleção em homozigose do gene *GSTM1* é observada em taxas que variam entre 20 a 70% nas diferentes populações investigadas, enquanto para o *GSTT1* essa taxa é de 11 a 38%³⁰ (Figura 4). Como essas enzimas catalisam a conjugação da glutathione com xenobióticos, a sua ausência poderia reduzir a capacidade do organismo de desintoxicar-se de metabólitos reativos. Diversos estudos têm detectado uma frequência elevada do fenótipo nulo deste gene em indivíduos portadores de diferentes neoplasias, tais como câncer de pulmão, colorretal, de pele e de bexiga.

Desafios e perspectivas futuras

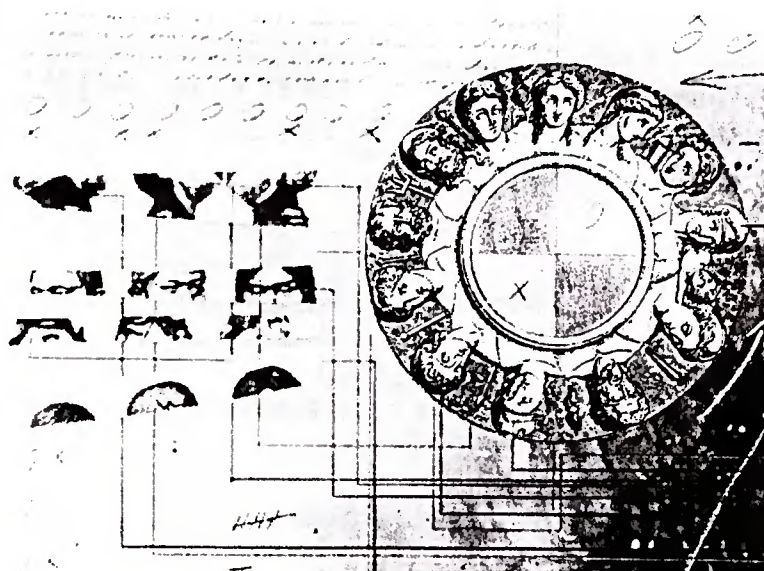
Há cerca de trinta anos, a suscetibilidade ao câncer era principalmente atribuída aos níveis de exposição aos carcinógenos. Atualmente, embora essa correlação seja efetiva, é evidente a existência de inúmeros fatores biológicos responsáveis pela variabilidade individual, os quais se

apresentam relevantes em várias doenças. Estudos indicam que cada indivíduo possui seu "fingerprint" característico, composto por alelos codificadores das chamadas enzimas metabolizadoras de drogas e dos receptores responsáveis pela regulação das mesmas. Através do estudo da suscetibilidade individual ou de subpopulações, por meio da determinação das frequências dos polimorfismos que caracterizam diferentes capacidades de metabolização, será possível identificar fatores de risco para muitas doenças e também compreender os mecanismos pelos quais elas se desenvolvem. Essa metodologia poderá auxiliar o indivíduo a optar por um estilo de vida ou tipo e local de trabalho mais saudável e deverá contribuir com a clínica médica na prescrição de drogas. Todavia, a posse desses avanços na tecnologia molecular gera questões éticas que necessitam posicionamento perante a saúde pública e a sociedade. Tais questões

devem ser antecipadas e estratégias racionais levantadas, na tentativa de contornar o uso indiscriminado da identificação de indivíduos sob risco aumentado.

Embora alguns desses alelos estejam convincentemente associados ao risco aumentado para toxicidade e câncer, outros ainda permanecem incertos. O conjunto de resultados contraditórios, obtidos nas pesquisas sobre a suscetibilidade genética ao câncer, demonstra a complexidade da questão, uma vez que a identificação de um genótipo desfavorável pode ser mascarada pela presença de um outro gene não considerado, mas também envolvido no metabolismo ou no reparo de lesões nas biomoléculas. Além disso, os alelos polimórficos de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos têm mostrado distribuição diferencial nas populações investigadas. Essa variação tem sido associada principalmente à composição étnica das mesmas e à faixa etária considerada. O conhecimento da distribuição desses polimorfismos na população alvo, permite minimizar o efeito dessas variáveis em estudos que investiguem a interação entre fatores ambientais, "background" genético e doenças específicas. Assim, é fundamental que se intensifiquem as pesquisas, para a precisa identificação dos marcadores de suscetibilidade às doenças.

Abordagens recentes têm associado tais polimorfismos a outras patologias, tais como a endometriose, artrite reumatóide, aterosclerose, oligospermia e ainda algumas desordens psiquiátricas. A prescrição individualizada de drogas medicamentosas segundo a metabolização da genotipagem individual, pode incrementar a eficácia e reduzir possíveis efeitos colaterais. Finalmente, devido ao



fato de que tanto os alelos selvagens como os mutantes estarem associados ao maior risco para o câncer, estudos em diferentes populações que controlem um maior número de variáveis, deverão fornecer subsídios para um melhor entendimento do papel dos genes "biometabolizados" na carcinogênese humana.

Bibliografia

1. NIEHS. Symposium on the Environmental Genome Project, October 1997: 17-18.
2. Yuspa. SH. Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis* 2000; 21: 341-344.
3. Perera. FP. Environment and cancer: who are susceptible? *Science* 1997; 278: 1068-1073.
4. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil - Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer 1999.
5. Sugimura. T. Nutrition and dietary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 387-395.
6. Perera. FP, Weinstein. IB. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 2000; 21: 517-524.
7. Knudson. AG. Overview: genes that predispose to cancer. *Mutat. Res.* 1991; 247: 185-190.
8. Albertini. RJ. Biomarker responses in human populations: towards a worldwide map. *Mutat. Res.* 1999; 428: 217-226.
9. Hussain. SP, Harris. CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.* 1998; 58: 4023-4037.
10. National Research Council. Committee on Biological Markers. *Environ. Health Perspect.* 1987; 74: 3-9.
11. Nebert DW, McKinnon. RA, Puga. A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 1996; 15: 273-280.
12. Bartsch. H., Hietanen. E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. *Environ. Health Perspect.* 1996; 104: 569-577.
13. Eubanks. M. Biomarkers: the clues to genetic susceptibility. *Environ. Health Perspect.* 1994; 102: 50-56.
14. Guengerich. FP. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 2000; 21:345-351.
15. Shields. PG. Pharmacogenetics: Detecting sensitive populations. *Environ. Health Perspect.* 1994; 102: 81-87.
16. Vineis. P. Interactions between genetics and environmental exposures: the example of cancer. *Epid. Prev.* 1995; 19: 79-81.
17. Hirvonen. A. Genetic factors in individual response to environmental exposures. *JOEM* 1995; 37: 37-43.
18. Hayes. RB. Genetic susceptibility and occupational cancer. *Med. Lav.* 1995; 86: 206-213.
19. Idle. J. Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? *Mut. Res.* 1991; 247: 259-266.
20. Persson. T, Johansson. T., Bergling. H., Marjallisa. D., Seidegad. J., et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1: regulation and toxicological significance. *JOEM.* 1995; 7: 25-36.
21. Nebert. DW. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutat. Res.* 1991; 247: 267-281.
22. Lin. JH, Lu. AYH. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 1998; 35: 361-390.
23. Rogers. AS. The role of cytochrome P450 in developmental pharmacology. *J. Adolescent Health* 1994; 15: 635-640.
24. Rannug. A., Alexandrie. A-K., Persson. L., Ingelman-Sundberg. M. Genetic polymorphism of cytochromes p450 1A1, 2D6 and 2E1: Regulation and toxicological significance. *JOEM* 1995; 37: 25-36.
25. Daly. AK, Cholerton. S, Gregory. W., Idle. JR. Metabolic polymorphisms. *Pharmac. Ther.* 1993; 57: 129-160.
26. Conforti-Froes. N, El-Zein. R, Abdel-Rahman. SZ, Zwischenberger. JB, Au. WW. Predisposing genes and increased chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers. *Mutat. Res.* 1997; 379: 53-59.
27. Edeki. T. Clinical importance of genetic polymorphism of drug oxidation. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 1996; 63: 291-300.
28. Guengerich. FP, Kim. D-H, Iwasaki. M. Role of human P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.* 1991; 4:168-179.
29. Strange. RC, Fryer. AA. Chapter 19. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC* 1999; 148: 231-249.
30. Rossit. ARB, Cabral. IR, Conforti-Froes. NDT. Avaliação das frequências alélicas de genes do biometabolismo em uma população brasileira. *Genetics and Molecular Biology*, 1999; 22: 23.

Andréa Rossit - Mestra e Doutoranda em Genética. Pós-Doutoramento na Universidade do Texas, TX, USA. Laboratório de Mutagênese e Epidemiologia Molecular.

IBILCE. UNESP, São José do Rio Preto, SP. Apoio Financeiro: FAPESP, CNPq e CAPES.

Nívea D. T. Conforti Froes - Mestra e Ph.D. em Genética - IBILCE/UNESP - Departamento de Biologia - Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth - 15054-000 - São José do Rio Preto, SP - fmrossit@zaz.com.br

ERRATA

Página	Local	Incorreto	Correção
24	§ Quinto	Posteriormente	Anteriormente
26	§ Primeiro	detoxicação	destoxificação
26	Figura 2	Avaliação	Ativação
26	Figura 2	detoxicação	destoxificação
27	§ Primeiro	super-família	superfamília
28	§ Segundo	Figura 4	Figura 4B
29	§ Primeiro	Figura 4	Figura 4A
29	§ Primeiro	colorretal	colorectal
29	§ Último	a metabolização da genotipagem individual	a genotipagem individual
30	Subtítulo	Bibliografia	Bibliografia

Os créditos atribuídos a cada uma das autoras no final do artigo encontram-se invertidos.



Polimorfismos de Enzimas Metabolizadoras de Xenobióticos no Brasil

Capítulo Três

RESUMO

A técnica de PCR-RFLP foi utilizada com o objetivo de determinar as frequências dos genótipos nulos para os genes *GSTT1* e *GSTM1*, assim como as frequências dos alelos polimórficos do gene *CYP2E1* em duas populações urbanas brasileiras, historicamente miscigenadas entre brancos, negros e ameríndios, que apresentam diferenças marcantes na incidência de câncer. Os nossos resultados mostraram que não há diferenças na distribuição dos genótipos nulos para os genes *GSTT1* e *GSTM1* entre as populações do Norte e do Sudeste. Em ambas populações, as frequências dos polimorfismos de deleção estiveram em torno de 18% para o gene *GSTT1* e de 47% para o gene *GSTM1*. As frequências alélicas e haplotípicas para os alelos raros do gene *CYP2E1* foram mais elevadas na população do Norte (*5B: 0.092; *6: 0.158; *5B/*6: 0.089) quando comparadas àquelas da população Sudeste (*5B: 0.06; *6: 0.116; *5B/*6: 0.049). Tais diferenças estão de acordo com a contribuição distinta das diferentes etnias para a formação da população altamente heterogênea do Brasil. Neoplasias específicas, tais como o câncer de pulmão e o de próstata, apresentam incidência e mortalidade diferencial comparando-se as regiões Norte e Sudeste do Brasil. Esse fato deve refletir diferenças na exposição e/ou suscetibilidade a carcinógenos ambientais, sendo ainda necessário o estabelecimento da possível contribuição do gene *CYP2E1* para tal suscetibilidade, em ambas as populações brasileiras. Todavia, uma vez que os fatores ambientais desempenham um papel importante na suscetibilidade ao câncer, as pesquisas futuras devem incluir vias específicas de exposição carcinogênica tais como a dieta, ocupacional e o estilo de vida, nas diversas populações brasileiras.

Genetic Polymorphisms of Xenobiotic-metabolizing Enzymes in Two Brazilian Populations with Distinct Ethnic Composition.

Andréa R. B. Rossit¹, Isabel R. Cabral², Arno R. Hamel², Cláudia M. A. Carareto³; Christine Hackel⁴ and Nivea D.T.Conforti-Froes¹

¹ Laboratory of Molecular Epidemiology and Mutagenesis, University of São Paulo State, São José do Rio Preto, Brazil.

² Genetics Department, Federal University of Pará, Belém, Brazil.

³ Laboratory of Insect Evolution, University of São Paulo State, São José do Rio Preto, Brazil.

⁴ Molecular Biology and Genetic Engineering Center (CBMEG), State University of Campinas, Campinas, Brazil.

Running Title: Polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes in Brazil

Key Words: Genetic susceptibility, Brazilian populations, Xenobiotic-metabolizing enzymes, GSTs, CYP2E1

Abbreviations

If italic, abbreviations correspond to gene. If not, equal to enzyme or allele. CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; CYP2E1, cytochrome P4502E1; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GSTM1, glutathione-S-transferase μ ; GSTT1, glutathione-S-transferase θ ; HbS, sickle hemoglobin; PCR, polymerase chain reaction; RFLP, restriction fragment length polymorphism.

Andréa Regina Baptista Rossit

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP

Rua Cristóvão Colombo, 2265

São José do Rio Preto, SP Brasil

Postal code: 15054-000

Phone: 55 17 221 2380

Email: fmrossit@terra.com.br



ABSTRACT

PCR-RFLP was performed to determine the *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes and *CYP2E1* polymorphic allele frequencies in two geographically distant urban Brazilian populations, historically admixed among White, Black and Native Amerindians, which show marked differences in cancer incidence. Our data revealed no difference in the prevalence of the *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes between the Northern and the Southeastern populations. Deletion polymorphism frequencies were around 18% for *GSTT1* and 47% for *GSTM1* in both populations. For the rare *CYP2E1* alleles, the allelic and haplotypic frequencies were higher in the Northern (*5B: 0.092; *6: 0.158; *5B/*6: 0.089) compared to the Southeastern population (*5B: 0.06; *6: 0.116; *5B/*6: 0.049). These data are in agreement with the well documented diverse ethnic contribution to the formation of the Brazilian highly heterogeneous population. Specific types of neoplasia occur with different incidence and mortality rates in the North compared to Southeastern Brazil. This may reflect differences in exposure and/or susceptibility to environmental carcinogens. Whether the *CYP2E1* polymorphisms may contribute to such susceptibility, in both Brazilian population, remains to be determined. However, since environment has a major contribution to cancer susceptibility, future research must also evaluate particular routes of carcinogen exposure among the diverse Brazilian populations.

INTRODUCTION

Cancer ranks as the second leading cause of death in Brazil. In the last decade, an annual increase of 28% was observed in the incidence of this disease, similarly to other countries. In order to establish cancer mortality rates in Brazil, the National Institute of Cancer (INCA, Brazilian Ministry of Health) analyzed the data obtained in the five major regions, showing that the proportion of deaths, due to neoplasia, gradually increases from the North (7.83%) to the Southeastern (11.93%) and South (15.19%) regions of the country. This may be due to socioeconomic and/or environmental marked differences within the distinct Brazilian regions [1].

Recent molecular epidemiology research provides compelling evidence that environmental factors are major contributors to human carcinogenesis and that their risks are strongly influenced by genetically determined differences [2, 3]. Polymorphisms of genes of xenobiotic-metabolizing enzymes are largely responsible for interindividual differences in ability to activate and detoxify mutagenic/carcinogenic agents and therefore may influence individual susceptibility to environmental cancer [4, 5]. Glutathione S-transferases belong to a superfamily of detoxification enzymes that provide critical defenses against a large variety of chemical carcinogens and environmental toxicants [6]. Loss of alleles in *GSTM1* and *GSTT1* has been suggested as a genetic risk factor in a variety of cancers such as lung, skin, bladder and head and neck cancers, in different populations [7-13]. Genetic polymorphisms in *CYP2E1* may also be



important in human carcinogenesis as it has been demonstrated that this enzyme expression is dramatically enhanced by ethanol, benzene and tobacco smoke exposures, and it is also important in the metabolic activation of various N-nitrosamines [14]. The CYP2E1*5B variant allele, which exhibits higher transcriptional activity [15], and the allele CYP2E1*6, associated to enhanced DNA adduct levels [16, 17] have been extensively studied. Both alleles were related to increased risk of different types of lesions including lung cancer [18-23] and hepatocellular carcinoma [24, 25].

Several authors showed pronounced interethnic variations in the genetic polymorphisms of the *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* genes [26]. For instance, Asian populations presented higher frequencies of the CYP2E1*5B and CYP2E1*6 alleles, compared to African-American and European-American populations [27], whereas the *GSTM1* null genotype exhibits a low frequency in Brazilian indigenous compared to other populations [28].

Brazil is a large country of continental dimension (8.511.965 Km²) with a population whose ethnic composition is highly heterogeneous, resulting from the hybridization of the numerous native indigenous populations and immigrants from Europe, Africa, and Asia. All the immigration flow took place in unequal proportions within the different regions of the country [29]. As a reflect of this fact, specific alleles such as HbS and G6PDA variants are more prevalent in cities with high contingent of African descents [30-32].

In Brazil, ethnic-related molecular polymorphisms have been investigated mainly in β -globin, *G6PD* and *CFTR* genes [33-35]. However, few studies

outlined the polymorphic distribution of genes of xenobiotic-metabolizing enzymes [28, 36, 37]. Descriptive studies of the different Brazilian region populations could be useful to verify possible genetic variability in relation to xenobiotic-metabolizing enzymes, since this variability may influence cancer susceptibility.

Thus, this work aimed to determine the *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes and CYP2E1*5B and CYP2E1*6 allelic frequencies in two geographically distant urban Brazilian populations, historically admixed among White, Black and Native Amerindians, which present marked differences in cancer incidence.



MATERIAL AND METHODS

Subjects

The populations studied were from two distinct regions of Brazil. The first group comprised 174 individuals (112 males and 62 females) from Belém ($-1^{\circ}27'S$ $-48^{\circ}30'W$), the capital of Brazil's northernmost state, Pará (PA population). These subjects had a mean age of 34.1 years (ages ranging from 18 to 62 years old) and were recruited from the blood donors of the Hematology and Hemotherapy Center of Pará state. The last Brazilian census to record color indicated that in 1991, 22.7% of the North's population was phenotypically White, 1.2% Indian and the remainder 75.4% of African origin. The second group (SP population) consisted of 314 individuals (210 males and 104 females) ranged in age from 18 to 74 years (mean age, 39.8 years). These subjects were recruited from the blood donors of the Hematology and Hemotherapy Center at State University of Campinas, Campinas ($-23^{\circ}32'S$ $-46^{\circ}38'W$), and of the Hemocentro at the Faculty of Medicine (FAMERP), São José do Rio Preto ($-20^{\circ}50'S$ $-49^{\circ}20'W$). Campinas and São José do Rio Preto cities are both located in the São Paulo state, Southeastern Brazil. The Southeastern trihybrid population was classified at 62.6% White, 16.1% African descent and 0.05% Indian according to the 1991 Census.

The human subjects protocol was approved by the Ethical Committee of the participating institutions and a written informed consent from all subjects was obtained.



Methods

Genomic DNA samples were obtained from blood lymphocytes using a non-organic extraction procedure [38].

Analysis for the *GSTT1* and *GSTM1* genes was determined simultaneously in a single assay using a PCR multiplex protocol [39], where part of exon 7 of the *CYP1A1* constitutional gene was coamplified as an internal control. Thirty-five cycles of amplification were carried out as follows: 94°C for 30 sec, 59°C for 1 min and 72°C for 1 min. The PCR products were then analyzed by electrophoresis on an ethidium bromide-stained 2% 3:1 Nusieve agarose gel. The presence or absence of *GSTT1* and *GSTM1* genes was detected by the presence or absence of a band at 480 bp and a band at 215 bp, respectively. A band at 312 bp (*CYP1A1*) has documented successful amplification.

PCR-RFLP was performed to investigate the CYP2E1*5B (c2) and CYP2E1*6 (C) rare alleles using primers and conditions previously described [40, 41]. Thirty-five cycles of amplification were carried out as follows: 94°C for 1 min, 60°C (CYP2E1*5B) or 62°C (CYP2E1*6) for 1 min and 72°C for 1 min (CYP2E1*5B) or 4 min (CYP2E1*6). After the amplification, the products were digested with the appropriated enzymes (*Pst*I for CYP2E1*5B allele and *Dra*I for CYP2E1*6 allele). The fragments were then visualized on a 1.5% Nusieve agarose gel containing ethidium bromide.

All the experiments included positive and negative controls for each



studied polymorphism.

The goodness of fit to the Hardy-Weinberg equilibrium as well as statistical analysis of differences between population samples were performed using the chi-square test. The linkage disequilibrium D and the frequencies of haplotypes in each population were estimated under the assumption of Hardy-Weinberg equilibrium by the maximum likelihood estimation technique using the program ARLEQUIN [42].



RESULTS

The deletion polymorphism frequencies for *GSTT1* and *GSTM1* genes and the null genotype interaction in both studied populations are shown in Table 1. Comparison of the results between both populations showed a highly homogeneous distribution of the null alleles of the GST genes. The prevalence of the deleted *GSTT1* and *GSTM1* genotypes was similar in the PA and SP populations (0.184 vs. 0.185 and 0.488 vs. 0.465, respectively). The combined null genotype of both genes (*GSTT1* and *GSTM1*) was observed in 0.069 among the Northern (PA) and 0.083 among the Southeastern (SP) populations. No difference, at a statistical level, was observed for such interactions in both studied populations (Table 1). Since both populations presented uniform frequencies for the deletion polymorphisms of the GST genes, we were able to consider them as an unique Brazilian sample of 488 individuals (mean age = $36,9 \pm 11.41$ years old). In this general population, the proportion of individuals homozygous for the null allele of the *GSTT1* and *GSTM1* was 0.184 and 0.473, respectively.

We analyzed the *Pst*I and *Dra*I polymorphisms of *CYP2E1* gene. Table 2 shows the different genotypes for each polymorphism and the CYP2E1*5B and CYP2E1*6 allelic frequencies as well as the heterozygosity for each polymorphism. In the case of the *Pst*I polymorphism, the *CYP2E1* WT/*5B genotype was more prevalent in the PA population (0.184) than in the SP population (0.121), but the difference was not statistically significant. No subjects were homozygous for the rare CYP2E1*5B allele. The overall allele

frequencies for the CYP2E1*5B allele were 0.092 and 0.06 for the Northern and Southeastern populations, respectively ($\chi^2 = 3.325$; $p = 0.07$). The allele frequencies for the rare polymorphic allele in the *DraI* locus were higher among the Northern (0.158) compared to the Southeastern individuals (0.118), however this difference was not significant ($\chi^2 = 3.43$; $p = 0.06$). Comparison of the CYP2E1*6 genotype frequencies between PA and SP populations showed no significant differences (0.293 vs. 0.226, respectively; $\chi^2 = 1.58$; $p = 0.21$). All of the distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium.

A large degree of correlation was observed between RFLPs after *PstI* and *DraI* digestion of *CYP2E1* in both study populations. Most of the subjects were homozygous for both *CYP2E1* wild-type alleles (0.702 and 0.761 for PA and SP, respectively; Table 3). The second commonest genotypic association was WT/*5B WT/*6 (0.155 and 0.102, respectively) since in both populations, around 84% of the CYP2E1*5B carriers were also heterozygous for the CYP2E1*6 allele. The following genotypes were also observed: WT/WT WT/*6 (0.115 and 0.118), WT/*5B *6/*6 (0.023 and 0.006), and WT/*5B WT/WT (0.005 and 0.013). No subject presented the WT/WT *6/*6 combination of genotypes. The genotypic associations comparison between both populations showed no differences by the Chi-square test. The linkage disequilibrium D was 0.074 in the PA and 0.042 in the SP population showing that the rare alleles *5B and *6 were in linkage disequilibrium.

Table 4 presents the estimated haplotype frequencies, calculated from the double genotype distribution using the maximum likelihood estimation method.



The double wild-type was the most frequent haplotype estimated in these populations (0.839 and 0.879 for PA and SP, respectively). Among the Northern Brazilians the *5B/*6 was the second most frequent haplotype, whereas among the Southeastern Brazilians the WT/*6 haplotype was the second commonest combination. In addition, we could detect a significant higher frequency of the *5B/*6 haplotype in the PA compared to the SP population ($\chi^2 = 5.938$; $p = 0.015$). The haplotype *5B/WT, was also estimated in 0.003 and 0.007 in the PA and SP populations, respectively.



Tables

Table 1. Deletion polymorphism frequency for *GSTT1* and *GSTM1* and their null genotype interaction in two Brazilian populations (Pará and São Paulo).

Population	PARÁ (n = 174)		SÃO PAULO (n = 314)	
<i>GSTT1</i> /				
<i>GSTM1</i> interactions	n	frequency	n	frequency
T1 positive/M1 positive	69	0.397	136	0.433
T1 positive/M1 null	73	0.419	120	0.382
T1 null/M1 positive	20	0.115	32	0.102
T1null/M1 null	12	0.069	26	0.083
<i>GSTT1</i> null	32	0.184	58	0.185
<i>GSTM1</i> null	85	0.488	146	0.465

Table 2. CYP2E1*5B and CYP2E1*6 polymorphism genotypes, allelic frequencies and heterozygosity (observed/expected) in two Brazilian populations (Pará and São Paulo).

Population/ Polymorphism	PARÁ (n = 174)		SÃO PAULO (n = 314)	
<i>CYP2E1/PstI</i>	n	frequency	n	frequency
WT/WT	142	0.816	276	0.879
WT/CYP2E1*5B	32	0.184	38	0.121
CYP2E1*5B allele	32	0.092*	38	0.060*
χ^2 HW	1.66		1.48	
Heterozygosity	0.18/0.16		0.12/0.11	
<i>CYP2E1/DraI</i>				
WT/WT	123	0.707	243	0.774
WT/CYP2E1*6	47	0.270	69	0.22
CYP2E1*6/ CYP2E1*6	4	0.023	2	0.006
CYP2E1*6 allele	55	0.158**	73	0.116**
χ^2 HW	0.02		1.36	
Heterozygosity	0.27/0.26		0.22/0.20	

n = number of individuals; WT = wild-type allele

* $\chi^2 = 3.325$; p = 0.07

** $\chi^2 = 3.43$; p = 0.06

Table 3: *CYP2E1* genotype frequencies for the *CYP2E1/PstI* and *CYP2E1/DraI* in the Pará and São Paulo populations (WT = wild-type allele).

PARÁ					SÃO PAULO			
<i>PstI</i>	n	<i>DraI</i>	n	frequency	n	<i>DraI</i>	n	frequency
WT/WT	142	WT/WT	122	0.702	276	WT/WT	239	0.761
		WT/*6	20	0.115		WT/*6	37	0.118
		*6/*6	0	0.0		*6/*6	0	0.0
$\chi^2 = 0.037$; p = 0.84								
WT/*5B	32	WT/WT	1	0.5	38	WT/WT	4	0.013
		WT/*6	27	0.155		WT/*6	32	0.102
		*6/*6	4	0.023		*6/*6	2	0.006
$\chi^2 = 2.39$; p = 0.30								

Table 4. Distribution of estimated haplotype frequencies in two Brazilian populations and of observed frequencies in a South-Amerindian Chilean population according to the maximum-likelihood estimation method.

Haplotypes	PARÁ		SÃO PAULO		CHILEAN MAPUCHE [43]	
	Frequency	s.d. ¹	frequency	s.d. ¹	Frequency	s.d.
c1/D ²	0.839	0.02	0.879	0.01	0.74	-
c1/C ³	0.069	0.01	0.066	0.01	0.006	-
c2/D	0.003	0.00	0.007	0.00	0.000	-
c2/C	0.089	0.01	0.049	0.00	0.25	-

¹ Number of bootstraps for generating s.d.'s = 100

² c1 and c2 = *CYP2E1* WT and *5B alleles

³ C and D = *CYP2E1* WT and *6 alleles

DISCUSSION

Little information is available on the *CYP2E1*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms in the Brazilian population and this study contributes to establish the allele and genotype distributions from healthy individuals living in two distinct Brazilian regions. Pará is the northernmost Brazilian state, located around 1860 miles distant from São Paulo, Southeastern Brazil. Both states had different colonization histories with diverse contribution of the three major ethnic groups, which reflects in the ethnic background of their nowadays populations [44, 45].

Bodmer & Cavalli-Sforza [46] proposed that any racial classification can be arbitrary, imperfect and very difficult, since it is impossible to delimit race by physic anthropology studies as well as by gene frequency analysis. Thus, in highly heterogeneous groups, such as the Brazilian population, it is inadequate to consider only phenotypic characteristics, such as skin color and hair texture, to determine ethnic origin [30]. In addition, molecular studies [31, 45, 47, 48] do not confirm the Brazilian Census data [49] regarding the population ethnic composition. Thereby, considering the observation that 38% of the individuals from our study (SP population), classified as Whites, reported African or Amerindian ancestry whereas 23% among those classified as Blacks reported a Caucasian ancestry, we decided to consider both as racially admixed populations.

Using the multiplex approach, we determined the distribution of both *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms among Northern and among Southeastern

Brazilians. The GSTs null genotypes distribution was homogeneous between both populations. In the present study we report a 47.3% prevalence of the deleted GSTM1 allele in the whole of the studied Brazilian population who were originated from Pará and São Paulo states. This frequency is intermediary to those reported for non random Brazilian Southeastern Caucasian populations (0.55 and 0.60) [28, 36] and to the Brazilian Blacks (0.33) [28]. However, these previous reports represent only a small fraction of the whole Brazilian population. The prevalence of the deleted *GSTT1* genotype obtained in our study (0.18) is comparable to that described for Caucasian Brazilians [28].

Interestingly, in our study the *GSTM1* and *GSTT1* null allele frequencies are also similar to those obtained among different ethnic populations presenting low admixture proportions, such as the U.S. White [9, 20, 39, 50-54], Chinese and Japanese [55-58] and European populations [59-63].

In spite of the marked differences between our study Brazilian populations, regarding ethnic composition and moreover considering their geographical distance and diverse colonization history, our data showed non significant differences in the frequency distribution of the different *GSTT1* and *GSTM1* genotypes.

The data on the allelic frequency, genotypic and haplotypic distribution revealed differences in both *CYP2E1* polymorphisms between the two study populations. The CYP2E1*5B and CYP2E1*6 allelic frequencies were higher in the Northern compared to the Southeastern population, however these differences were not statistically significant. The CYP2E1*5B allelic frequency



observed in our study Northern population was significantly higher than that previously reported for a Caucasian Southeastern population. Nevertheless, when the comparison is made only among Brazilian Southeastern populations, this allele frequency was similar among Caucasians, Mulattoes and our study racially admixed population (0.06) [28, 36].

To our knowledge, this is the first report on the polymorphic distribution of the *CYP2E1**6 allele among Brazilians. This allelic frequency observed in the Brazilian Northern population (0.158) is similar to that previously reported by Wu *et al* [64] for US African Americans (0.14), but higher than that observed in our study SP population (0.118) which was comparable to an European-American [27] and other European populations [41, 65, 66].

In accordance to the previous published data, the *CYP2E1* allele frequencies (*CYP2E1* *5B and *6) observed in this study are lower than the high frequencies consistently reported in several Asian populations [17, 18, 21, 24, 27, 40, 55, 56, 69, 70] in contrast to other, mainly European, populations [25, 27, 41, 65]. Interestingly, racially admixed populations presenting higher *CYP2E1* allelic frequencies include the Chilean [43, 71], Mexican Americans and Hawaiian populations [22, 64].

Rare studies investigated the haplotypic distribution of the *Pst*I and *Dra*I *CYP2E1* polymorphisms. We could detect a higher frequency of the *5B/*6 haplotype in the Northern compared to the Southeastern Brazilian population. In fact, this reflects the difference in the *CYP2E1* alleles frequency between these two Brazilian populations. This haplotype was the second commonest in the

Northern population and in an Amerindian Chilean population [43], whereas in the Southeastern population, the second most common haplotype was the WT/*6. The lowest *5B/*6 haplotypic frequencies were reported by Stephens *et al* [27] for African-Americans and European-American populations (>0.01), in contrast to the highest frequencies estimated in Taiwanese (0.217) [27] and Amerindian Chilean populations (0.25) [43]. In the present study, the *5B/*6 haplotypic frequencies were intermediary to those previously described. The haplotype *5B/WT, only reported in a Taiwanese population [27], was also estimated in both Brazilian populations.

Several authors have shown linkage disequilibrium between the *DraI* polymorphism in intron 6 and the *PstI* polymorphism in the 5'-flanking regions of the *CYP2E1* gene in different populations [24, 43, 64, 66, 68, 70]. In this study we could also demonstrate a strong, but not strict, linkage disequilibrium between these two loci.

The higher prevalence of the *CYP2E1* allelic and haplotypic frequencies in the Northern compared to the Southeastern Brazilian population, may be due to the different contribution of the three major ethnic groups (Caucasian, mainly Portuguese; Blacks and Amerindians) in the formation of both nowadays populations. The Amerindian contribution was higher in the North of the country whereas European migration took place preferably in the South and Southeastern regions [45, 47, 48]. Recent molecular analysis has corroborated that Amerindians have an Asian origin [72]. Therefore, allelic and haplotypic frequencies of CYP genes in admixed populations might proportionally reflect

the Ameridian contribution [22, 43, 64, 71]. In summary, our study *CYP2E1* allelic and haplotypic differences are in agreement with the historically and genetically well documented diverse ethnic contribution to the formation of the Brazilian highly heterogeneous population.

Specific types of neoplasia, such as lung and prostate cancer, occur with different incidence and mortality rates in the North compared to Southeastern Brazil. This may reflect differences in exposure and/or susceptibility to environmental carcinogens. Whether the *CYP2E1* polymorphisms may contribute to such susceptibility, in both Brazilian population, remains to be determined. However, since environment has a major contribution to cancer susceptibility, future research must also evaluate particular routes of carcinogen exposure, such as diet, occupational and/or lifestyle among the diverse Brazilian populations.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully thank Dr. Sherif Z. Abdel-Rahman from the University of Texas, Galveston, USA, for sending positive and negative controls for the studied polymorphisms and also for his critical review of the manuscript. This work was supported by grants from CNPq, FAPESP (98/01376-2) and CAPES-PICD/UFPA.



REFERENCES

1. Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde. O problema do câncer no Brasil. 4.ed. Rio de Janeiro, Brasil, 1997.
2. Nebert DW, McKinnon, RA, Puga, A: Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 1996; 15: 273-280.
3. Perera, FP, Weinstein, IB: Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 2000; 21: 517-524.
4. Nebert, DW: Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutat Res* 1991; 247: 267-281.
5. Idle, J: Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? *Mutat Res* 1991; 247: 259-266.
6. Board, P, Coggan, M, Johnston, P, Ross, V, Suzuki, T, Webb, G: Genetic heterogeneity of the human glutathione S-transferases, a complex of gene families. *Pharmacol Ther* 1990; 48: 357-369.
7. Seidegard, J, Pero, RW, Markowiz, MM, Roush, G, Miller, DG, Beattie, EJ: Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class mu) as a marker of susceptibility to lung cancer: a follow up study. *Carcinogenesis* 1990; 11: 33-36.
8. Heagerty, AHM, Fitzgerald, D, Smith, A, Bowers B, Jones P, Fryer AA, Zhao L, Aldersea J, Strange RC: Glutathione S-transferase *GSTM1* phenotypes and protection against cutaneous tumors. *Lancet* 1994; 343: 266-268.



9. Bell, DA, Taylor, JA, Paulson, DF, Robertson, CN, Mohler, JL, Lucier, GW: Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1159-1164.
10. Zhong, S, Wyllie, AH, Barnes, D, Wolf, CR, Spurr, NK: Relationship between GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1821-1824.
11. Anwar, WA, Abdel-Rahman, SZ, El-Zein, R, Mostafa, HM, Au, WW: Genetic polymorphism of *GSTM1*, *CYP2E1* and *CYP2D6* in Egyptian bladder cancer patients. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1923-1929.
12. Abdel-Rahman, SZ, Anwar, WA, Abdel-Aal, WE, Mostafa, HM, Au, WW: *GSTM1* and *GSTT1* genes are potential risk modifiers for bladder cancer risk. *Cancer Detection Prev* 1998; 22: 129-138.
13. Trizna, Z, Clayman, GL, Spitz, MR, Briggs, KL, Goepfert, H: Glutathione S-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. *Am J Surg* 1995; 170: 499-501.
14. Guengerich, F P, Kim, D-H, Iwasaki, M: Role of human P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol* 1991; 4: 168-179.
15. Hayashi, S-I, Watanabe, J, Kawajiri, K: Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem* 1991; 110: 559-565.



16. Kato, S, Bowman, DE, Blomeke, B, Weston, A, Shields, PG: 7-Alkyl-deoxyguanosine (7-alkyl-dGp) adduct formation in human lung and cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) genetic polymorphisms. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1993; 34: 144-148.
17. Kato, S, Bowman, ED, Harrington, AM, Blomeke, B, Shields, PG: Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms *in vivo*. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 902-907.
18. Uematsu, F, Kikuchi, H, Motomyia, M, Abe, T, Sagami, I, Ohmachi, T, Wakui, A, Kanamaru, R, Watanabe, M: Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 254-256.
19. Uematsu F, Ikawa S, Kikuchi H, Sagami I, Kanamaru R, Abe T, Satoh K, Motomiya M, Watanabe M: Restriction fragment length polymorphism of the human *CYP2E1* (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure. *Pharmacogenetics* 1994; 4: 58-62.
20. El-Zein, R, Zwischenberger, JB, Abdel-Rahman, SZ, Sankar, AB, Au, WW: Polymorphism of metabolizing genes and lung cancer histology: prevalence of *CYP2E1* in adenocarcinoma. *Cancer Lett* 1997, 112: 71-78.
21. Wu, X, Shi, H, Jiang, H, Kemp, B, Hong, WK, Delclos, GL, Spitz, MR: Associations between cytochrome *P4502E1* genotype, mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* 1997; 18: 967-973.

22. LeMarchand, LL, Sivaraman, L, Pierce, L, Seifried, A, Lum, A, Wilkens, LR, Lau, AR: Associations of *CYP1A1*, *GSTM1*, and *CYP2E1* polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res* 1998; 58: 4858-4863.
23. Wang, SL, Lee, H, Chen, KW, Tsai, KJ, Chen, CY, Lin, P: Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and lung cancer in a Taiwanese population. *Lung Cancer* 2000; 26: 27-34.
24. Yu, M-W, Gladek-Yarborough, A, Chiamprasert, S, Santella, RM, Liaw, Y-F, Chen, C-J: Cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase polymorphism and susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1995; 109: 1266-1273.
25. Ladero, JM, Agúndez, JAG, Rodriguez-Lescure, A, Diaz-Rubio, M, Benitez, J: *RsaI* polymorphism at the cytochrome P4502E1 locus and risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* 1996; 39: 330-333.
26. 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.
27. Stephens, EA, Taylor, JA, Kaplan, N, Yang, C-H, Hsieh, LL, Lucier, GW, Bell, DA: Ethnic variation in the *CYP2E1* gene, polymorphism analysis of 695 African-Americans, European Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics* 1994; 4: 185-92.



28. Arruda, VR, Grignoli, CE, Gonçalves, MC, Soares MC, Menezes R, Saad ST, Costa FF: Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase μ (*GSTM1*) and θ (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? Clin Genet; 54: 210-214.
29. Salzano, FM, Freire-Maia, N: Populações brasileiros: aspectos demográficos, genéticos e antropológicos. São Paulo, EDUSP, 1967.
30. Azevedo, ES, Silva, KM, Silva, MC, Lima, AM, Fortuna, CM, Santos, MG: Genetic and anthropological studies in the island of Itaparica, Bahia, Brazil. Hum Hered 1981; 31: 350-357.
31. Franco, MHL, Weimer, TA, Salzano, FM: Blood polymorphisms and racial admixture in two Brazilian populations. Am J Phys Anthropol 1982; 58:127-132.
32. Zago, MA, Costa, FF, Tone, LG, Bottura, C: Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. Hum Hered 1983; 33: 125-129.
33. Zago, MA, Figueiredo, MS, Ogo, SH: Bantu β^S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. Am J Phys Anthropol 1992; 88: 295-298.
34. Raskin S, Philips JAJ, Krishnamani MR, Vnencak-Jones C, Parker RA, Dawson E, Rozov T, Cardieri JM, Maróstica P, Abreu F, Giugliani R, Reis F, Rosario NA, Ludwig N, Culpi L: Regional distribution of cystic fibrosis-linked DNA haplotypes in Brazil: Multicenter study. Hum Biol 1997; 69: 75-88.



35. Weimer, TA, Salzano, FM, Westwood, B, Beutler, E: G6PD variants in three South American ethnic groups: population distribution and description of two new mutations. *Hum Hered* 1998; 48: 92-96.
36. Gattás, GJ, Soares-Vieira, JA: Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. *Occup Med* 2000; 50: 508-511.
37. Nishimoto, IN, Hanaoka, T, Sugimura, H, Nagura, K, Ihara, M, Li, X. J, Arai, T, Hamada, GS, Kowalski, LP, Tsugane, S: Cytochrome P450 2E1 polymorphism in gastric cancer in Brazil: case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 675-680.
38. Abdel-Rahman, SZ, Nouraldeem, AM, Ahmed, AE: Molecular interaction of 2,3-[14C]-acrylonitrile with DNA in gastric tissues of rat. *J Biochem Toxicol* 1994; 9: 121-128.
39. Abdel-Rahman, SZ, El-Zein, RA, Anwar, WA, Au, WW: A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of *GSTM1* and *GSTT1* genes in population studies. *Cancer Lett* 1996; 107: 229-233.
40. Kato, S, Shields, PG, Caporaso, NE, Hoover, RN, Trump, BF, Sugimura, H, Weston, A, Harris, CC: Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res* 1992; 52: 6712-6715.
41. Hirvonen, A, Husgafvel-Pursiainen, K, Karjalainen, A, Antilla, S, Vainio, H: The human *CYP2E1* gene and lung cancer: *Dra*I and *Rsa*I restriction length polymorphisms in a Finnish study population. *Carcinogenesis* 1993; 14: 85-88.



42. Schneider, S, Roessli, D, Excoffier, L: Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.
43. Muñoz, V, Vollrath, V, Vallejos, MP, Miquel, JF, Covarrubias, C, Raddatz, A, Chianale, J: Genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP1A1 and CYP2E1 in the South-Amerindian population of Chile. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 343-351.
44. Ribeiro-dos-Santos, ÂKC, Santos, EJM, Guerreiro, JF, Santos, SEB: Demographic and genetic structure of the population of Castanhal, in the Amazon region of Brazil. *Rev Brazil Genet* 1995; 18: 469-474.
45. Carvalho-Silva, DR, Santos, FR, Rocha, J, Pena, SD: The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 281-286.
46. Bodmer, WF, Cavalli-Sforza, LL: Genetics, evolution, and man. San Francisco, Freeman, 1976.
47. Santos, SEB, Guerreiro, JF: The indigenous contribution to the formation of the population of the Brazilian Amazon region. *Rev Brasil Genet* 1995; 2: 311-315.
48. Santos, EJML, Ribeiro-dos-Santos, ÂKC, Guerreiro, JF, Aguiar, GFS, Santos, SEB: Migration and ethnic change in an admixed population from the Amazon region (Santarém, Pará). *Rev Brazil Genet* 1996; 3: 511-515.
49. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Síntese de Indicadores Sociais, 1999. <http://www.ibge.gov.br>



50. Lin, HL, Han, C-Y, Bernstein, DA, Hsiao, W, Lin, BK, Hardy, S: Ethnic distribution of the glutathione transferase Um 1-1 (*GSTM1*) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 1994; 15: 1077-1081.
51. Chen, CL, Liu, Q, Relling, MV: Simultaneous characterization of glutathione S-transferase *M1* and *T1* polymorphisms by polimerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 187-191.
52. Cheng, L, Sturgis, EM, Eicher, AS, Char, D, Spitz MR, Wei, Q: Glutathione S-transferase polymorphism and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer* 1999; 84: 220-4.
53. Krajcinovic, M, Labuda, D, Richer, C, Karimi, S, Sinnett, D: Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, *GSTM1*, and *GSTT1* genetic polymorphisms. *Blood* 1999; 93: 1496-1501.
54. Sweeney, C, Farrow, DC, Schwartz, SM, Eaton, DL, Checkoway, H, Vaughan, TL: Glutathione S-transferase *M1*, *T1*, and *P1* polymorphisms as risk factors for renal cell carcinoma: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 449-454.



55. Morita, S, Yano, M, Shiozaki, H, Tsujinaka, T, Ebisui, C, Morimoto, T, Kishibuti, M, Fujita, J, Ogawa, A, Taniguchi, M, Inoue, M, Tamura, S, Yamazaki, K, Kikkawa, N, Mizunoya, S, Monden, M: CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 polymorphisms are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagous. *Int J Cancer* 1997; 71: 192-195.
56. Morita, S, Yano, M, Tsujinaka, T, Akiyama, Y, Taniguchi, M, Kaneko, K, Miki, H, Fujii, T, Yoshino, K, Kusuoka, H, Monden, M: Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 1999; 80: 685-688.
57. Gao, YT, Zhang, Q: Polymorphism of the GSTM1 and CYP2D6 genes associated with susceptibility to lung cancer in Chinese. *Mutat Res* 1999; 444: 441-449.
58. Setiawan, VW, Zhang, ZF, Yu, GP, Li, YL, Lu, ML, Tsai, CJ, Cordova, D, Wang, MR, Guo, CH, Yu, SZ, Kurtz, RC: GSTT1 and GSTM1 null genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study in a Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 73-80.
59. Alexandrie, A-K, Ingelman-Sundberg, M, Seidegard, J, Tornling G, Rannug A: Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on *CYP1A1* and *GSTM1*: a study on best factors in relation to age of onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis* 1994; 15:1785-1790.

60. Moreira, A, Martins, G, Monteiro, MJ, Alves, M, Dias, J, Duro da Costa, J, Melo, MJ, Matias, D, Costa, A, Cristovão, M, Rueff, J, Monteiro, M: Glutathione S-transferase Mu polymorphism and susceptibility to lung cancer in the Portuguese population. *Teratog Carcinog Mutag* 1996; 16: 269-274.
61. Oude-Ophuis, MB, Van Lieshout, MM, Roelofs, HM, Peters, WHM, Manni, JJ: Glutathione S-transferases M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer* 1997; 82: 936-943.
62. Muiras, M.-L, Verasdonck, P, Cottet, F, Schächter, F: Lack of association between human longevity and genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes at the *NAT2*, *GSTM1* and *CYP2D6* loci. *Hum Genet* 1998; 102: 526-532.
63. Steinhoff, C, Franke, KH, Golka, K, Thier, R, Romer, HC, Rotzel, C, Ackerman, R, Schulz, WA: Glutathione S-transferase isozyme genotypes in patients with prostate and bladder carcinoma. *Arch Toxicol* 2000; 74: 521-526.
64. Wu, X, Amos, CI, Kemp, HS, Jiang, H, Wan, Y, Spitz, MR: Cytochrome P450 2E1 *DraI* polymorphisms in lung cancer in minority populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 1998; 7: 13-18.



65. Ingelman-Sundberg, M, Johansson, I, Yin, H, Terelius, Y, Eliasson, E, Clot, P, Albano, E: Ethanol-inducible cytochrome P4502E1: genetic polymorphism, regulation, and possible role in etiology of alcohol-induced liver disease. *Alcohol* 1993; 10: 447-452.
66. Persson, I, Johansson, T, Bergling, H, Dahl, ML, Seidegard, J, Rylander, R, Rannug, A, Höberg, J, Ingelman-Sundberg, M: Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. *FEBS Lett* 1993; 319: 207-211.
67. Watanabe, J, Hayashi, S-I, Nakachi, K, Imai, K, Suda, Y, Sekine, T, Kawajiri, K: *Pst*I and *Rsa*I RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 7194.
68. Hildesheim, A, Chen, C-J, Caporaso, NE, Cheng, Y-J, Hoover, RN, Hsu, M-M, Levine, PH, Chen, I-H, Chen, J-Y, Yang, C-S, Daly, AK, Idle, JR: Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma, Results from a case-control study conducted in Taiwan. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Preven* 1995; 4: 607-610.
69. Lee, KH, Kwak, BY, Kim, JH, Yoo, SK, Yum, SK, Jeong, HS: Genetic polymorphism of cytochrome P-4502E1 and mitochondrial aldehyde dehydrogenase in a Korean population. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 953-956.
70. Persson, I, Johansson, I, Lou, Y-C, Yue, Q-Y, Duan, L-S, Bertilsson, L, Ingelman-Sundberg, M: Genetic polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes among Chinese lung cancer patients. *Int. J. Cancer* 1999; 81: 325-329.



71. Quinones, L, Berthou, F, Varela, N, Simon, B, Gil, L, Lucas, D: Ethnic susceptibility to lung cancer: differences in CYP2E1, CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms between French Caucasian and Chilean populations. *Cancer Lett* 1999; 141: 167-171.
72. Santos, FR, Pandya, A, Tyler-Smith, C, Pena, SD, Schanfield, M, Leonard, WR, Osipova, L, Crawford, MH, Mitchell, RJ: The central Siberian origin for native American Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 619-628.



Cirroze Hepática Alcoólica e os Polimorfismos no Gene *XRCC1*

Capítulo Quatro

RESUMO

A cirrose hepática constitui um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do hepatocarcinoma, sendo amplamente considerada uma lesão pré-maligna irreversível. No Brasil, as mais altas taxas de mortalidade pela doença foram registradas na região Sudeste, consequência da prevalência aumentada de abuso no consumo de álcool nessa região do país. A ingestão crônica do álcool está relacionada à produção de radicais livres intermediários originados durante o metabolismo do etanol. A exposição do DNA celular, a esses intermediários reativos, gera diversas classes de lesões nas bases da molécula. Muitas dessas lesões são removidas pelas vias de reparo por excisão de bases. Neste trabalho, foi testada a hipótese de que os polimorfismos no gene *XRCC1*, que realiza o reparo por excisão de bases, estejam associados ao aumento no risco de cirrose hepática alcoólica, em indivíduos da região Sudeste do Brasil. Assim, foi realizado um estudo de caso-controle em 97 pacientes com cirrose hepática alcoólica e 96 controles (pareados por idade, sexo e etnia) para investigar o papel de duas variantes alélicas, codificadoras de alterações em aminoácidos, do gene *XRCC1* (polimorfismos *Arg194Trp* e *Arg399Gln*). De modo geral, foi observado um aumento de 1,7 vezes no risco relativo de cirrose hepática (OR= 1,69, 95% CL 0,92–3,12), associado ao alelo 399*Gln* (para ambos genótipos: homozigotos *Gln/Gln* e heterozigotos *Arg/Gln*). Essa associação foi mais evidente entre os mestiços, onde o risco relativo foi de 2,79 (95%



CL 0,90-8,9). Quando se considerou a idade, houve uma associação significativa entre o polimorfismo 399Gln e o risco de cirrose hepática em indivíduos com idades superiores a 45 anos. O risco relativo para tal associação foi de 2,74 (95% CL 1,07–7,07), comparado a um OR de 1,13 (95% CL 0.48–2.66) para aqueles com idades inferiores a 45 anos de idade. Nenhuma associação foi observada entre o polimorfismo 194Trp e o risco de cirrose hepática. Nossos resultados indicam que o polimorfismo 399Gln do gene *XRCC1* pode ser um modulador de risco importante para a suscetibilidade à cirrose hepática alcoólica, conforme demonstrado pelas interações entre a herança desse polimorfismo e outros fatores como a idade, a etnia e o consumo do álcool. As informações aqui obtidas são relevantes para as decisões futuras quanto a escolha dos polimorfismos genéticos recentemente identificados, que poderão ter impacto na suscetibilidade genética à cirrose hepática alcoólica, em diferentes populações. Este trabalho é precursor de investigações adicionais que objetivem a melhoria na prevenção primária e secundária dessa doença.

**POLYMORPHISMS IN THE DNA REPAIR GENE XRCC1
AND SUSCEPTIBILITY TO ALCOHOLIC LIVER
CIRRHOSIS IN SOUTHEASTERN BRAZIL**

**Andréa Regina B. Rossit^a; Isabel Rosa Cabral^b; Christine Hackel^b; Nívea
D. T. Conforti-Froes^a; Sherif Z. Abdel-Rahman^{c, d}**

**^aLaboratory of Molecular Epidemiology and Mutagenesis, University of
São Paulo State, São José do Rio Preto, ^bMolecular Biology and Genetic
Engineering Center (CBMEG), University of Campinas, Campinas,**

**^cDepartment of Preventive Medicine and Community Health, The
University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, TX 77555-
1110, USA**

Running Title: Liver Cirrhosis and XRCC1 genetic polymorphism

**Key words: Liver Cirrhosis, DNA repair, Genetic polymorphism, XRCC1,
biomarkers**

^d Corresponding author:

**Sherif Z. Abdel-Rahman, Ph.D.
Department of Preventive Medicine and
Community Health
The University of Texas Medical
Branch
Galveston, TX 77555-1110, USA
Tel: (409) 772-1803
Fax: (409) 772-9108
Email: sabdelra@utmb.edu**

ABSTRACT

Cirrhosis of the liver is a major risk factor for the development of hepatocellular carcinoma and is widely considered to be an irreversible pre-malignant condition. In Brazil, the southeastern part of the country has the highest mortality rates from the disease due to the high prevalence of alcohol abuse in this region. Chronic alcohol consumption is associated with the production of free radical intermediates, which are produced during ethanol metabolism. Exposure of cellular DNA to these reactive intermediates generates several classes of base lesions, many of which are removed by the base excision-repair pathway. In this study, we tested the hypothesis that polymorphisms in the DNA base excision repair gene *XRCC1* are associated with increased risk of liver cirrhosis in Southeastern Brazilians. We conducted a case-control study of 97 liver cirrhosis cases and 96 controls (matched for age, sex, and ethnicity) to investigate the role of two allelic variants coding for amino acid changes in the *XRCC1* gene (the *Arg194Trp* and the *Arg399Gln* polymorphisms). Overall, we observed a 1.7-fold increase in the relative risk of liver cirrhosis associated with the *399Gln* allele (either the heterozygous *Arg/Gln* or the homozygous *Gln/Gln* genotypes) (OR= 1.69, 95% CL 0.92–3.12). The relative risk was highest among the Mestizos ethnic group, where the odds ratio was 2.79 (95% CL 0.90-8.9). After adjustment for age, there was a significant association between the *399Gln* polymorphism and the risk of liver cirrhosis in

individuals over the age of 45 years. The odds ratio for this association was 2.74 (95% CL 1.07–7.07) compared to an OR of 1.13 (95% CL 0.48–2.66) for those under 45 years of age. No association was observed between the *XRCC1* 194Trp polymorphism and risk of liver cirrhosis. Our results indicate that the *XRCC1* 399Gln polymorphism may be a significant risk modifier for alcoholic liver cirrhosis, as documented by the interactions between the inheritance of this polymorphism and other factors such as age, ethnicity, and alcohol intake. The work presented here is critical to deciding which newly identified genetic polymorphisms in DNA repair genes may have an impact on genetic susceptibility to alcoholic cirrhosis of the liver in different populations. Our study opens the door for additional investigations aimed at improving primary and secondary prevention of this disease.

INTRODUCTION

Cirrhosis of the liver is a major risk factor for the development of hepatocellular carcinoma and is widely considered to be an irreversible pre-malignant condition. The disease is characterized by fibrous scarring and hepatocellular regeneration (1). It is one of the major causes of death worldwide, and it was among the five most common causes of mortality during productive ages in many Latin American countries (2). A large body of evidence indicates that alcohol abuse and infection with the hepatitis virus are major risk factors for liver cirrhosis (3-6). In Brazil, the average number of productive years of life lost prematurely, due to the disease, is around 15.5 years. Southeastern Brazil has the highest mortality rates from the disease, possibly due to the high prevalence of alcohol abuse in this region of the country (7).

Although a strong association between alcohol consumption and cirrhosis of the liver has been reported (8,9), only 10% to 20% of heavy drinkers ultimately develop the disease (10), suggesting the involvement of host susceptibility factors (11-13). Individual susceptibility to adverse health outcomes may be partly explained by genetic variability in metabolic activities related to phase I activation and phase II detoxication enzyme pathways. Polymorphisms (allelic variants with frequencies > 1%) in genes coding for biotransformation enzymes that catalyze the activation and detoxication of xenobiotics, including alcohols, have been reported. Several



laboratories have examined the association between liver disease and inheritance of polymorphisms in alcohol and aldehyde dehydrogenases (14-17), N-acetyltransferases, glutathione-S-transferases (18,20) and cytochrome P450 genes (16,19-25). The results of these studies have been equivocal. While some reports, found significant associations between certain polymorphisms in these genes and increased risk of disease (15-17,19,21,22) others failed to find such associations (14,16,18-20,23-25).

Similar to metabolic activities, reduced DNA repair capacity may constitute another significant risk factor for liver diseases. Reports from several investigations suggest that free radicals and oxidative stress play an important role in the pathogenesis of alcoholic and toxic liver diseases (26-31). It has been reported that patients with liver cirrhosis and ethanol intake above 100g/day (corresponding to approximately 4 bottles of beer, 5 servings of "aguardente" – a Brazilian distilled drink, or 10 cups of wine) had 4- to 5-fold higher levels of oxidative damage (as monitored by erythrocyte malonaldehyde and plasma lipid hydroperoxides) than cirrhotic patients with ethanol intake below 100g/day or healthy controls (32). Investigators have also reported the persistence of oxidative stress even after the onset of cirrhosis and subsequent liver cancer (33). An increase in the levels of the promutagenic DNA lesion 8-hydroxydeoxyguanosine (oh8dG) (34) and increased production of reactive oxygen species within the liver of patients with chronic infectious hepatitis have been documented (35). Exposure of cellular DNA to these reactive oxygen



species generates several classes of base lesions, many of which are removed by DNA repair pathways, including the base excision-repair pathway.

As with other phenotypic traits, variation in DNA repair capacity is probably genetically determined. Shen et al. (36) were the first to report several polymorphisms in five DNA repair genes (*XPB*, *XPD*, *ERCC1*, *XRCC3* and *XRCC1*) representing three different repair pathways. Other investigators have also reported additional polymorphisms in DNA repair genes (37,38). A number of these polymorphisms occur in evolutionarily conserved sequences, and several of them result in amino acid substitutions. This strongly suggests their possible role in the maintenance of normal protein function. The human *XRCC1* gene has been identified by its ability to restore DNA repair activity in the Chinese hamster ovary (CHO) mutant cell line EM9 (39,40), and has been mapped to the long arm of chromosome 19 (41). The gene encodes the *XRCC1* protein, which complexes with three other DNA repair enzymes, DNA ligase III, DNA polymerase β and poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) (42,43), involved in base excision (reviewed in reference 44). A recent study indicates that *XRCC1* can bind directly to both gapped and nicked DNA, as well as to gapped DNA complexed with DNA polymerase β , suggesting that *XRCC1* might be independently involved in DNA damage recognition (45,46). DNA sequencing conducted by Shen et al. (36) identified five polymorphisms in the *XRCC1* gene. Three of these occur at conserved sequences and result

in amino acid substitutions. These three coding polymorphisms were detected at codons 194 (Arg→Trp), 280 (Arg→His) and 399 (Arg→Gln) at a reported allelic frequency of 0.25, 0.08, and 0.25, respectively (36).

Given the possible association between reduced DNA repair capacity and liver cirrhosis, the reported sequence variations in the *XRCC1* gene, which may alter the structure of the DNA repair enzyme, could affect the risk for the disease. In this study, we tested the hypothesis that *XRCC1* polymorphisms are associated with increased risk of liver cirrhosis. We focused on the relationship between the two reported coding polymorphisms in the *XRCC1* gene having the greatest allele frequency: a C→T substitution at position 26304 (codon 194, exon 6) and a G→A substitution at position 28152 (codon 399, exon 10).

MATERIALS AND METHODS

Study population and sample collection

Ninety-seven male patients with clinical and laboratory findings compatible with liver cirrhosis were recruited and diagnosed by the medical staff of the Serviço de Gastrenterologia of the Faculdade Regional de Medicina (São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil). The patients presented with typical sonographic signs indicative of liver cirrhosis. These cirrhotic patients had all consumed ethanol for at least 5 years at the time of diagnosis. Their alcohol intake ranged from 90-680 grams daily (Mean $\pm$ S.D. = 208 g/day $\pm$ 121) for 5-60 years (Mean $\pm$ S.D = 27 years $\pm$ 11). Cirrhotic patients were excluded if they had serological evidence of previous or present viral hepatitis B or C or autoimmune liver disease. Information on the diagnosis of liver cirrhosis and clinical examination, biochemical and sonographic studies were obtained from the medical records of the patients, according to a protocol approved by the Ethical Committees of the participating institutions, and after written informed consent from all subjects was obtained. The control group consisted of ninety-six healthy volunteers, with no previous history of liver disease or hepatitis infection, matched to the patients with respect to age ($\pm$ 5 years) and gender. They were blood donors who were recruited from the blood bank of the Faculdade Regional de Medicina, São Jose do Rio Preto, São Paulo State, Brazil. Epidemiological data from the study population were collected through a standard interviewer-administered questionnaire, which



included questions about current and past occupational history, daily alcohol intake, years of alcohol intake and family history of liver cirrhosis and cancer. Information on ancestors of the study subjects was also obtained in order to characterize the ethnic background of both groups. The subjects were assigned to one of three ethnic groups: White (European descendents), Mestizo (a mixture of White, Black and Amerindian), and Black (African descendents).

A blood sample was drawn from all of the study participants (7-10 ml each) into sterile 15 ml vacutainers. Lymphocytes were isolated and transferred to new tubes and assigned a unique identifier code. DNA was then extracted from the lymphocytes, as previously described, using a non-organic extraction procedure (47) and stored at -80°C until used for genotyping.

Chemicals and Reagents

All primers used for polymerase chain reaction (PCR) analysis were custom synthesized by GIBCO, BRL (Life technologies, Grand Island, NY). All other chemicals and reagents were from commercial sources and were of the highest purity available, as described in each experimental procedure.

***XRCC1* genotyping**

Genotypic analysis of the *XRCC1* gene polymorphisms was determined in lymphocyte DNA from the study participants by a multiplex

PCR assay, as described in detail earlier (48,49). Briefly, PCR primers for codons 194 and 399 were used to generate a 491-bp product and a 615-bp product containing the *MspI* polymorphic sites (Figure 1). The PCR conditions consisted of an initial melting temperature of 94 °C (5 min) followed by 30 cycles of melting (94 °C, 30 sec), annealing (62 °C, 1 min) and extension (72 °C, 45 sec). A final extension step (72 °C, 5 min) terminated the reaction. The PCR products were then subjected to restriction digestion for 16 hours at 37°C by *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA), which recognizes the wild-type *Arg* allele at codon 194 and the wild-type *Arg* allele at codon 399. The digestion product was then resolved on 2% high-resolution Metaphor® agarose gels (FMC Bioproducts, Rockland, ME) and the different alleles identified by their corresponding banding pattern (48,49).

Statistical analysis

Analyses were performed using the PRISM and Epistat computer software programs. Odds ratios (OR) and 95% confidence limits (CL) were calculated as an estimate of the relative risk and strength of association. The X^2 and the Fisher's exact tests were used to test the statistical significance of the association. The probability level (P) of less than 0.05 was used as the criterion of significance.



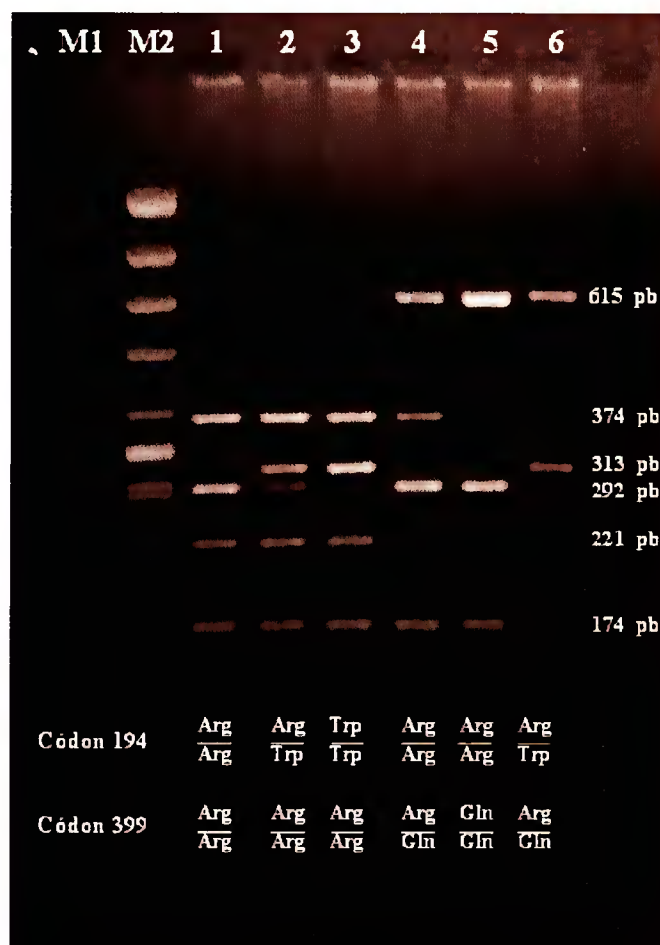


Figure 1. Representative RFLP analysis of *MspI* digests of the multiplex PCR products containing codons 194 and 399 of the *XRCC1* gene separated on 2% high resolution Metaphor® agarose gel. **Lane M1:** PCR molecular weight marker. **Lane M2:** *HincII* digested Φ X174 DNA marker. **Lane 1:** Homozygous wild-type codons 194 and 399. **Lane 2:** Heterozygous codon 194 and homozygous wild type codon 399. **Lane 3:** Homozygous variant codon 194 and homozygous wild type 399. **Lane 4:** Homozygous wild-type codon 194 and Heterozygous wild-type codon 399. **Lane 5:** Homozygous wild-type codons 194 and Homozygous variant codon 399. **Lane 6:** Double heterozygous for codons 194 and 399.

RESULTS

Table I summarizes the demographics of the study population with regard to age and ethnicity. The mean ages of patients and controls ($\pm$ SD) were 47.6 ± 10 years and 44.7 ± 12 years, respectively. The two groups showed no statistically significant difference in mean ages or ethnicity. About half (48.5%) of the patients were younger than 45 years of age. There were a slightly higher number of controls under the age of 45 years compared to cases, but the difference was not statistically significant. The number of Whites was slightly over-represented and the number of Mestizos (a mixture of White, Black and Amerindian) was slightly under-represented in controls compared to cases. However, there were no statistically significant differences between cases and controls, indicating a well-matched population (Table I).

The *XRCC1* genotypes, the distribution of allelic frequencies in patients and controls, and the estimates of relative risks of liver cirrhosis associated with codon 194 and codon 399 polymorphisms are presented in Table II. The data on the distribution of genotypes indicate that the heterozygous *Arg/Trp* genotype for codon 194 was slightly less pronounced in the cases (14.4%) compared to the controls (17.7%), but the difference was not statistically significant. The homozygous *194Trp* genotype was extremely rare, and was only detected in one patient. Four patients and four controls had both the heterozygous genotypes, *Arg/Trp* for codon 194



and *Arg/Gln* for codon 399. The data also indicate that the homozygous wild-type *Arg/Arg* for codon 399 was more pronounced in controls (51%) compared to the cases (38.1%), and that the heterozygous *Arg/Gln* genotype was more pronounced in the cases (49.5%) compared to the controls (34.5%). All of the distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Although there was no difference in the allelic distribution of the *194Trp* and the *399Gln* polymorphisms between cases and controls, a 1.87-fold increase in the risk of liver cirrhosis was associated with the *399Gln* allele (OR = 1.87, 95% CL 0.97-3.60 for the *Arg/Gln* genotype and OR = 1.69, 95% CL 0.92-3.12 for the combined *Arg/Gln* and *Gln/Gln* genotypes). In contrast, there was no association between the *194Trp* polymorphism and the risk of liver cirrhosis (OR = 0.85, 95% CL 0.37-0.94) (Table II).

The *XRCC1* genotypes and allelic frequencies in patients and controls, and the estimates of relative risks of liver cirrhosis associated with *XRCC1* polymorphisms among the study population in the three different ethnic groups are presented in Table III. There was a significant difference in the *399Gln* allelic frequency between Whites and Mestizos ($P = 0.008$). In contrast, no difference in the *399Gln* allelic frequency was observed between Mestizos and Blacks. The *399Gln* allelic frequency was significantly higher among Mestizos with liver cirrhosis compared to their corresponding controls ($P = 0.03$) (Table III). There was no significant

difference in allelic distribution for the *194Trp* allele between the different ethnic groups studied, although Whites had a lower *194Trp* allele frequency (0.068) compared to the other two ethnic groups (0.129 and 0.091 for Mestizos and Blacks, respectively). There was no significant difference in the *194Trp* allelic frequency between liver cirrhosis patients and corresponding controls in any of the different ethnic groups studied (Table III).

Based on the genotypic distribution data, the estimates of the relative risk of liver cirrhosis were calculated for the different ethnic groups (Table III). We observed a 2.8-fold increase in relative risk of liver cirrhosis associated with the *399Gln* genotype (either the heterozygous *Arg/Gln* or the homozygous *Gln/Gln* genotypes) in Mestizos. The risk was higher with the homozygous *Gln/Gln* genotype than with the heterozygous *Arg/Gln* genotype. This association between the *399Gln* genotype and risk for the disease was not observed in Whites (Table III). The *194Trp* polymorphism did not affect the risk of the disease in any of the ethnic groups studied (Table III).

After adjustment for age (Table IV), there was a significant association between the *399Gln* polymorphism (either the heterozygous *Arg/Gln* or the homozygous *Gln/Gln* genotypes) and risk of liver cirrhosis in individuals over the age of 45 years. The OR for this association was 2.74, 95% CL 1.07–7.07 compared to an OR of 1.13, 95% CL 0.48–2.66 for those under 45 years of age. No such association could be detected



between the *194Trp* polymorphism and risk of the disease with respect to age (Table IV).

Table V presents the estimates of the relative risk for liver cirrhosis associated with *XRCC1* polymorphisms after adjusting for the duration and amount of ethanol intake. We observed a 1.95-fold increase in risk associated with the *399Gln* genotypes (*Arg/Gln* and *Gln/Gln*) for individuals consuming alcohol for less than 20 years compared to individuals consuming alcohol for over 20 years. We also found a moderate association between the *399Gln* genotype and risk for the disease in individuals consuming less than 140 gm of alcohol/day compared to individuals consuming more than 140gm/day. In contrast, there was no association between the *194Trp* polymorphism and risk of the disease with respect to the duration or the intensity of alcohol intake (Table V).

DISCUSSION

This study is the first analysis of two reported polymorphisms (*Arg194Trp* and *Arg399Gln*) in the DNA repair gene *XRCC1* in a case-control study of alcoholic cirrhosis of the liver in Southeastern Brazil. It provides estimates of *XRCC1* variant allelic frequencies from a control population belonging to three ethnic groups (Whites, which are mainly European descendants, Mestizos, which are the result of the ethnic mixture of Whites, Blacks and Amerindians, and Blacks).

The data on the allelic frequency distribution revealed apparent differences in the frequencies of both the *194Trp* and the *399Gln* alleles between the three ethnic groups studied. The *194Trp* allelic frequency was lower in Whites compared to Mestizos and Blacks. However, these differences were not statistically significant. The *194Trp* allelic frequency observed in this study is comparable to that reported earlier for a U.S. population of Whites and Blacks in North Carolina, but lower than that observed in Taiwanese (50). In contrast, the *399Gln* allelic frequency was significantly higher ($P=0.008$) in Whites (37%) compared to Mestizos (22%). The *399Gln* allelic frequency in Whites observed in our study, is comparable to that reported earlier for North American Whites by Lunn et al. (50) and Sturgis et al. (51), but different from that observed in Egyptians (48), North American Blacks and Taiwanese (50). These differences



support the likelihood that ethnic variability in *XRCC1* allelic distribution exists among different populations.

Based on the genotypic distribution data, we examined the relationship between *XRCC1* genotypes and relative risk of alcoholic liver disease. Our data indicate that the *194Trp* polymorphism does not play a significant role as a risk modifier for the disease. These results are consistent with those of Lunn et al. (50), who reported that the Arg194Trp amino acid change in the *XRCC1* gene does not seem to affect DNA repair efficiency. In contrast, our data indicate an over representation of the *399Gln* allele in cases compared to controls, suggesting that this polymorphism may modify the risk for the disease. In fact, we observed an overall 1.7- fold increase in risk of alcoholic liver cirrhosis with the *399Gln* polymorphism (combined *Arg/Gln* and *Gln/Gln* genotypes). An association between this particular polymorphism and risk for disease has been reported previously in studies from our laboratory and others. For example, Sturgis et al. (51) reported an association between the *399Gln* polymorphism and elevated risk of squamous cell carcinoma of the head and neck in subgroups of current smokers and alcohol consuming individuals. We have recently reported an association between this polymorphism and increased risk of early age onset of colorectal carcinoma among Egyptians (48). More recently, Divine et al. (52) reported an association between this polymorphism and adenocarcinoma of the lung.



While it is difficult to explain the exact mechanism for the association between the *Arg399Gln* polymorphism and alcoholic liver cirrhosis, it is biologically plausible to assume that the *399Gln* polymorphism may have functional significance in the repair of alcohol-induced genetic lesions. Chronic alcohol consumption is associated with the production of free radical intermediates, such as hydroxyethyl free radicals and reactive oxygen species, which are produced during ethanol metabolism (32). Several reports suggest that free radicals and oxidative stress play an important role in the pathogenesis of alcoholic and toxic liver diseases (26-31). Exposure of cellular DNA to these reactive oxygen species generates several classes of base lesions, many of which are removed by the base excision-repair (BER) pathway. The *XRCC1* gene encodes the XRCC1 protein, which complexes with three other DNA repair enzymes involved in the BER pathway: DNA ligase III, DNA polymerase β , and poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) (42-44). The *XRCC1 399Gln* polymorphism occurs at a conserved sequence, and results in amino acid substitution (36). This strongly suggests that this polymorphism may alter the normal protein function, and consequently may be associated with a reduction in DNA repair capacity. Consistent with this assumption, Lunn et al. (50) reported that placentas from Taiwanese maternity subjects, who were homozygous or heterozygous for the *Arg399Gln* polymorphism in the *XRCC1* gene, had higher levels of aflatoxin DNA adducts and increases in glycophorin A somatic mutations. In addition, using an *in vitro* challenge

approach, we found a significant difference in repair proficiency for genetic damage induced by the tobacco-specific nitrosamine NNK between cells from individuals with the 399Gln allele (either homozygous or heterozygous) and cells from individuals with the homozygous 399 Arg/Arg genotype (49).

One of the aims of our study was to explore the possibility of ethnic differences in *XRCC1* allelic distribution in the Brazilian population, and the likelihood that ethnic differences play a role in determining the risk of alcoholic cirrhosis of the liver. Brazil is a large country with a population that is very heterogeneous, resulting from the hybridization of the native indigenous population with immigrants from Europe, Africa, and Asia. With the relatively small sample studied in the current investigation, a limitation that we acknowledge, we could still observe significant ethnic differences in the frequency of the 399Gln allele in the control population. Although we noted that the frequency of the 399Gln allele was significantly higher in White controls than in Mestizo controls, the frequency of the allele in White patients with liver cirrhosis was not higher than that of White controls. Only in Mestizos, was there a statistically significant difference in the 399Gln allele frequency in the patients compared with controls, suggesting an association between this polymorphism and an increased risk of alcoholic cirrhosis of the liver in this subpopulation. In fact, after adjusting for ethnicity, we found that the risk associated with the 399Gln polymorphism seems to be restricted to Mestizos. This suggests an ethnic-dependent

relationship between the 399Gln polymorphism and predisposition to alcoholic liver cirrhosis.

Although further investigations using a larger number of patients and corresponding controls is needed in order to generalize this conclusion, there are several possible explanations for this differential association between the 399Gln polymorphism and risk of alcoholic liver cirrhosis among Mestizos. One explanation could be ethnic differences in drinking and dietary habits, health care access and socioeconomic factors. Another more plausible explanation may be related to differences in linkage or genetic associations between alleles in different populations. This has been reported for the gene coding for the metabolic enzyme CYP1A1, where people of African descent showed no linkage between the CYP1A1 *2 and CYP1A1 *3 alleles, in contrast to Caucasians and Asians. This suggests that the association between the CYP1A1 *2 homozygous genotype and breast cancer in African American, but not in Caucasian, women (53) is probably due to differences in linkage of the CYP1A1 *2 allele in African Americans to other loci that are functionally related to the effect on breast cancer (54). It is possible that in Mestizos, the 399Gln polymorphism is in linkage disequilibrium with other putative loci, which could include any of a large number of susceptibility genes.

An intriguing observation in the current study is the significantly elevated risk of liver cirrhosis associated with the 399Gln polymorphism in older subjects (OR =2.74; 95%CL 1.07-7.07). These findings suggest that



individuals with this polymorphism may have a reduced ability to repair DNA damage that accumulates with age. It is possible that, in alcoholics, this polymorphism confers a sub-optimal DNA repair capacity that is overwhelmed by excessive alcohol consumption over the years. An age-related decrease in cellular DNA repair capacity is a well-recognized biological phenomenon associated with increased levels of DNA damage and consequent increases in the risk of developing environmental cancers (55-58). Consistent with our hypothesis, Duell et al. (59), found significantly higher levels of DNA adducts among older subjects who were carriers of the 399Gln allele than among younger subjects with the 399Arg/Arg genotype. Divine et al. (52) recently reported an association between the 399Gln allele and increased risk of adenocarcinoma of the lung in smokers. Interestingly, and in support to our findings, they also reported that the risk increased significantly with age.

With respect to ethanol intake, we observed an increase in risk associated with the 399Gln genotypes (Arg/Gln and Gln/Gln) for individuals consuming alcohol for less than 20 years compared to individuals consuming alcohol for over 20 years. We also found a moderate association between the 399Gln genotype and risk for the disease in individuals consuming less than 140 gm of alcohol/day compared to individuals consuming more than 140gm/day. These findings support the hypothesis that the 399Gln polymorphism is a susceptibility factor for alcoholic liver cirrhosis. Liver cirrhosis is a disease primarily associated with

alcohol consumption, and theoretically, individuals who are genetically predisposed to the disease, will develop the disease after relatively minor exposure to the causative agent. Epidemiological studies have shown that the development of alcoholic cirrhosis of the liver correlates with both the magnitude and the duration of alcohol consumption (60,61). The average 'cirrhogenic' dose has been calculated to be 180 g of ethanol per day consumed regularly for approximately 25 years. The probability of developing cirrhosis for an individual consuming about 210 g of ethanol daily for 22 years is 50 per cent and increases to 80 per cent after 33 years (62). Our findings indicate that in susceptible individuals who inherit the 399Gln allele, a lower level of exposure is associated with the health effects expected with higher exposure in the average or non-susceptible population.

In conclusion, our results indicate that the *XRCC1* 399Gln polymorphism may be a significant risk modifier for alcoholic liver cirrhosis as documented by the interactions between the inheritance of this polymorphism and other factors such as age, ethnicity, and alcohol intake. Before our findings can be generalized however, additional studies with a larger population are needed. Nevertheless, the work presented here, is critical to deciding which newly identified genetic polymorphisms in DNA repair genes may have an impact on genetic susceptibility to alcoholic cirrhosis of the liver in different populations. Our study opens the door for

additional investigations aiming at improving primary and secondary prevention of this disease.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr. Marinel M. Ammenheuser for her critical review of the manuscript. This study was supported by grants from PROPP/UNESP, CNPQ, FAPESP (98/01376-2), Brazil and a grant from the University of Texas Medical Branch Sealy Center on Aging.



REFERENCES

1. Lieber, C.S. (1997) Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin. Chim. Acta*, **257**, 59-84.
2. Organización Panamericana de la Salud. (1990) Salud del adulto e del anciano. In: *Las condiciones de salud en las Americas* [Volume 1], OPS, Washington, DC.
3. Pares A., Barrera J.M., Caballeria J., Ercilla G., Brugera M., Caballeria L., Castillo R. and Rodes J. (1990) Hepatitis C virus antibodies in chronic alcoholic patients: association with severity of liver injury. *Hepatology*, **12**, 1295-1299.
4. Mendenhall, C.L., Seef, L., Diehel, A.M., Ghosn, S.J., French, S.W., Gartside, P.S., Rouster, S.D., Buskell-Bales, Z., Grossman, C.J., Roselle, G.A. and The VA Cooperative Study Group (1991) Antibodies to hepatitis B and hepatitis C virus in alcoholic hepatitis and cirrhosis: their prevalence and clinical relevance. The VA Cooperative Study Group (nº 119). *Hepatology*, **14**, 581-589.

5. Corrao, G. and Arico, S. (1998) Independent and combined action of hepatitis C virus infection and alcohol consumption on the risk of symptomatic liver cirrhosis. *Hepatology*, **27**, 914-919.
6. Ostapowicz, G., Watson, K.J., Locarnini, S.A. and Desmond, P.V. (1998) Role of alcohol in the progression of liver disease caused by hepatitis C virus infection. *Hepatology*, **27**, 1730-1735.
7. Lessa, I. (1996) Cirrhosis of the liver in Brazil: mortality and productive years of life lost prematurely. *Bol. Oficina Sanit. Panam.*, **121**, 111-122.
8. Sorensen, T.I.A. (1990) The relationship between alcohol consumption and risk of development of cirrhosis of the liver. *Alcologia*, **2**, 121-126.
9. Day, C.P. (1997) Alcoholic liver disease: dose and threshold - new thoughts on an old topic. *Gut*, **41**, 857-858.
10. Sorensen, T.I.A., Orholm, M., Bentsen, K.D., Hoybye, G., Egghøj, K. and Christoffersen, P. (1984) Prospective evaluation of alcohol abuse and alcoholic liver injury in men as predictors of development of cirrhosis. *Lancet*, **2**, 241-244.

11. Hrubec, A., and Omenn, G.S. (1981) Evidence of genetic predisposition to alcoholic liver cirrhosis and psychosis: twin concordances for alcoholism and its biological end points by zygosity among males veterans. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **5**, 207-215.
12. Reed, T., Page, W.F., Viken, R.J. and Christian, J.C. (1996) Genetic predisposition to organ specific endpoints to alcoholism. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **20**, 1528-1533.
13. Caregaro, L., Albertino, F., Amodio, P., Merkel, C., Bolognesi, M., Angeli, P. and Gatta, A. (1996) Malnutrition in alcoholic and virus-related cirrhosis. *Am. J. Clin. Nutr.*, **63**, 602-609.
14. Couzigou, P., Fleury, B., Groppi, A., Cassaigne, A., Begueret, J. and Iron, A. (1990) Genotyping study of alcohol dehydrogenase class I polymorphism in French patients with alcoholic cirrhosis, The French Group for Research on Alcohol and Liver. *Alcohol Alcohol*, **25**, 623-626.
15. Enomoto, N., Takase, S., Takada, N. and Takada, A. (1991) Alcoholic liver disease in heterozygotes of mutant and normal aldehyde dehydrogenase - 2 genes. *Hepatology*, **13**, 1071-1075.

16. Maezawa, Y., Yamauchi, M., Toda, G., Suzuki, H. and Sakurai, S. (1995) Alcohol-metabolizing enzyme polymorphisms and alcoholism in Japan. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **19**, 951-954.

17. Yamauchi, M., Maezawa, Y., Toda, G., Suzuki, H. and Sakurai, S. (1995) Association of a restriction fragment length polymorphism in the alcohol dehydrogenase 2 gene with Japanese alcoholic liver cirrhosis. *J. Hepatol.*, **23**, 519-523.

18. Groppi, A., Coutelle, C., Fleury, B., Iron, A., Bequeret, J. and Couzigou, P. (1991) Glutathione S-transferase class μ in French alcoholic cirrhotic patients. *Hum. Genet.*, **87**, 628-630.

19. Savolainen, V.T., Pajarinen, J., Perola, M., Pentilla, A. and Karhunen, P.J. (1997) Polymorphism in the cytochrome P450 2E1 gene and the risk of alcoholic liver disease. *J. Hepatol.*, **26**, 55-61.

20. Rodrigo, L., Alvarez, V., Rodriguez, M., Pérez, R., Alvarez, R. and Coto, E. (1999) N-actyltransferase-2, glutathione S-transferase M1, alcohol dehydrogenase, and cytochrome p450IIE1 genotypes in alcoholic liver cirrhosis: a case-control study. *Scand. J. Gastroenterol.*, **34**, 303-307.



21. Tsutsumi, M., Takada, A. and Wang, J-S. (1994) Genetic polymorphisms of cytochrome P4502E1 related to the development of alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, **107**, 1430-1435.

22. Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., Quest, L.J., Allott, R.L., Green, V.J., Gilmore, I.T. and Park, B.K. (1995) Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 and risk of alcoholic liver disease in Caucasians. *Pharmacogenetics*, **5**, 351-357.

23. Agúndez, J., Ladero, J., Díaz-Rubio, M. and Benitez, J. (1996) RsaI polymorphism at the cytochrome P450 2E1 locus it is not related to the risk of alcohol-related severe liver disease. *Liver*, **16**, 303-308.

24. Carr, L.G., Yi, I.S., Li, T.K. and Yin, S.J. (1996) Cytochrome P4502E1 genotypes, alcoholism, and alcoholic cirrhosis in Han Chinese and Atayal Natives of Taiwan. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **20**, 43-46.

25. Lucas, D., Menéz, C., Floch, F., Gourlaouen, Y., Sparfel, O., Joannet, I., Bodénez, P., Jezequel, J., Gouérou, H., Berthou, F., Bardou, L-G. and Menéz, J-F. (1996) Cytochromes P450 2E1 and P450 1A1 genotypes and susceptibility to cirrhosis or upper aerodigestive tract in alcoholic caucasians. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **20**, 1033-1037.



26. Nordmann, R., Ribiere, C. and Rouach, H. (1992) Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Radic. Biol. Med.*, **12**, 219-240.
27. Ishii, H., Kurose, I. and Kato, S. (1997) Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **12**, S272-S282.
28. Lieber, C.S. (1997) Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Adv. Pharmacol.*, **38**, 601-628.
29. Albano, E., French, S.W. and Ingelman-Sundberg, M. (1999) Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Front. Biosci.*, **4**, D533-D540.
30. Fataccioli, V., Andraud, E., Gentil, M., French, S.W. and Rouach, H. (1999) Effects of chronic ethanol administration on rat liver proteasome activities: relationship with oxidative stress. *Hepatology*, **29**, 14-20.
31. Navasumrit, P., Ward, T.H., Dodd, J.F. and O'Connor, P.J. (2000) Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented *in vivo* by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis*, **21**, 93-99.

32. Clot, P., Tabone M., Arico, S. and Albano, E. (1994) Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. *Gut*, **35**, 1637-43.
33. Yamamoto, Y., Yamashita, S., Fujisawa, A., Kokura, S. and Yoshikawa, T. (1998) Oxidative stress in patients with hepatitis, cirrhosis, and hepatoma evaluated by plasma antioxidants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 166-170.
34. Shimoda, R., Nagashima, M., Sakamoto, M., Yamaguchi, N., Hirohashi, S., Yokota, J. and Kasai, H. (1994) Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxideoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res.*, **54**, 3171-3172.
35. Farinati, F., Cardin, R., Degan, P., De Maria, N., Floyd, R.A., Van Thiel, D.H. and Naccarato, R. (1999) Oxidative DNA damage in circulating leukocytes occurs as an early event in chronic HCV infection. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 1284-1291.
36. Shen, M.R., Jones, L.M. and Mohrenweiser, H. (1998) Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.*, **58**, 604-608.



37. Fan, F., Liu, C., Tavare, S. and Arnheim, N. (1999) Polymorphisms in the human DNA repair gene XPF. *Mutat. Res.*, **406**, 115-120
38. Butkiewicz, D., Rusin, M., Harris, C.C. and Chorazy, M. (2000) Identification of four single-nucleotide polymorphisms in DNA repair genes: XPA and XPB (ERCC3) in Polish population. *Hum. Mutat.*, **15**, 577-578.
39. Thomson, L.H., Brookman, K.W., Jones, N.J., Allen, S.A. and Carrano, A.V. (1990) Molecular cloning of the human *XRCC1*, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol. Cell Biol.*, **10**, 6160-6171.
40. Thompson, L.H., Brookman, K.W., Minkler, J.L., Fuscoe, J.C., Henning, A. and Carrano, A.C. (1985) Mediated transfer of human DNA repair gene that controls sister chromatid exchange. *Mol. Cell Biol.*, **5**, 881-884.
41. Mohrenweiser, H.W., Carrano, A.V., Fertitta, A., Perry, B. and Thompson, L.H. (1989) Refined mapping of the three DNA repair genes, *ERCC1*, *ERCC2*, and *XRCC1*, on human chromosome 19. *Cytogenet. Cell Genet.*, **52**, 11-14.
42. Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D.E. and Lindahl, T. (1996) Reconstitution of DNA base excision repair with purified



human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J.*, **15**, 6662-6670.

43. Caldecott, K.W., Aoufouchi, S., Johnson, P. and Shall, S. (1996) XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4387-4394.

44. Thompson, L.H. and West, M.G. (2000) XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutation Res.*, **459**, 1-18.

45. Marintchev, A., Mullen, M.A., Maciejewski, M.W., Pan, B., Gryk, M.R. and Mullen, G.P. (1999) Solution structure of the single-strand break repair protein XRCC1 N-terminal domain. *Nature Struct. Biol.*, **6** 884-893.

46. Rice, P.A. (1999) Holding DNA damage together. *Nature Struct. Biol.*, **6**, 805-806.46.

47. Abdel-Rahman, S.Z., Nouraldeem, A.M. and Ahmed, A.E. (1994) Molecular interaction of 2,3-[14C]-acrylonitrile with DNA in gastric tissues of rat. *J. Biochem. Toxicol.*, **9**, 121-128.

48. Abdel-Rahman, S.Z., Soliman, A S., Bondy, M.L., Omar, S., El-Badawy, S.A., Khaled, H.M., Seifeldin, I.A. and Levin, B. (2000) Inheritance of the 194 Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene *XRCC1* are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett.*, **159**, 79-86.
49. Abdel-Rahman, S.Z. and El-Zein, R.A. (2000) The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene *XRCC1* modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett.*, **159**, 63-71.
50. Lunn, R.M., Langlois, R.G., Hsieh, L.L., Thompson, C. L. and Bell, D.A. (1999) *XRCC1* polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res.*, **59**, 2557-2561.
51. Sturgis, E.M., Castillo, E.J., Li, L., Zheng, R., Eicher, S.A., Clayman, G.L., Strom, S.S., Spitz, M.R. and Wei, Q. (1999) Polymorphisms of DNA repair gene *XRCC1* in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, **20**, 2125-2129.
52. Divine, K.K., Gilliland, F.D., Crowell, R.E., Stidley, C.A., Bocklage, T.J., Cook, D.L. and Belinsky, S.A. (2001) The *XRCC1* 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat. Res.*, **461**, 273-278.

53. Taioli, E., Trachman, J., Chen, X., Toniolo, P. and Garte, S.J. (1995) A CYP1A1 restriction fragment length polymorphism is associated with breast cancer in African-American women. *Cancer Res.*, **55**, 3757-3758.
54. Garte, S. (1998) The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis*, **19**, 1329-1332.
55. Wei, Q., Matanoski, G.M., Farmer, E.R., Hedayati, M.A. and Grossman, L. (1993) DNA repair and aging in basal cell carcinoma: a molecular epidemiology study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1614-1618.
56. Barnett, Y.A. and King, C.M. (1995) An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat. Res.*, **338**, 115-128.
57. Moriwaki, S., Ray, S., Tarone, R.E., Kraemer, K.H. and Grossman, L. (1996) The effect of donor age on the processing of UV-damaged DNA by cultured human cells: reduced DNA repair capacity and increased DNA mutability. *Mutat. Res.*, **364**, 117-123.

58. Wei, Q. (1998) Effect of aging on DNA repair and skin carcinogenesis: a minireview of population-based studies. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **3**, 19-22.
59. Duell, E.J., Wiencke, J. K., Cheng, T-J., Varkonyi, A., Zuo, Z.F., Ashok, T.D.S., Mark, E.J., Wain, J.C., Christiani, D.C. and Kelsey, K.T. (2000) Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis*, **21**, 965-971.
60. Lelbach, W.K. (1976) Epidemiology of alcoholic liver diseases. In: Popper, H. and Schaffner, F. (eds.) *Progress in liver diseases*. Grune and Stratton, New York, pp. 494-515.
61. Becker, U., Deis, A., Sorensen, T.I.A., Gronbaek, M., Borch-Johnsen, K., Muller, C.F., Schnohr, P. and Jensen, G. (1996) Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex and age: a prospective population study. *Hepatology*, **23**, 1025-1029.
62. Lelbach, W.K. (1976) Epidemiology of alcoholic liver disease. *Progr. Liver Dis.*, **5**, 494-515.

TABLES

Table I: Demographic characteristics of the study population

	Cases (n = 97)		Controls (n = 96)	
Age ^a (mean ± SD years)	47.6 ± 10		44.7 ± 12	
	No.	(%)	No	(%)
< 45 year	47	(48.5)	55	(57.3)
> 45 year	50	(51.5)	41	(42.7)
Ethnicity ^a				
Whites	48	(49.5)	58	(60.4)
Mestizos ^b	37	(38.1)	27	(28.1)
Blacks	12	(12.4)	11	(11.5)

^a No significant difference ($P > 0.05$) between cases and controls for either age (independent t -test) or ethnicity (two sided X^2 test).
^b Mixture of White, Black and Amerindian.



Table II: XRCC1 allelic frequencies among liver cirrhosis patients and controls and estimates of relative risk associated with 399Gln and 194Trp genotypes^a.

Genotype	Cases n = 97	Controls n = 96	OR	95% CL
Codon 194 polymorphism				
Arg/Arg	82	79	1.0	
Arg/Trp	14	17	0.69	0.34 – 1.83
Trp/Trp	1	0	ND ^b	
Arg/Trp + Trp/Trp	15	17	0.85	0.37 – 1.94
Trp-allele frequency	0.082	0.088		
Codon 399 polymorphism				
Arg/Arg	37	49	1.0	
Arg/Gln	48	34	1.87	0.97 – 3.60
Gln/Gln	12	13	1.22	0.46 – 3.30
Arg/Gln + Gln/Gln	60	47	1.69	0.92 – 3.12
Gln-allele frequency	0.371	0.312		

^a The homozygous 194Arg/Arg and the 399Arg/Arg genotypes served as reference categories.

^b ND: not determined due to small sample size in that category.



Table III: XRCC1 allelic frequencies and estimates of relative risk for liver cirrhosis associated with 399Gln and 194Trp genotypes in the different ethnic groups^a.

Genotype	Cases	Controls	OR	95% CL
Codon 194 polymorphism				
Whites	48	58		
Arg/Arg	44	50	1.0	
Arg/Trp	4	8	0.6	0.13 – 2.29
Trp/Trp	0	0	ND ^b	
Arg/Trp + Trp/Trp	4	8	0.6	0.13 – 2.29
Trp-allele frequency	0.042	0.068		
Mestizos^c	37	27		
Arg/Arg	29	20	1.0	
Arg/Trp	7	7	0.7	0.18 – 2.64
Trp/Trp	1	0	ND ^b	
Arg/Trp + Trp/Trp	8	7	0.8	0.21 – 2.93
Trp-allele frequency	0.121	0.129		
Blacks	12	11		
Arg/Arg	9	9	1.0	
Arg/Trp	3	2	1.5	0.14 – 2059.0
Trp/Trp	0	0	ND ^b	
Arg/Trp + Trp/Trp	3	2	1.5	0.14 – 2059.0
Trp-allele frequency	0.125	0.091		
Codon 399 polymorphism				
Whites	48	58		
Arg/Arg	17	25	1.0	
Arg/Gln	25	23	1.56	0.64 – 4.03
Gln/Gln	6	10	0.90	0.23 – 3.34
Arg/Gln + Gln/Gln	31	33	1.38	0.58 – 3.28
Gln-allele frequency	0.385	0.370 ^d		
Mestizos^c	37	27		
Arg/Arg	14	17	1.0	
Arg/Gln	17	8	2.58	0.76 – 9.03
Gln/Gln	6	2	3.64	0.52 – 35.8
Arg/Gln + Gln/Gln	23	10	2.79	0.90 – 8.90
Gln-allele frequency	0.392 ^e	0.222 ^{de}		
Blacks	12	11		
Arg/Arg	6	7	1.0	
Arg/Gln	6	3	2.23	0.30 – 19.97
Gln/Gln	0	1	ND ^b	
Arg/Gln + Gln/Gln	6	4	1.75	0.24 – 13.0
Gln-allele frequency	0.250	0.227		

^a The homozygous 194Arg/Arg and the 399Arg/Arg genotypes served as reference categories.

^b ND: not determined due to small sample size in that category.

^c Mestizos: mixture of White, Black and Amerindian.

^d Allelic frequency in control Whites is significantly higher than in control Mestizos (P = 0.008).

^e Allelic frequency in cases are significantly higher than corresponding controls (P < 0.05).



Table IV: XRCC1 genotypic distribution and estimates of relative risk for liver cirrhosis associated with 399Gln and 194Trp genotypes adjusted for age^a.

Variable	Cases n =97	Controls n = 96	OR	95% CL
Codon 194 polymorphism				
Age ≤ 45 years	n = 47	n = 55		
Arg/Arg	39	46	1.00	
Arg/Trp	8	9	1.05	0.33 – 3.34
Trp/Trp	0	0	ND ^b	
Arg/Trp + Trp/Trp	8	9		
Age > 45 years	n =50	n = 41		
Arg/Arg	43	33	1.00	
Arg/Trp	6	8	0.58	0.16 – 2.07
Trp/Trp	1	0	ND ^b	
Arg/Trp + Trp/Trp	7	8	0.67	0.19 – 2.31
Codon 399 polymorphism				
Age ≤ 45 years	n = 47	n = 55		
Arg/Arg	20	25	1.00	
Arg/Gln	22	23	1.20	0.48 – 2.98
Gln/Gln	5	7	0.71	0.16 – 3.11
Arg/Gln + Gln/Gln	27	30	1.13	0.48 – 2.66
Age > 45 years	n =50	n = 41		
Arg/Arg	17	24	1.0	
Arg/Gln	26	11	3.34	1.18 – 9.58
Gln/Gln	7	6	1.64	0.39 – 6.90
Arg/Gln + Gln/Gln	33	17	2.74	1.07 – 7.07

^a The homozygous 194Arg/Arg and the 399Arg/Arg genotypes served as reference categories.
^b: ND: not determined due to small sample size in that category.



Table V: Estimates of relative risk for liver cirrhosis associated with 399Gln and 194Trp genotypes adjusted for alcohol intake^a

Variable	Alcohol Intake			
	Duration of Intake		Daily consumption	
	< 20 years n = 29	>20 years n = 68	< 140 gm n = 38	>140 gm n = 59
<u>Codon 194 polymorphism</u>				
Arg/Arg	26	56	31	51
Arg/Trp	3	11	7	7
Trp/Trp	0	1	0	1
Arg/Trp + Trp/Trp	3	12	7	8
OR (95% CL)	0.54 (0.07-2.3) ^b		1.44 (0.42-4.95) ^c	
<u>Codon 399 polymorphism</u>				
Arg/Arg	8	29	12	25
Arg/Gln	17	32	19	29
Gln/Gln	4	7	7	5
Arg/Gln + Gln/Gln	21	39	26	34
OR (95% CL)	1.95 (0.70-5.60) ^b		1.60 (0.62-4.11)	

^a The homozygous 194Arg/Arg and the 399Arg/Arg genotypes served as reference categories.
^b: OR for individuals consuming alcohol for less than 20 years compared to individuals consuming alcohol for over 20 years.
^c : OR for individuals consuming less than 140 gm alcohol per day compared to individuals consuming more than 140 gm/day.

Discussão

Capítulo Cinco



I. A Suscetibilidade Genética e o Câncer

Há cerca de trinta anos, a suscetibilidade ao câncer era atribuída, principalmente, aos níveis de exposição aos carcinógenos. Embora essa correlação seja efetiva, é evidente a influência de inúmeros fatores biológicos responsáveis pela variabilidade individual, que se apresentam relevantes em várias doenças (Perera, 2000). Hoje, é amplamente aceita a existência de um "fingerprint" característico do indivíduo composto por alelos codificadores das chamadas enzimas metabolizadoras de drogas e daquelas que participam dos mecanismos de reparo do DNA (Nebert, 1997; Shen *et al.*, 1998). Através do estudo da suscetibilidade individual ou de subpopulações, por meio da determinação das frequências dos polimorfismos, que caracterizam diferentes capacidades de metabolização e/ou reparo de DNA, será possível identificar fatores de risco para muitas doenças e também a compreensão dos mecanismos pelos quais elas se desenvolvem (Woodson *et al.*, 1999).

A determinação da capacidade metabólica e/ou de reparo do DNA, poderá auxiliar o indivíduo a optar por um estilo de vida ou tipo e local de trabalho mais saudáveis (Bartsch, 2000). Outro benefício decorrente do conhecimento do papel de diferentes alelos polimórficos, no biometabolismo, refere-se à prescrição individualizada de drogas medicamentosas, a partir da genotipagem individual, podendo assim incrementar a eficácia, diminuir custos e reduzir possíveis efeitos colaterais (Chen *et al.*, 1996; Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999).

Todavia, os avanços obtidos através da tecnologia molecular geram questões éticas que necessitam posicionamento perante à saúde pública e à sociedade (Hainaut & Vähäkangas, 1999; Vineis *et al.*, 1999). Tais questões devem ser antecipadas e estratégias racionais levantadas, na tentativa de contornar a identificação indiscriminada de

indivíduos sob risco aumentado (Garber & Diller, 1993; Patenaude, 1996; Vineis & Malats, 1999). Os indivíduos, porventura submetidos a tais testes, devem estar cientes tanto dos procedimentos como de suas implicações, inclusive psicológicas, para que a prevenção da doença seja objetiva. Há que se considerar ainda, a possibilidade de uma correlação fraca entre genótipo e fenótipo ou de grande variabilidade intraindividual no fenótipo podendo levar ao erro de classificação (Lerman & Croyle, 1995; Holtzman, 1996).

Embora alguns alelos polimórficos estejam convincentemente associados ao risco aumentado para toxicidade e câncer, para outros a associação ainda permanece incerta (Tabela 1). O conjunto de resultados contraditórios, obtidos nas pesquisas sobre a suscetibilidade genética ao câncer demonstra a complexidade da questão, uma vez que a identificação de um genótipo desfavorável pode ser mascarada pela presença de um outro gene não considerado, mas também envolvido no metabolismo ou no reparo de lesões nas biomoléculas. Além disso, os alelos polimórficos de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos têm mostrado distribuição diferencial nas populações investigadas. Essa variação tem sido associada principalmente à composição étnica das mesmas (Caporaso, 1999), contudo abordagens recentes têm incluído também a faixa etária como fator contribuinte (Lieshout & Peters, 1998; Muir *et al.*, 1998).

O conhecimento da distribuição desses polimorfismos na população-alvo permite minimizar o efeito dessas variáveis em estudos que investiguem a interação entre fatores ambientais, "*background*" genético e doenças específicas (Au *et al.*, 1999).

Tabela 1. Avaliação geral de algumas das evidências disponíveis sobre o risco do câncer associado aos polimorfismos do biometabolismo.

	CYP1A1	CYP1A1	CYP2D6	CYP2E1	CYP2E1	GSTM1	GSTT1	NAT1	NAT2
Polimorfismo	Msp I	Exon 7	EM	5' FR	Dra I	Nulo	Nulo	Lento	Lento
Pulmão	+ A (=) C	(+) A (=) C	+ F = G	(-)	(=)	+	(-)	NC	=
Bexiga	(=)	(=)	=	NC	(=)	(+)	(-)	NC	= A + C
Mama	(+)	(+)	(=)	(=)	(=)	(+)	NC	NC	(-) F (=) G
Colorectal	(+)	NC	NC	NC	NC	(+) D (=) O	(+)	(-)	(+) F (=) G
Laringe	(=)	NC	(=)	(=)	(=)	(+)	(+)	NC	NC
Estômago	NC	NC	NC	(=)	NC	NC	(-)	NC	NC
Fígado	NC	NC	(+)	(-)	(=)	NC	NC	NC	(+)
BCC	(=)	(+)	(=)	NC	NC	NC	(+)	NC	NC
Cérebro	NC	NC	(-)	NC	NC	NC	(+)	NC	NC

- + Risco aumentado

= Nenhum efeito

NC Não conclusivo

A Asiáticos

D Porção Distal

F Estudos baseados no fenótipo

G Estudos baseados no genótipo
- (+) Sugestão de risco aumentado

(-) Sugestão de risco reduzido

(=) Sugestão de ausência de efeito

BCC Carcinoma basocelular cutâneo

C Caucasóides

O Outras regiões do cólon

Assim, constituem-se objetivos prementes, a compreensão do modo pelo qual os genes que alteram a suscetibilidade modificam a fisiologia e a bioquímica das vias de sinalização celular e a otimização do uso dessas informações na prática clínica, visando o desenvolvimento de recursos terapêuticos e preventivos (Nebert, 1991; Walker, 1996). Tal objetivo será alcançado por meio da relação interdisciplinar entre a epidemiologia e a biologia molecular, a química analítica e farmacológica, a bioestatística e a genética de populações (Rogers, 1994; Schork *et al.*, 1998). Um exemplo de tal interação são os estudos que relacionam os alelos polimórficos a alguns marcadores de efeito, tais como adutos, aberrações cromossômicas, trocas entre cromátides-irmãs e micronúcleos, entre outros, mediante exposição *in vitro* ou *in vivo* a carcinógenos/mutagênicos, que têm validado os achados epidemiológicos (van Poppel *et al.*, 1992; Conforti-Froes *et al.*, 1997; El-Zein *et al.*, 1997b; Topinka *et al.*, 1997; Villard *et al.*, 1998; Falck *et al.*, 1999; Abdel-Rahman *et al.*, 2000b; Salama *et al.*, 2000). É fundamental ainda, que se intensifiquem as pesquisas para a precisa identificação dos marcadores de suscetibilidade à doenças (Albertini, 1999), não apenas em diferentes populações, ou subgrupos populacionais, como também nas diferentes faixas etárias dos mesmos (Lieshout & Peters, 1998; Schork *et al.*, 1998).

Finalmente, devido ao fato de que tanto os alelos selvagens como os mutantes, têm sido associados ao maior risco para o câncer, estudos em diferentes populações e que controlem um maior número de variáveis, deverão fornecer subsídios para um melhor entendimento do papel dos genes "biometabolizadores" na carcinogênese humana.



II. Polimorfismos das Enzimas Metabolizadoras de Xenobióticos no Brasil

Uma vez que poucos dados sobre as frequências dos polimorfismos dos genes *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1* encontram-se disponíveis na população brasileira, o presente estudo contribui para o estabelecimento da distribuição alélica e genotípica dos mesmos, em indivíduos saudáveis de duas regiões brasileiras distintas. O estado do Pará, no extremo Norte do Brasil, fica cerca de 2.800 quilômetros de distância do estado de São Paulo, Sudeste do país. Durante a colonização do Brasil, esses estados apresentaram história distinta com contribuição desigual dos três principais povos formadores, o que se reflete na composição étnica de suas populações atuais (Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 1995; Carvalho-Silva *et al.*, 2001).

Bodmer & Cavalli-Sforza (1976) propõem que qualquer classificação racial pode ser arbitrária, imperfeita e muito difícil, uma vez que é impossível a delimitação das raças com base em estudos antropológicos, bem como em análises de frequências gênicas. Assim, em grupos altamente heterogêneos, tais como a população brasileira, torna-se inadequado considerar apenas características fenotípicas como a cor da pele e/ou a textura do cabelo, para a determinação da origem étnica (Azevedo *et al.*, 1981). Além disso, estudos moleculares não confirmam os dados do Censo (IBGE, 1999) relacionados à composição étnica da população brasileira (Franco *et al.*, 1982; Santos & Guerreiro *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1996; Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Pelo exposto e devido ao fato de que 38% dos paulistas, classificados como brancos, referiram ascendência africana ou ameríndia e, ainda, que 23% entre os paulistas, classificados como negros, referiram ancestrais caucasóides, optou-se por considerar ambas as populações estudadas, como miscigenadas.

As frequências dos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em duas populações, uma da região Norte e outra da região Sudeste do Brasil, foram determinadas por meio da técnica de PCR multiplex. A distribuição dos genótipos nulos para ambas GSTs foi homogênea entre as populações avaliadas, sendo que o polimorfismo de deleção para o gene *GSTM1* foi de 0.47 na população brasileira como um todo (estados do Pará e São Paulo). Esta frequência é intermediária àquelas previamente descritas para duas populações caucasóides do Sudeste brasileiro (0.55 e 0.60; Arruda *et al.*, 1998; Gattás & Soares-Vieira, 2000) e para uma população negra brasileira (0.33; Arruda *et al.*, 1998). Contudo, tais populações representam apenas uma pequena fração do total da população brasileira. A prevalência do genótipo *GSTT1* nulo obtida neste estudo (0.18) é semelhante àquela descritas para caucasóides brasileiros por Arruda *et al.* (1998).

Interessantemente, as frequências dos genótipos nulos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, obtidas neste estudo, são também similares àquelas descritas para populações com diferentes composições étnicas, tais como os brancos norte-americanos (Bell *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994; Abdel-Rahman *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996; El-Zein *et al.*, 1997a; 1997b; Cheng *et al.*, 1999; Krajcinovic *et al.*, 1999; Sweeney *et al.*, 2000), os chineses e japoneses (Morita *et al.*, 1997; 1999; Gao & Zhang *et al.*, 1999; Setiawan *et al.*, 2000) e os europeus (Alexandrie *et al.*, 1994; Moreira *et al.*, 1996; Oude-Ophuis *et al.*, 1997; Muiras *et al.*, 1998; Steinhoff *et al.*, 2000).

Apesar das diferenças marcantes entre os estados do Pará e do Sudeste com relação à composição étnica, história e distância geográfica, nossos dados não mostraram diferenças significativas nas frequências dos genótipos nulos para os genes *GSTT1* e *GSTM1*.

Por outro lado, os resultados relativos à frequência alélica e distribuição genotípica e haplotípica de ambos polimorfismos do gene



CYP2E1, mostraram diferenças entre as duas populações avaliadas. As freqüências dos alelos *CYP2E1**5B e *CYP2E1**6 foram mais elevadas na população do Norte que na população do Sudeste brasileiro, embora tais diferenças não sejam estatisticamente significantes. A prevalência, neste estudo, do alelo *CYP2E1**5B na população nortista foi significativamente maior que aquela previamente descrita para uma população caucasóide do Sudeste brasileiro. No entanto, quando comparadas apenas as populações do Sudeste do país, essa freqüência foi similar entre a população miscigenada deste estudo (0.06), caucasóides e mulatos (Arruda *et al.*, 1998; Gattás & Soares-Vieira, 2000).

Esta é a primeira investigação sobre a distribuição polimórfica do alelo *CYP2E1**6 em populações brasileiras. A freqüência alélica detectada na população nortista (0.158) é similar àquela publicada por Wu *et al.* (1998) em populações afro-americanas (0.14) porém, é mais alta que àquela observada em nossa população paulista (0.118) que é, por sua vez, comparável àquelas verificadas em uma população de europeus americanos (Stephens *et al.*, 1994) e a outras populações européias (Hirvonen *et al.*, 1993; Ingelman-Sundberg *et al.*, 1993; Persson *et al.*, 1993).

Em concordância com a publicação prévia da literatura pertinente, as freqüências alélicas dos polimorfismos do gene *CYP2E1* (*CYP2E1* *5B and *6), observadas neste estudo, são inferiores àquelas freqüentemente descritas em diversas populações asiáticas (Watanabe *et al.*, 1990; Uematsu *et al.*, 1991; Hildesheim *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 1992; 1995; Stephens *et al.* 1994; Yu *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997; Morita *et al.*, 1997; 1999, Persson *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000), contrastando com o observado em outras populações, principalmente européias (Hirvonen *et al.*, 1993; Ingelman-Sundberg *et al.*, 1993; Stephens *et al.*, 1994; Ladero *et al.*, 1996). Curiosamente, populações miscigenadas que apresentam freqüências elevadas dos alelos polimórficos do gene *CYP2E1* incluem a



chilena (Muñoz *et al.*, 1998; Quinones *et al.*, 1999), a mexicana-americana e a havaiana (LeMarchand *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998).

São raras as investigações que estimaram a distribuição dos haplótipos para os polimorfismos *Pst*I e *Dra*I do gene *CYP2E1*. Neste trabalho, foi possível observar uma frequência mais elevada do haplótipo *5B/*6 na população do Norte quando comparada à frequência do mesmo na população do Sudeste brasileiro. Em verdade, tal achado reflete as diferenças nas frequências alélicas de ambos polimorfismos do gene *CYP2E1* nessas populações. Esse mesmo haplótipo foi ainda o segundo mais comumente estimado nas populações do Norte brasileiro e em uma população ameríndia chilena (Muñoz *et al.*, 1998) enquanto que, no Sudeste brasileiro, o segundo haplótipo mais comum foi o WT/*6. As frequências mais baixas já detectadas para o haplótipo *5B/*6 foram descritas por Stephens *et al.* (1994) em africanos americanos e europeus americanos (> 0.01), em contraste com as altas frequências estimadas em taiwaneses (0.217; Stephens *et al.*, 1994) e em uma população ameríndia chilena (0.25; Muñoz *et al.*, 1998). Neste trabalho, foram estimadas frequências intermediárias, para esse haplótipo, àquelas previamente descritas em ambas populações investigadas. O haplótipo *5B/WT, apenas detectado em uma população taiwanesa (Stephens *et al.*, 1994), foi também estimado em ambas as populações brasileiras.

Diversos autores demonstraram a existência de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos *Dra*I localizado no íntron 6 e o polimorfismo *Pst*I da região 5' promotora do gene *CYP2E1* em diferentes populações (Persson *et al.*, 1993; Hildesheim *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998; Persson *et al.*, 1999). No presente trabalho, foi possível demonstrar que tais alelos encontram-se em forte, porém não estrito, desequilíbrio de ligação em ambas as populações brasileiras.

A prevalência mais elevada dos alelos e haplótipos do



gene *CYP2E1* na população do Norte comparada àquela do Sudeste do Brasil pode ser explicada pela diferente contribuição dos três principais grupos étnicos (caucasóides, principalmente portugueses, negros e ameríndios) na formação das populações atuais. Sabe-se, que a contribuição ameríndia foi maior no Norte enquanto que a migração européia ocorreu, preferencialmente, nas regiões Sul e Sudeste do país (Santos & Guerreiro, 1995; Santos *et al.*, 1996; Carvalho-Silva *et al.*, 2001).

Estudos moleculares recentes vêm corroborando a origem asiática das populações ameríndias (Santos *et al.*, 1999). Desse modo, as frequências alélicas e haplotípicas dos genes CYP, em populações cuja miscigenação inclui populações ameríndias, devem proporcionalmente refletir a contribuição desse grupamento étnico. Em resumo, as diferenças alélicas e haplotípicas dos polimorfismos do gene *CYP2E1* encontradas neste estudo, estão de acordo com a contribuição distinta, histórica e geneticamente documentada, das diferentes etnias para a formação da população altamente heterogênea do Brasil.

Algumas neoplasias específicas, tais como o câncer de pulmão e o de próstata, apresentam incidência e mortalidade diferencial comparando-se as regiões Norte e Sudeste do Brasil. Esse fato deve refletir diferenças na exposição e/ou suscetibilidade a carcinógenos ambientais, sendo ainda necessário o estabelecimento da possível contribuição do gene *CYP2E1* para tal suscetibilidade, em ambas as populações brasileiras. Todavia, uma vez que os fatores ambientais desempenham um papel importante na suscetibilidade ao câncer, as pesquisas futuras devem incluir vias específicas de exposição carcinogênica tais como a dieta, a ocupacional e o estilo de vida, nas diversas populações brasileiras.



III. Cirrose Hepática Alcoólica e os Polimorfismos do Gene *XRCC1*

Este estudo representa a primeira análise de dois polimorfismos descritos no gene de reparo do DNA *XRCC1* (Arg194Trp e Arg399Gln) em um estudo de caso-controle sobre a cirrose hepática alcoólica no Sudeste do Brasil. Nele são apresentadas as estimativas das frequências das variantes alélicas do gene *XRCC1* de uma população controle composta por três diferentes grupos étnicos (**Branços**, principalmente descendentes de Europeus; **Mestiços**, que são resultantes da hibridização entre Brancos, Negros e Ameríndios e **Negros**).

Os dados obtidos revelaram diferenças aparentes nas frequências dos alelos *194Trp* e *399Gln* entre os três grupos étnicos avaliados. A frequência do alelo *194Trp* foi menor nos brancos, comparada àquela obtida para os mestiços e os negros. Contudo, essas diferenças não foram estatisticamente significantes. A frequência do alelo *194Trp*, obtida neste estudo, compara-se àquela anteriormente descrita para as populações branca e negra da Carolina do Norte (Estados Unidos) entretanto, é menor que àquela descrita para taiwaneses (Lunn *et al.*, 1999). Por outro lado, a frequência do alelo *399Gln* foi significativamente maior ($P = 0,008$) em brancos (37%) quando comparada aos mestiços (22%). A frequência do alelo *399Gln*, na população branca deste estudo, compara-se àquela previamente descrita para populações brancas norte-americanas por Lunn *et al.* (1999) e Sturgis *et al.* (1999), contudo diferem daquelas observadas para as populações egípcia (Abdel-Rahman *et al.*, 2000a), norte-americana negra e taiwanesa (Lunn *et al.*, 1999). Tais diferenças contribuem para a probabilidade de que exista variabilidade étnica na distribuição alélica do gene *XRCC1* entre as diferentes populações.

Com base na distribuição genotípica, o presente estudo avaliou a relação entre os genótipos do gene *XRCC1* e o risco relativo

para a cirrose hepática alcoólica. Nossos resultados indicam que o polimorfismo *194Trp* não desempenha papel significativo como modulador de risco para a doença. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Lunn *et al.* (1999), que concluíram que a alteração do aminoácido arginina para triptofano na posição 194 da proteína, parece não afetar a eficiência de reparo do DNA. Por outro lado, os dados obtidos neste estudo mostram uma representação aumentada do alelo *399Gln* nos casos, quando comparados aos controles, sugerindo que esse polimorfismo possa modificar o risco para a doença. De fato, foi observado um aumento global de 1,7 vezes no risco para a cirrose hepática alcoólica associado ao polimorfismo *399Gln* (genótipos *Arg/Gln* e *Gln/Gln* combinados). Outros autores já haviam descrito uma associação entre esse polimorfismo e um aumento no risco para outras doenças. Sturgis *et al.* (1999), por exemplo, descreveram um risco elevado para o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, associado ao polimorfismo *399Gln*, em subgrupos de indivíduos fumantes e consumidores de álcool. Recentemente, outros autores demonstraram ainda uma associação entre esse polimorfismo e o aumento no risco para o carcinoma colorretal (Abdel-Rahman *et al.*, 2000a) e o adenocarcinoma de pulmão (Divine *et al.*, 2001)

Ainda que não seja fácil explicar o exato mecanismo para a associação entre o polimorfismo *Arg399Gln* e a cirrose hepática alcoólica, é biologicamente plausível que o mesmo possa ter um significado funcional no reparo de lesões genéticas induzidas pelo álcool. O consumo crônico do álcool está relacionado à liberação de radicais livres intermediários, tais como os radicais livres hidroxietil e as espécies reativas de oxigênio, que são produzidos durante o metabolismo do etanol (Clot *et al.*, 1994). Vários estudos sugerem que os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio desempenham um papel importante na patogenia das doenças hepáticas tóxicas e alcoólicas (Nordmann *et al.*, 1992; Ishii *et al.*, 1997; Lieber, 1997b; Albano *et al.*, 1999; Fataccioli *et al.*,

1999; Navasumrit *et al.*, 2000). A exposição do DNA a essas espécies reativas de oxigênio gera diversas classes de lesões em suas bases, muitas delas removidas pela via do reparo por excisão de bases (BER). O gene *XRCC1* codifica a proteína XRCC1, que forma um complexo com três outras enzimas envolvidas no reparo do DNA: a DNA ligase III, a DNA polimerase β e a poli(ADP-ribose)polymerase (PARP) (Kubota *et al.*, 1996; Caldecott *et al.*, 1996; Thompson & West, 2000). O polimorfismo 399Gln ocorre em uma sequência conservada e resulta na substituição de aminoácidos (Shen *et al.*, 1998), sugerindo que o mesmo possa afetar a função protéica normal e, conseqüentemente, estar associado com a diminuição na capacidade de reparo do DNA. De acordo com essa suposição, Lunn *et al.* (1999) avaliando placentas de mulheres homozigotas ou heterozigotas para o polimorfismo 399Gln, em uma maternidade em Taiwan, detectaram altos níveis de adutos de DNA gerados pela aflatoxina e, ainda, um aumento das mutações somáticas glicoforina A. Outros autores, utilizando um ensaio *in vitro*, encontraram diferenças significantes na eficiência de reparo dos danos induzidos pela nitrosamina tabaco-específica NNK, entre células de indivíduos portadores do alelo 399Gln (tanto homo quanto heterozigotos) e células de indivíduos homozigotos 399 Arg/Arg (Abdel-Rahman *et al.*, 2000b).

Um dos objetivos deste estudo, foi avaliar a possível variação étnica na distribuição alélica do gene *XRCC1* na população brasileira e a probabilidade de que essa diferença possa desempenhar papel determinante no risco da cirrose hepática alcoólica. O Brasil é um grande país, cuja população é altamente heterogênea, resultado da hibridização das populações indígenas nativas com os imigrantes da Europa, África e Ásia. Embora a amostra avaliada no presente estudo seja relativamente pequena, limitação essa por nós reconhecida, foi possível observar uma diferença estatisticamente significante na freqüência do alelo 399Gln na população controle. Apesar de ter sido possível verificar tal diferença na amostra controle, a freqüência do alelo

399Gln em pacientes brancos, com cirrose hepática alcoólica, não foi elevada quando comparada aos controles brancos. Apenas em indivíduos classificados como mestiços, houve diferença estatisticamente significativa na frequência do alelo 399Gln entre os grupos paciente e controle, sugerindo uma associação entre esse polimorfismo e um aumento no risco para a cirrose hepática alcoólica nessa subpopulação. Realmente, após a análise segundo a etnia, foi possível constatar que o risco associado ao polimorfismo 399Gln parece restrito aos mestiços. Tal fato sugere uma associação étnico-dependente entre o polimorfismo 399Gln e a cirrose hepática alcoólica.

No entanto, para que tal conclusão torne-se generalizada, são necessários ainda estudos adicionais, utilizando um número maior de pacientes e controles. Ainda assim, existem diversas hipóteses para a associação diferencial entre o polimorfismo 399Gln e o aumento no risco de desenvolvimento da cirrose hepática alcoólica entre os Mestiços. Entre elas, estão as possíveis diferenças étnicas nos hábitos alimentares (incluindo a ingestão do álcool), no acesso aos cuidados com a saúde e nos fatores sócio-econômicos. Outra explicação, mais provável, pode estar relacionada à ocorrência de desequilíbrio de ligação entre alelos nas diferentes populações. Tal fato foi previamente descrito para o gene codificador da enzima CYP1A1, onde indivíduos descendentes de africanos não apresentaram ligação entre os alelos CYP1A1*2 e CYP1A1*3, contrariamente aos caucasianos e asiáticos. Isso sugere que a associação entre o genótipo homozigoto para o alelo CYP1A1*2 e o câncer de mama em mulheres africano-americanas (Taioli *et al.*, 1995), e não em caucasianas, deve-se a prováveis diferenças de ligação do alelo CYP1A1*2 a outros locos que sejam funcionalmente relacionados ao seu efeito no câncer de mama, em africano-americanas (Garte, 1998). Desse modo, é possível que nos Mestiços o alelo 399Gln esteja em desequilíbrio de ligação com outro suposto loco, incluído entre qualquer um dos vários genes que conferem suscetibilidade.



Um outro resultado interessante deste estudo, refere-se ao risco significativamente aumentado para a cirrose hepática, associado ao polimorfismo 399Gln, em indivíduos com idade mais avançada (OR =2.74; 95%CL 1.07-7.07). Esse achado sugere que os indivíduos portadores desse polimorfismo podem apresentar capacidade reduzida de reparo nos danos ao DNA, acumulados com a idade. É possível ainda que, em abusadores de álcool, esse polimorfismo confira uma capacidade inadequada de reparo do DNA, que seria então sobrecarregada pelo consumo excessivo do álcool, com o passar do anos. A diminuição na capacidade de reparo do DNA relacionada ao envelhecimento, constitui um fenômeno biológico reconhecido e previamente associado ao aumento nos níveis de danos à molécula de DNA, com conseqüente aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias de etiologia ambiental (Wei *et al.*, 1993; Barnett & King, 1995; Moriwaki *et al.*, 1996; Wei, 1998). Em concordância com os dados obtidos neste estudo, Duell *et al.* (2000), encontraram níveis de adutos de DNA significativamente aumentados entre indivíduos com maior idade, portadores do alelo 399Gln, comparados aos indivíduos jovens portadores do genótipo 399Arg/Arg. Recentemente, Divine *et al.* (2001) descreveram uma associação entre o alelo 399Gln e o aumento no risco do adenocarcinoma de pulmão. Curiosamente, e em concordância com os achados deste estudo, esses autores também referiram uma relação positiva entre o risco à doença e o aumento da idade.

Com relação ao consumo do álcool, foi observado um aumento do risco de cirrose hepática associado ao genótipo 399Gln (Arg/Gln e Gln/Gln) em indivíduos que fizeram uso do álcool por menos de 20 anos, quando comparados àqueles que o fizeram por mais de 20 anos. Foi observada ainda, uma associação moderada entre os genótipos 399Gln e o risco dessa doença nos indivíduos que ingeriram menos que 140 gramas de álcool por dia, quando comparados àqueles que o fizeram em quantidades superiores a 140 gramas por dia. Esses dados apóiam a

hipótese de que o polimorfismo *399Gln* é um fator de suscetibilidade para o desenvolvimento da cirrose hepática alcoólica. A cirrose hepática é uma doença principalmente relacionada ao consumo de álcool e, teoricamente, os indivíduos geneticamente suscetíveis à essa doença, irão desenvolvê-la após exposição, relativamente reduzida, ao agente causador. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o desenvolvimento da cirrose alcoólica está correlacionado tanto à magnitude como à duração do consumo de álcool (Lelbach, 1976a; Becker *et al.*, 1996). A dose média capaz de causar a doença tem sido estimada em 180 gramas de etanol, consumidos regularmente por aproximadamente 25 anos. A probabilidade de desenvolvimento da cirrose para um indivíduo que consome cerca de 210 gramas diárias de etanol por 22 anos é de cinquenta por cento e aumenta para oitenta por cento após 33 anos de consumo (Lelbach, 1976b). Nossos resultados indicam que, nos indivíduos suscetíveis, que herdaram o alelo *399Gln*, um nível menor de exposição está relacionado aos efeitos adversos observados, em situações de alta exposição, na média populacional não suscetível.

Em resumo, os dados aqui obtidos indicam que o polimorfismo *399Gln* do gene *XRCC1* pode ser um modulador de risco importante na suscetibilidade à cirrose hepática alcoólica, conforme demonstrado pelas interações entre a herança desse polimorfismo e outros fatores como a idade, a etnia e o consumo de álcool. Contudo, antes que esses resultados possam ser generalizados, serão necessárias pesquisas adicionais que avaliem grandes grupos populacionais. De qualquer modo, as informações aqui obtidas são relevantes para as decisões futuras quanto à escolha dos polimorfismos genéticos, recentemente identificados, que poderão ter impacto na suscetibilidade genética à cirrose hepática alcoólica, em diferentes populações. Este trabalho é precursor, portanto, de uma estratégia investigativa que objetive a melhoria na prevenção primária e secundária dessa doença.

Conclusões

Capítulo Seis

Os dados obtidos para as populações do Norte e do Sudeste do Brasil, em relação aos polimorfismos *Pst*I e *Dra*I no gene *CYP2E1*, revelaram freqüências alélicas e haplotípicas mais elevadas na população paraense quando comparadas àquelas obtidas para a população paulista. Essas freqüências mostraram-se intermediárias entre àquelas descritas para populações asiáticas e européias ou norte-americanas. Tais diferenças estão de acordo com a contribuição distinta das diferentes etnias para a formação da população altamente heterogênea do Brasil. Em relação aos polimorfismos nos genes *GSTT1* e *GSTM1*, as freqüências dos genótipos nulos são bastante semelhantes entre ambas as populações e também àquelas encontradas nas mais diversas populações, independentemente de seu grau de miscigenação.

Os resultados obtidos para a população-referência do Sudeste brasileiro, em relação aos polimorfismos no gene de reparo do DNA *XRCC1*, revelaram diferenças nas freqüências dos alelos *194Trp* e *399Gln* entre brancos e mestiços. O alelo *194Trp* mostrou-se menos freqüente entre os brancos quando comparados aos mestiços, enquanto a freqüência do alelo *399Gln* revelou-se elevada nos brancos em relação aos mestiços. Ambos os polimorfismos apresentaram freqüências distintas daquelas descritas para as populações egípcia, negra norte-americana e taiwanesa. Esses dados sugerem a existência de variabilidade étnica na distribuição desses alelos entre diferentes populações.

No presente estudo, o alelo *399Gln* do gene *XRCC1* conferiu maior risco para a cirrose alcoólica, principalmente entre os indivíduos classificados como mestiços. Esse resultado sugere uma associação étnico dependente entre o risco de desenvolvimento dessa doença e o polimorfismo *399Gln* do gene *XRCC1*. O alelo *194Trp*, por



sua vez, não modificou o risco para a cirrose hepática alcoólica nos etilistas investigados.

Dentre as variáveis de risco avaliadas para cirrose hepática, o fator idade mostrou-se associado ao polimorfismo 399Gln oferecendo risco significativamente aumentado de desenvolvimento da doença para os etilistas cirróticos com idades superiores a 45 anos. Adicionalmente, as variáveis tempo e quantidade de consumo do álcool, associadas ao polimorfismo 399Gln, conferiram aumento moderado no risco de desenvolvimento da doença entre aqueles que consumiram o etanol por menos de 20 anos em quantidades inferiores a 140 gramas por dia.

Assim sendo, este estudo demonstra, pela primeira vez, que os polimorfismos em genes de reparo podem ser considerados modificadores de risco significativos para a cirrose hepática alcoólica, conforme evidenciado pelas interações do alelo 399Gln do gene *XRCC1* com outros fatores, tais como a idade, etnia e o consumo de álcool. Desse modo, nossos dados contribuem para a melhor compreensão da suscetibilidade genética às doenças hepáticas crônicas, fornecendo subsídios para o estabelecimento de estratégias de prevenção, em futuro próximo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, S. Z., EL-ZEIN, R. A., ANWAR, W. A., AU, W. W. 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., ANWAR, W. A., ABDEL-AAL, W. E., MOSTAFA, H. M., AU, W. W. *GSTM1* and *GSTT1* genes are potential risk modifiers for bladder cancer. *Cancer Detect.Prev*, v. 22, p. 129-138, 1998.
- ABDEL-RAHMAN, S. Z., SOLIMAN, A. S., BONDY, M. L., OMAR, S., EL-BADAWY, S. A., KHALED, H. M., SEIFELDIN, I. A., LEVIN, B. Inheritance of the 194 Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene *XRCC1* are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett.*, v.159, p.79-86, 2000a.
- ABDEL-RAHMAN, S.Z., SALAMA, S.A., AU, W.W., HAMADA, F.A. Role of polymorphic *CYP2E1* and *CYP2D6* genes in NNK-induced chromosome aberrations in cultured human lymphocytes. *Pharmacogenetics*, 10: 239-249, 2000b.
- ALBANO, E., FRENCH, S. W., INGELMAN-SUNDBERG, M. Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Front. Biosci.*, v.4, D533-D540, 1999.
- ALBERTINI, R. J. Biomarker responses in human populations: towards a worldwide map. *Mutat. Res.*, v. 428, p. 217-26, 1999.

- ALEXANDRIE, A.-K., INGELMAN-SUNDBERG, M., SEIDEGARD, J., TORNLING G., RANNUG A. Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on *CYP1A1* and *GSTM1*: a study on best factors in relation to age of onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis*, v.15, p.1785-90, 1994.
- AMES, B. N., GOLD, L. S., WILLETT, W. C. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.92, p.5258-65, 1995.
- ANWAR, W.A. Chemical interaction: enhancement and inhibition of clastogenicity. *Environ. Health Perspect.*, v.101, p.203-6, 1993.
- ANWAR, W. A., ABDEL-RAHMAN, S. Z., EL-ZEIN, R., MOSTAFA, H. M., AU, W. W. Genetic polymorphism of *GSTM1*, *CYP2E1* and *CYP2D6* in Egyptian bladder cancer patients. *Carcinogenesis*, v.17, p.1923-29, 1996.
- ARRUDA, V. R., GRIGNOLI, C. E., GONÇALVES, M. C., SOARES M. C., MENEZES R., SAAD S. T., COSTA F. F. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase um (*GSTM1*) and theta (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clin. Genet.*, v.54, p.210-4, 1998.
- AU, W. W., SIERRA-TORRES, C. H., CAJAS-SALAZAR, N., SALAMA, S. A. Inheritance of polymorphic metabolizing genes on environmental disease and quality of life. *Mutat. Res.*, v.428, p.131-40, 1999.
- AZEVEDO, E. S., SILVA, K. M, SILVA, M. C., LIMA, A. M., FORTUNA, C. M., SANTOS, M.G. Genetic and anthropological studies in the island of Itaparica, Bahia, Brazil. *Hum. Hered.*, v.31, p.350-7, 1981.
- BARNETT, Y.A., KING, C.M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat. Res.*, v.338, p.115-28, 1995.

- BARTSCH, H., HIETANEN, E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. *Environ. Health Perspect.*, v.104, p.569-77, 1996.
- 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.255-79, 2000.
- BECKER, U., DEIS, A., SORENSEN, T. I. A., GRONBAEK, M., BORCH-JOHNSEN, K., MULLER, C. F., SCHNOHR, P., JENSEN, G. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex and age: a prospective population study. *Hepatology*, v.23, p.1025-9, 1996.
- BELL, D. A., TAYLOR, J. A., PAULSON, D. F., ROBERTSON, C. N., MOHLER, J. L., LUCIER, G. W. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, v.85, p.1159-64, 1993.
- BENHAMOU, S., SARASIN, A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mutat. Res.*, v.462, p.149-58, 2000.
- BOARD, P., COGGAN, M., JOHNSTON, P., ROSS, V., SUZUKI, T., WEBB, G. Genetic heterogeneity of the human glutathione S-transferases, a complex of gene families. *Pharmacol. Ther.*, v.48, p.357-69, 1990.
- BODMER, W. F., CAVALLI-SFORZA, L. L. Genetics, evolution, and man. San Francisco, Freeman, 1976.
- BOHR, V. A. DNA repair fine structure and its relation to genomic instability. *Carcinogenesis*, v.16, p. 2885-92, 1995.
- BOIS, F., KROWECH, G., ZEISE, L. Modeling human interindividual variability in metabolism and risk: the example of 4-aminobiphenyl. *Risk Analysis*, v.15, p.201-13, 1995.

- BORK, P., HOFMANN, K., BUCHER, P., NEUWALD, A. F., ALTSCHUL, S. F., KOONIN, E. V. A. superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J.*, v.11, p.68-76, 1997.
- BOUCHARDY, C., HIRVONEN, A., COUTELLE, C., WARD, P. J., DAYER, P., BENHAMOU, S. Role of alcohol dehydrogenase 3 and cytochrome P-4502E1 genotypes in susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract. *Int. J. Cancer*, v.87, p.734-40, 2000.
- BROCKMÖLLER, J., KERB, R., DRAKOULIS, N., NITZ, M., ROOTS, I. Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class μ isoenzymes and ψ in lung cancer patients and controls. *Cancer Res.*, v.53, p.1004-11, 1993.
- BROCKMÖLLER, J., KERB, R., DRAKOULIS, N., STAFFELDT B., ROOTS I. Glutathione S-transferase *M1* and its variants A and B as host factors of bladder cancer susceptibility: a case-control study. *Cancer Res.*, v.54, p.4103-11, 1994.
- BROCKMÖLLER, J., CASCORBI, I., KERB, R., ROOTS I. Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases *M1* and *T1*, epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res.*, v.56, p.3915-25, 1996.
- BUETLER, T. M., EATON, D. L. Glutathione S-transferases: amino acid sequence comparison, classification and phylogenetic relationship. *Environ. Carcinogen. Ecotoxicol. Rev.*, v.C10, p.181-203, 1992.
- BUTKIEWICZ, D., RUSIN, M., HARRIS, C. C., CHORAZY, M. Identification of four single-nucleotide polymorphisms in DNA repair genes: XPA and XPB (ERCC3) in Polish population. *Hum. Mutat.*, v.15, p.577-8, 2000.

- BUTLER, W. J., RYAN, P., ROBERTS-THOMSON, I.C. Metabolic genotypes and risk for colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v.16, p.631-5, 2001.
- CALDECOTT, K. W., MCKEOWN, C. K., TUCKER, J.D., LJUNGQUIST, S., THOMPSON, L. H. An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Mol. Cell Biol.*, v.14, p.68-76, 1994.
- CALDECOTT, K. W., TUCKER, J.D., STANKER, L. H., THOMPSON, L. H. Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells. *Nucleic Acids Res.*, v.24, p.4387-94, 1995.
- CALDECOTT, K. W., AOUFOUCHI, S., JOHNSON, P., SHALL, S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res.*, v.24, p.4387-94, 1996.
- CAPELLI, E., TAYLOR, R., CEVASCO, M., ABBONDANDOLO, A., CALDECOTT, K., FROSINA, G. Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.23970-5, 1997.
- CAPORASO, N. Selection of candidate genes for population studies. In: IARC Scientific publications. **Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer**. Lyon, 1999, p. 23-36.
- CARRIERE, V., BERTHOU, F., BAIRD, S., BELLOC, C., BEAUNE, P., DE WAZIERS, I. Human cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), from genotype to phenotype. *Pharmacogenetics*, v.6, p. 203-11, 1996.
- CARVALHO-SILVA, D.R., SANTOS, F. R., ROCHA, J., PENA, S. D. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am. J. Hum. Genet.*, v.68, p.281-6, 2001.



- CHEN, C. L., LIU, Q., RELLING, M. V. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase *M1* and *T1* polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics*, v.6, p.187-91, 1996.
- CHENG, L., STURGIS, E. M., EICHER, S. A. CHAR D., SPITZ M. R., WEI, Q. Glutathione S-transferase polymorphism and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer*, v.84, p.220-4, 1999.
- CLEAVER, J. E., KRAEMER, K. H. Xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome. In: Scriver, C. R., Beudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. v.3, 1995, p. 4393-4419.
- CLOT, P., TABONE M., ARICO, S., ALBANO, E. Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. *Gut*, v.35, p.1637-43, 1994.
- COLES, B., KETTERER, B. The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, v.25, p.47-53, 1990.
- CONFORTI-FROES, N., EL-ZEIN, R., ABDEL-RAHMAN, S. Z., ZWISCHENBERGER, J. B., AU, W. W. Predisposing genes and increased chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers. *Mutat. Res.*, v.379, p.53-9, 1997.
- DALY, A. K., CHOLERTON, S, GREGORY, W., IDLE, J. R. Metabolic polymorphisms. *Pharmac. Ther.*, v.57, p.129-60, 1993.
- DALY, A. K., CHOLERTON, S., ARMSTRONG, M., IDLE, J. R. Genotyping for polymorphisms in xenobiotic metabolism as a predictor of disease susceptibility. *Environ. Health Perspect.*, v.102, p.55-61, 1994.



- DAVID, D. L., MUIR, C. Estimating avoidable causes of cancer. *Environ. Health Perspect.*, v.103, p.301-6, 1996.
- DEAKIN, M., ELDER, J., HENDRICKSE, C., PECKHAM, D., BALDWIN D., PANTIN C., WILD N., LEOPARD P., BELL D. A., JONES P., DUNCAN H., BRANNIGAN K., ALLDERSEA J., FRYER A. A., STRANGE R. C. Glutathione S-transferase *GSTT1* genotypes and suscetibility to cancer: studies of interaction with *GSTM1* in lung, oral, gastric, and colorectal cancers. *Carcinogenesis*, v.17, p.881-4, 1996.
- DIVINE, K. K., GILLILAND, F. D., CROWELL, R. E., STIDLEY, C. A., BOCKLAGE, T. J., COOK, D. L., BELINSKY, S. A. The *XRCC1* 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat. Res.*, v.461, p.273-8, 2001.
- DUELL, E. J., WIENCKE, J. K., CHENG, T-J., VARKONYI, A., ZUO, Z. F., ASHOK, T. D. S., MARK, E. J., WAIN, J. C., CHRISTIANI, D. C., KELSEY, K. T. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis*, v.21, p.965-71, 2000.
- DULIC, A., BATES, P. A., ZHANG, X., MARTIN, S. R., FREEMONT, P. S., LINDAHL, T., BARNES, D. E. BRCT domain interactions in the heterodimeric DNA repair protein XRCC1-DNA ligase III. *Biochemistry*, v.40, p.5906-13, 2001
- EL-ZEIN, R., ZWISCHENBERGER, J. B., ABDEL-RAHMAN, S. Z., SANKAR, A. B., AU, W. W. Polymorphism of metabolizing genes and lung cancer histology: prevalence of *CYP2E1* in adenocarcinoma. *Cancer Lett.*, v.112, p. 71-8, 1997a.
- EL-ZEIN, R., CONFORTI-FROES, N. D. T., AU, W. W. Interactions between genetic predisposition and environmental toxicants for development of lung cancer. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.30, p.196-204, 1997b.

- EUBANKS, M. Biomarkers: the clues to genetic susceptibility. *Environ. Health Perspect.*, v.102, p. 50-6, 1994.
- FALCK, G.C-M., HIRVONEN, A., SCARPATO, R. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat. Res.*, v.441, p.225-37, 1999.
- FAN, F., LIU, C., TAVARE, S., ARNHEIM, N. Polymorphisms in the human DNA repair gene XPF. *Mutat. Res.*, v.406, p.115-20, 1999.
- FATACCIOLI, V., ANDRAUD, E., GENTIL, M., FRENCH, S. W., ROUACH, H. Effects of chronic ethanol administration on rat liver proteasome activities: relationship with oxidative stress. *Hepatology*, v. 29, p.14-20, 1999.
- FEIGELSON, H. S., ROSS, R. K., YU, M. C., COETZEE, G. A., REICHARDT, J. K., HENDERSON, B. E. Genetic susceptibility to cancer from exogenous and endogenous exposures. *J. Cell Biochem. Suppl.*, v. 25, p.15-22, 1996.
- FORD, E. B. Polymorphism and taxonomy. In: J. Huxley (org.) **The new systematics**. Clarendon Press, 1940.
- FRANCO, M. H. L. P, WEIMER, T. A., SALZANO, F. M. Blood polymorphisms and racial admixture in two Brazilian populations. *Am. J. Phys. Anthropol.*, v.58, p.127-32, 1982.
- GARBER, J. E. & DILLER, L. Screening children at genetic risk of cancer. *Curr. Opin. Pediatr.*, v.5, p.712-15, 1993.
- GARTE, S.J., TRACHMAN, F., CROFTS, F., TONIOLO P., BUXBAUM J., BAYO S., TAIOLI E. Distribution of composite CYP1A1 genotypes in Africans, African-Americans and Caucasians. *Hum. Hered.*, v. 46: 121-7, 1996.

- GAO, Y. T., ZHANG, Q. Polymorphism of the GSTM1 and CYP2D6 genes associated with susceptibility to lung cancer in Chinese. *Mutat. Res.*, v.444, p. 441-9, 1999.
- GARTE, S. The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis*, v.19, p.1329-32, 1998.
- GATTÁS, G.J., SOARES-VIEIRA, J.A. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. *Occup Med*, v.50, p.508-11, 2000.
- GILLILAND, F.D. Ethnic differences in cancer incidence: a marker for inherited susceptibility? *Environ. Health Perspect.*, v.105, p.897-900, 1997.
- GONZALEZ, F. J. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.*, v.40, p.243-88, 1989.
- GONZALEZ, F. W. Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmacol. Ther.*, v.45, p.1-38, 1990.
- GONZALEZ, F.W., NEBERT, D.W. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet.*, v.6, p.182-86, 1990.
- GONZALEZ, F. J., GELBOIN, H. V. Role of the human cytochrome P 450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab. Ver.*, v.26, p.165-183, 1994.
- GUENGERICH, F. P. Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.*, v.48, p.2946-54, 1988.



- GUENGERICH, F. P, KIM, D-H, IWASAKI, M. Role of human P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.*, v.4, p.168-79, 1991.
- GUENGERICH, F. P. Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacol. Ther.*, v.54, p.17-61, 1992.
- GUENGUERICH, F. P. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, v.21, p.345-51, 2000.
- HAINAUT, P. & VÄHÄKANGAS, K. Genetic analysis of metabolic polymorphisms in molecular epidemiological studies: social and ethical implications. In: **Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer**. IARC Scientific publications, 148. Lyon, 1999. pp. 395-402.
- HANNA, E., MACLEOD, S., VURAL, E., LANG, N. Genetic deletions of glutathione-S-transferases as a risk factor in squamous cell carcinoma of the larynx: a preliminary report. *Am. J. Otolaryngol.*, v.22, p. 121-3, 2001.
- HARTWELL, L. H., WEINERT, T. A. Checkpoints: Controls that assure the order of cell cycle events. *Science*, v.246, p.629-33, 1989.
- HAYASHI, S-I., WATANABE, J., KAWAJIRI, K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J. Biochem.*, 110: 559-565, 1991.
- HAYES, J. D., PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, v.31, p. 445-600, 1995.
- HAYES, R. B. Genetic susceptibility and ocupacional cancer. *Med. Lav.*, v.86, p.206-13, 1995.



- HEAGERTY, A.H.M., FITZGERALD, D., SMITH, A. BOWERS B., JONES P., FRYER A.A., ZHAO L., ALLDERSEA J., STRANGE R.C. Glutathione S-transferase *GSTM1* phenotypes and protection against cutaneous tumors. *Lancet*, v.343, p.266-8, 1994.
- HIGUCHI, R. G., OCHMAN, H. Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res.*, v.17, p.5865, 1989.
- HILDESHEIM, A., CHEN, C-J., CAPORASO, N. E., CHENG, Y-J., HOOVER, R. N., HSU, M-M., LEVINE, P. H., CHEN, I-H., CHEN, J-Y., YANG, C-S., DALY, A. K., IDLE, J. R. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma, Results from a case-control study conducted in Taiwan. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.*, v.4, p. 607-10, 1995.
- HIRVONEN, A., HUSGAFVEL-PURSIANEN, K., KARJALAINEN, A., ANTILLA, S., VAINIO, H. The human *CYP2E1* gene and lung cancer: Dra1 and Rsa1 restriction lenght polymorphisms in a Finnish study population. *Carcinogenesis*, v.14, p.85-8, 1993.
- HIRVONEN, A. Genetic factors in individual response to environmental exposures. *JOEM*, v.37, p.37- 43, 1995.
- HOLTZMAN, N. A. Are we ready to screen for inherited susceptibility to cancer? *Oncology*, v.10, 57-64, 1996.
- HU, J. J., SMITH, T. R., MILLER, M. S., MOHRENWEISER, H. W., GOLDEN, A., CASE, L.D. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*, v.22, p.917-22, 2001.
- HUSSAIM, S. P., HARRIS, C.C. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.*, v.58, p.4023-37, 1998.



- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Síntese de Indicadores Sociais, 1999. <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 17 jul. 2001.
- IDLE, J. Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? *Mutat. Res.*, v.247, p.259-66, 1991.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Coordenação de Programas de Controle de Câncer – PRO-ONCO, 1996-2001. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/>>. Acesso em: 16 jul. 2001.
- INGELMAN-SUNDBERG, M., JOHANSSON, I., YIN, H., TERELIUS, Y., ELIASSON, E., CLOT, P., ALBANO, E. Ethanol-inducible cytochrome P4502E1: genetic polymorphism, regulation, and possible role in etiology of alcohol-induced liver disease. *Alcohol*, v.10, p.447-52, 1993.
- INGELMAN-SUNDBERG, M., OSCARSON, M., MCLELLAN, R. A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *TIPS*, v.20, p.342-46, 1999.
- ISHII, H., KUROSE, I., KATO, S. Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v.12, p.S272-S282, 1997.
- JAHNKE, V., MATTHIAS, C., FRYER, A., STRANGE, R. Glutathione S-transferase and cytochrome-P-450 polymorphism as risk factors for squamous cell carcinoma of the larynx. *Am. J. Surg.*, v.172, p.671-3, 1996.
- JENSEN, O.M. Susceptibility to cancer: some examples from epidemiology. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, v.8, p.399-404, 1983.



- JOURENKOVA-MIRONOVA, N., VOHO, A., BOUCHARDY, C. WIKMAN H., DAYER P., BENHAMOU S., HIRVONEN A. Glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes and the risk of smoking-related oral and pharyngeal cancers. *Int J Cancer*, v.81, p.44-8, 1999.
- KADERLIK, K. R., KADLUBAR, F. F. Metabolic polymorphism and carcinogen-DNA adduct formation in human populations. *Pharmacogenetics*, v.5, p.S108-S117, 1995.
- KATO, S., SHIELDS, P. G., CAPORASO, N. E., HOOVER, R. N., TRUMP, B. F., SUGIMURA, H., WESTON, A., HARRIS, C. C. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res.*, v.52, p.6712-5, 1992.
- KATO, S., BOWMAN, D. E., BLOMEKE, B., WESTON, A., SHIELDS, P. G. 7-Alkyl-deoxyguanosine (7-alkyl-dGp) adduct formation in human lung and cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) genetic polymorphisms. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, v.34, p. 144-8, 1993.
- KATO, S., SHIELDS, G., CAPORASO, N., SUGIMURA, H., TRIVERS G. E., TUCKER M. A., TRUMP B F., WESTON A., HARRIS C. C. Analysis of cytochrome p450 2E1 genetic polymorphisms in relation to human lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.3, p.515-18, 1994.
- KATO, S., BOWMAN, E.D., HARRINGTON, A. M., BLOMEKE, B., SHIELDS, P. G. Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.87, p. 902-7, 1995.

- KATOH, T., NAGATA, N., KURODA, Y., ITOH H., KAWAHARA A., KUROKI N., OOKUMA R., BELL D. A. Glutathione S-transferase *M1* (*GSTM1*) and *T1* (*GSTT1*) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, v.17, p.1855-9, 1996.
- KATOH, T., KANEKO, S., KOHSHI, K., MUNAKA, M., KITAGAWA, K., KUNUGITA, N., IKEMURA, K., KAWAMOTO, T. Genetic polymorphisms of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and oral cavity cancer. *Int. J. Cancer*, v.83, p.606-9, 1999.
- KALOW, W. Pharmacogenetics: Heredity and the response to drugs. Philadelphia: Saunders, 1962, pp. 1-231.
- KETTERER, B. Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, v.202, p.343-48, 1988.
- KIM, R. B., O'SHEA, D., WILKINSON, G. R. Interindividual variability of chlorzoxazone 6-hydroxylation in men and women and its relationship to CYP2E1 genetic polymorphisms. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v. 57, p. 645-49, 1995.
- KISS, I., SANDOR, J., PAJKOS, G., HEGEDUS, G., EMBER, I. Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase M1 enzymes. *Anticancer Res.*, v.20, p.519-22, 2000.
- KNUDSON, A. G. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res.*, v. 45, p.1437-43, 1985.
- KNUDSON, A. G. Overview: genes that predispose to cancer. *Mutat. Res.*, v.247, p.185-190, 1991.
- KOLODNER, R. D. Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem. Sci.*, v.20, p.397-401, 1995.

- KRAJINOVIC, M., LABUDA, D., RICHER, C., KARIMI, S., SINNETT, D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood*, v.93, p.1496-1501, 1999.
- KROEMER, H., EICHELBAUM, M. Molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. *Life Sciences*, v.56, p.2285-98, 1995.
- KUBOTA, Y., NASH, R.A., KLUNGLAND, A., SCHAR, P., BARNES, D.E. AND LINDAHL, T. Reconstitution of DNA base excision repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J.*, v.15, p.6662-70, 1996.
- LADERO, J. M., AGÚNDEZ, J. A. G., RODRIGUEZ-LESCURE, A., DIAZ-RUBIO, M., BENITEZ, J. *RsaI* polymorphism at the cytochrome P4502E1 locus and risk of hepatocellular carcinoma. *Gut.*, v.39, p. 330-3, 1996.
- LAMERDIN, J. E., MONTGOMERY, M. A., STILWAGEN, S. A., SCHEIDECKER, L. K., TEBBS, R. S., BROOKMAN, K. W., THOMPSON, L. H., CARRANO, A. V. Genomic sequence comparison of the human and mouse XRCC1 DNA repair gene regions. *Genomics*, v.25, p. 547-54, 1995.
- LANG, M., PELKONEN, O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. In: Ryder, W. **Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer**. IARC Scientific Publications, 148.Lyon, 1999. p. 13-22.

- LEAR, J. T., HEAGERTY, A. H. M., SMITH, A., BOWERS B., PAYNE C. R., SMITH C. A., JONES P. W., GILFORD J., YENGI L., ALLDERSEA J., FRYER A. A., STRANGE R. C. Multiple cutaneous basal cell carcinomas: glutathione S-transferase (*GSTM1*, *GSTT1*) and cytochrome P450 (*CYP2D6*, *CYP1A1*) polymorphisms influence tumor number and accrual. *Carcinogenesis*, v.17, p.1891-6, 1996.
- LEE, J. M., LEE, Y. C., YANG, S. Y., YANG, P. W., LUH, S. P., LEE, C. J., CHEN, C. J., WU, M. T. Genetic polymorphism of XRCC1 and risk of esophageal cancer. *Int. J. Cancer*, v.95, p.240-6, 2001.
- LELBACH, W.K. Epidemiology of alcoholic liver diseases. In: Popper, H. and Schaffner, F. (eds.) **Progress in liver diseases**. Grune and Stratton, New York, pp. 494-515, 1976a.
- LELBACH, W.K. Epidemiology of alcoholic liver disease. *Progr.Liver Dis.*, v.5, p.494-515, 1976b.
- LEMARCHAND, L. L., SIVARAMAN, L., PIERCE, L., SEIFRIED, A., LUM, A., WILKENS, L. R., LAU, A. R. Associations of *CYP1A1*, *GSTM1*, and *CYP2E1* polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res.*, v.58, p.4858-63, 1998.
- LERMAN, C. & CROYLE, R. T. Genetic testing for cancer predisposition: behavioral science issues. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, v.17, p.63-6, 1995.
- LIEBER, C. S. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin. Chim. Acta*, v.257, p.59-84, 1997a.
- LIEBER, C. S. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Adv. Pharmacol.*, v.38, p.601-28, 1997b.

- LIESHOUT, E. M. M., PETERS, W. H. M. Age and gender dependent levels of glutathione and glutathione S-transferases in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, v.19, p.1873-5, 1998.
- LIN, H. L., HAN, C-Y., BERNSTEIN, D. A., HSIAO, W., LIN, B. K., HARDY, S. Ethnic distribution of the glutathione transferase Um 1-1 (*GSTM1*) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, v.15, p.1077-81, 1994.
- LIN, J. H., LU, A. Y. H. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.*, v.35, p. 361-90, 1998.
- LUCAS, D., MÉNEZ, C., FLOCH, F., GOURLAOUEN, Y., SPARFEL, O., JOANNET, I., BODÉNEZ, P., JEZEQUEL, J., GOUÉROU, H., BERTHOU, F., BARDOU, L-G., MÉNEZ, J-F. Cytochrome P4502E1 and P4501A1 genotypes and susceptibility to cirrhosis or upper aerodigestive tract cancer in alcoholic caucasians. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v.20, p.1033-7, 1996.
- LUNN, R. M., LANGLOIS, R. G., HSIEH, L. L., THOMPSON, C. L. AND BELL, D. A. XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res.*, v.59, p.2557-61, 1999.
- MA, L., HOEIJMAKERS, J. H, VAN DER EB, A. J. Mammalian nucleotide excision repair. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1242, p.137-63, 1995.
- MACLEOD, S., SINHA, R., KADLUBAR, F. F., LANG, N. P. Polymorphisms of *CYP1A1* and *GSTM1* influence the in vivo function of *CYP1A2*. *Mutat. Res.*, v.376, p.135-42, 1997.

- MALATS, N., CAMUS-RADON, A. M., NYBERG, F., AHRENS, W., CONSTANTINESCU, V., MUKERIA, A., BENHAMOU, S., BATURA-GABRYEL, H., BRUSKE-HOHLFELD, I., SIMONATO, L., MENEZES, A., LEA, S., LANG, M., BOFFETTA, P. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.9, p.827-33, 2000.
- MANNERVIK, B., ALIN, P., GUTHENBERG, C., JENSSON, H., TAHIR, M.K., WARHOLM, M., JORNVALL, H. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.82, p.7202-6, 1985.
- MARINTCHEV, A., MULLEN, M. A., MACIEJEWSKI, M. W., PAN, B., GRYK, M. R., MULLEN, G. P. Solution structure of the single-strand break repair protein XRCC1 N-terminal domain. *Nature Struct. Biol.*, v.6, p.884-93, 1999.
- MASSON, M. NIEDERGANG, C., SCHREIBER, V., MULLER, S., MENISSIER-DE MURCIA, J., DE MURCIA, G. XRCC1 is specifically associated with poli(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell Biol.*, v.18, p.3563-71, 1998.
- MATULLO, G., GUARRERA, S., CARTURAN, S., PELUSO, M., MALAVEILLE, C., DAVICO, L., PIAZZA, A., VINEIS, P. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int. J. Cancer*, v.92, p. 562-7, 2001
- MCBRIDE, O. W., UMENO, M., GELBOIN, H. V., GONZALEZ, F. J. A. *TaqI* polymorphism in the human P450IIE1 gene on chromosome 10 (CYP2E). *Nucleic Acids Res.*, v.15, p. 10071-75, 1987.

- MEYER, U. A. Genotype or phenotype: the definition of a pharmacogenetic polymorphism. *Pharmacogenetics*, v.1, p.66-7, 1991.
- MEYER, U. A., ZANGER, U. M. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.*, v.37, p.269-96, 1997.
- MOHRENWEISER, H. W., CARRANO, A. V., FERTITTA, A., PERRY, B., THOMPSON, L. H., TUCKER, J. I., WEBER, C. A. Refined mapping of the three DNA repair genes, ERCC1, ERCC2, and XRCC1, on human chromosome 19. *Cytogenet. Cell Genet.*, v.52, p. 11-4, 1989.
- MOHRENWEISER, H. W., JONES, I. M. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and populational risk estimation? *Mutat. Res.*, v.400, p.15-24, 1998.
- MOREIRA, A., MARTINS, G., MONTEIRO, M. J., ALVES, M., DIAS, J., DURO DA COSTA, J., MELO, M. J., MATIAS, D., COSTA, A., CRISTOVÃO, M., RUEFF, J., MONTEIRO, M. Glutathione S-transferase Mu polymorphism and susceptibility to lung cancer in the Portuguese population. *Teratog. Carcinog. Mutag.*, v.16, p.269-74, 1996.
- MORITA, S., YANO, M., SHIOZAKI, H., TSUJINAKA, T., EBISUI, C., MORIMOTO, T., KISHIBUTI, M., FUJITA, J., OGAWA, A., TANIGUCHI, M., INOUE, M., TAMURA, S., YAMAZAKI, K., KIKKAWA, N., MIZUNOYA, S., MONDEN, M. CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 polymorphisms are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagous. *Int. J. Cancer*, v.71, p.192-5, 1997.

- MORITA, S., YANO, M., TSUJINAKA, T., AKIYAMA, Y., TANIGUCHI, M., KANEKO, K., MIKI, H., FUJII, T., YOSHINO, K., KUSUOKA, H., MONDEN, M. *Int. J. Cancer*, v.80, p.685-8, 1999.
- MORIWAKI, S., RAY, S., TARONE, R.E., KRAEMER, K.H., GROSSMAN, L. The effect of donor age on the processing of UV-damaged DNA by cultured human cells: reduced DNA repair capacity and increased DNA mutability. *Mutat. Res.*, v.364, 117-23, 1996.
- MUÑOZ, V., VOLLRATH, V., VALLEJOS, M. P., MIQUEL, J. F., COVARRUBIAS, C., RADDATZ, A., CHIANALE, J. Genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP1A1 and CYP2E1 in the South-Amerindian population of Chile. *Pharmacogenetics*, v.8, p.343-51, 1998.
- MUIRAS, M.-L., VERASDONCK, P., COTTET, F., SCHÄCHTER, F. Lack of association between human longevity and genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes at the *NAT2*, *GSTM1* and *CYP2D6* loci. *Hum Genet*, v.102, p.526-32, 1998.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Committee on Biological Markers. *Environ. Health Perspect.*, v.74, p.3-9, 1997.
- NAVASUMRIT, P., WARD, T. H., DODD, J. F., O'CONNOR, P. J. Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented *in vivo* by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis*, v.21, 93-9, 2000.
- NEBERT, D. W. , GONZALEZ, F. J. P450 genes, structure, evolution, and regulation. *Ann. Ver. Biochem.*, v.56, p.945, 1987.
- NEBERT, D. W. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutat. Res.*, v.247, p.267-81, 1991.



- NEBERT D. W., MCKINNON, R. A., PUGA, A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol.*, v.15, p.273-80, 1996.
- NEBERT, D. W. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: What is their clinical relevance and why do they exist? *Am. J. Hum. Genet.*, v.60, p.265-71, 1997.
- NELSON, H. H., WEINCKE, J. K., CHRISTIANI, D. C., CHENG, T. J., ZUO, Z-F., SCHWARTZ, S., LEE, B-K., SPITZ, M. R., WANG, M., XU, X., KELSEY, K. T. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis*, v.16, p.1243-5, 1995.
- NIEHS SYMPOSIUM ON THE ENVIRONMENTAL GENOME PROJECT, 1997, October, p.17-18, 1997.
- NISHIMOTO, I. N., HANAOKA, T., SUGIMURA, H., NAGURA, K., IHARA, M., LI, X. J., ARAI, T., HAMADA, G. S., KOWALSKI, L. P., TSUGANE, S. Cytochrome P450 2E1 polymorphism in gastric cancer in Brazil: case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.9, p.675-80, 2000.
- NORDMANN, R., RIBIERE, C., ROUACH, H. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Radic. Biol. Med.*, v.12, p.219-40, 1992.
- OMENN, G. S. Future research directions in cancer ecogenetics. *Mutat. Res.*, v.247, p. 283-91, 1991.



- OUDE-OPHUIS, M. B., VAN LIESHOUT, M. M., ROELOFS, H. M., PETERS, W. H. M., MANNI, J. J. Glutathione S-transferases M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer*, v.82, p.936-43, 1997.
- PATENAUDE, A. F. The genetic testing of children for cancer susceptibility: ethical, legal, and social issues. *Behav. Sci. Law*, v.14, p.393-410, 1996.
- PEMBLE, S., SCHROEDER, K. R., SPENCER, S.R., MEYER, D. J., HALLIER, E., BOLT, H. M., KETTERER, B., TAYLOR, J. B. Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*) cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.*, v.300, p.271-6, 1994.
- PERERA, F.P. Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assesment, and prevention. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.88, p.496-509, 1996.
- PERERA, F. P. Environment and cancer: who are susceptible? *Science*, v.278, p.1068-73, 1997.
- PERERA, F. P., WEINSTEIN, I. B. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis*, v.21: p.517-24, 2000.
- PERSSON, I., JOHANSSON, T., BERGLING, H., DAHL, M. L., SEIDEGARD, J., RYLANDER, R., RANNUG, A., HÖBERG, J., SUNDBERG, M. I. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. *FEBS Lett.*, v.319, p. 207-11, 1993.

- PERSSON, I. JOHANSSON, T., BERGLING, H., MARJA-LIISA, D., SEIDEGAD, J., INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1: regulation and toxicological significance. *JOEM*, v.7, p.25-36, 1995.
- PERSSON, I., JOHANSSON, I., LOU, Y-C., YUE, Q-Y., DUAN, L-S., BERTILSSON, L., INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes among Chinese lung cancer patients. *Int. J. Cancer*, v.81, p.325-9, 1999.
- PICKETT, C. B., LU, A. Y. H. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu. Rev. Biochem.*, v.58, p.743-64, 1999.
- PIRMOHAMED, M., KITTINGHAM, N. R., QUEST, L. J., ALLOT, R. L., GREEN, V. J., GILMORE, I. T., PARK, B. K. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 and risk of alcoholic liver disease in Caucasians. *Pharmacogenetics*, v. 5, p. 351-7, 1995.
- PONDER, B. A. J. Inherited predisposition to cancer. *TIG*, v. 6, p. 213-8, 1990.
- QUINONES, L., BERTHOUS, F., VARELA, N., SIMON, B., GIL, L., LUCAS, D. Ethnic susceptibility to lung cancer: differences in CYP2E1, CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms between French Caucasian and Chilean populations. *Cancer Lett.*, v.141, p.167-71, 1999.
- RANNUG, A., ALEXANDRIE, A-K., PERSSON, I., INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphism of cytochromes p450 1A1, 2D6 and 2E1: Regulation and toxicological significance. *JOEM*, v.37, p.25-36, 1995.



- RATNASINGHE, D., YAO, S. X., TANGREA, J. A., QIAO, Y. L., ANDERSEN, M. R., BARRETT, M. J., GIFFEN, C. A., EROZAN, Y., TOCKMAN, M. S., TAYLOR, P. R. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.10, p.119-23, 2001.
- RAUNIO, H., HUSGAFVEL-PURSIAINEN, H., ANTILLA, S., HIETANEN, E., HIRVONEN, A., PELKONEN, O. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility - a review. *Gene*, v.159, p.113-21, 1995.
- RENAN, M. J. Is there a lung-cancer susceptibility gene? *Int. J. Cancer*, v.74, p.359-61, 1997.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. K. C., SANTOS, E. J. M., GUERREIRO, J. F., SANTOS, S. E. B. Demographic and genetic structure of the population of Castanhal, in the Amazon region of Brazil. *Rev. Brazil. Genet.*, v.18, p.469-74, 1995.
- RICE, P.A. Holding DNA damage together. *Nature Struct. Biol.*, v.6, 805-6, 1999.
- ROGERS, A. S. The role of cytochrome P450 in developmental pharmacology. *J. Adolescent Health*, v.15, p.635-40, 1994.
- ROSSIT, A. R. B., CABRAL, I. R., HAMEL, A., CARARETO, C. M. A., HACKEL, C., CONFORTI-FROES, N. D. T. Genetic polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes in two distinct Brazilian populations with distinct ethnic composition. In: Anais do V CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENÊSE E TERATOGENÊSE AMBIENTAL, Gramado, 2001.

- RUSHMORE, T. H., PICKETT, C. B. Glutathione-S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *J. Biol. Chem.*, v.268, p.11475-503, 1993.
- SAADAT, I., SAADAT, M. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes and the risk of gastric and colorectal cancer. *Cancer Lett.*, v.169: 21-6, 2001.
- SAIKI, R. F., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G. T., MULLIS K. B., ERLICH H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v.239, p.487-91, 1988.
- SALAMA, S. S., ABDEL-RAHMAN, S. Z., SIERRA-TORRES, C. H., HAMADA, F. A., AU, W. W. Role of polymorphic GSTM1 and GSTT1 genotypes on NNK-induced genotoxicity. *Pharmacogenetics*, v.9, p.735-43, 1999.
- SALZANO, F. M., FREIRE-MAIA, N. **Populações brasileiras: aspectos demográficos, genéticos e antropológicos.** São Paulo, EDUSP, 1967. 177 p.
- SANCAR, A. DNA repair in humans. *Annu. Rev. Genetics*, v.29, p.69-105, 1995.
- SANTOS, S. E. B., GUERREIRO, J. F. The indigenous contribution to the formation of the population of the Brazilian Amazon region. *Rev Brasil Genet.*, v.2, p.311-5, 1995.
- SANTOS, E. J. M. L., RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. K. C., GUERREIRO, J. F., AGUIAR, G. F. S., SANTOS, S. E. B. Migration and ethnic change in an admixed population from the Amazon region (Santarém, Pará). *Rev. Brazil. Genet.*, v.3, p.511-5, 1996.

- SANTOS, F. R., PANDYA, A., TYLER-SMITH, C., PENA, S. D., SCHANFIELD, M., LEONARD, W. R., OSIPOVA, L., CRAWFORD, M. H., MITCHELL, R. J. The central Siberian origin for native American Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.*, v.64, p.619-28, 1999.
- SAVOLAINEN, V. T., PAJARINEN, J., PEROLA, M., PENTILLA, A., KARHUNEN, P. J. Polymorphisms in the cytochrome P450 2E1 gene and the risk of alcoholic liver disease. *J. Hepatol.*, v.26, p.55-61, 1997.
- SETIAWAN, V. W., ZHANG, Z. F., YU, G. P., LI, Y. L., LU, M. L., TSAI, C. J., CORDOVA, D., WANG, M. R., GUO, C. H., YU, S. Z., KURTZ, R. C. GSTT1 and GSTM1 null genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study in a Chinese population. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 9, p. 73-80, 2000.
- SHEN, M. R., JONES, L. M., MOHRENWEISER, H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.*, v.58, p.604-8, 1998.
- SHEN, M. R., XU, Y., QIAN, Y., YU, R., QIN, Y., ZHOU, L., WANG, X., SPITZ, M. R., WEI, Q. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int. J. Cancer*, v.88, p.601-6, 2000.
- SHI, C. Y., SEOW, A., LIN, Y., CHIA, K. S., ONG, C. N., CHAN, S. H., LEE, H. P. Biomarkers: a molecular approach to cancer epidemiology. *Ann. Acad. Med. Singapore*, v.25, p.49-54, 1996.
- SHIELDS, P. G. Pharmacogenetics: Detecting sensitive populations. *Environ. Health Perspect.*, v.102, p.81-87, 1994.
- SCHORK, N. J., CARDON, L. R., XU, X. The future of genetic epidemiology. *TIG*, v. 14, p.266-72, 1998.

- SINGHAL, R. K., WILSON, S.H. Short gap-filling synthesis by DNA polymerase beta is processive. *J. Biol. Chem.*, v.268, p. 15906-11, 1993.
- SINGHAL, R. K., PRASAD, R., WILSON, S. H. DNA polymerase beta conducts the gap-filling step in uracil-initiated base excision repair in a bovine testis nuclear extract. *J. Biol. Chem.*, v.270, p.949-57, 1995.
- SINHA, R. & CAPORASO, N. Diet, genetic susceptibility and human cancer etiology. *J. Nutr.*, v. 129, p. 556S-559S, 1999.
- SPITZ, M. R., BONDY, M. L. Genetic susceptibility to cancer. *Cancer*, v.72, p. 991-995, 1993.
- STEINHOFF, C., FRANKE, K. H., GOLKA, K., THIER, R., ROMER, H. C., ROTZEL, C., ACKERMAN, R., SCHULZ, W. A. Glutathione S-transferase isozyme genotypes in patients with prostate and bladder carcinoma. *Arch. Toxicol.*, v.74, p.521-6, 2000.
- STEPHENS, E. A., TAYLOR, J. A., KAPLAN, N., YANG, C-H., HSIEH, L. L., LUCIER, G. W., BELL, D. A. Ethnic variation in the *CYP2E1* gene, polymorphism analysis of 695 African-Americans, European Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics*, v.4, p.185-92, 1994.
- STERN, M. C., UMBACH, D. M., VAN GILS, C. H., LUNN, R. M., TAYLOR, J. A. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.10, p.125-31, 2001.
- STRANGE, R. C., FRYER, A. A. Chapter 19. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. In: Ryder, W. **Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer**. IARC Scientific Publications, 148. Lyon, 1999. Cap.19. p. 231-49.



- STURGIS, E. M., CASTILLO, E. J., LI, L., ZHENG, R., EICHER, S. A., CLAYMAN, G. L., STROM, S. S., SPITZ, M. R., WEI, Q. Polymorphisms of DNA repair gene *XRCC1* in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, v.20, p.2125-9, 1999.
- SUGIMURA, H., SUZUKI, I., IWASE, T., KIYOKAMA, E., KINO, I., TSUGANE, S. CYP1A1 and CYP2E1 polymorphisms and lung cancer, case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Pharmacogenetics*, v.5, p.S145-8, 1995.
- SUGIMURA, T. Nutrition and dietary carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v.21, p.387-395, 2000.
- SWEENEY, C., FARROW, D. C., SCHWARTZ, S. M., EATON, D. L., CHECKOWAY, H., VAUGHAN, T. L. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms as risk factors for renal cell carcinoma: a case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.9, p.449-54, 2000.
- SZABO, C. I., KING, M. C. Populations genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am. J. Hum. Genet.*, v.60, p.1013-20, 1997.
- TAIOLI, E., TRACHMAN, J., CHEN, X., TONIOLO, P., GARTE, S. J. A CYP1A1 restriction fragment lenght polymorphism is associated with breast cancer in African-American women. *Cancer Res.*, v.55, p.3757-8, 1995.
- TAN, K. L., WEBB, G. C., BAKER, G. C., BOARD, P. G. Molecular cloning of a cDNA and chromosomal localization of a human theta class glutathione S-transferase gene (*GSTT2*) to chromosome 22. *Genomics*, v.25, p.381-7, 1995.

- TANINGHER, M., MALACARNE, D., IZZOTI, A., UGOLINI, D., PARODI, S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat. Res.*, v.436, v.227-61, 1999.
- TAYLOR, R. M., MOORE, D. J., WHITEHOUSE, J., JOHNSON, P., CALDECOTT, K. W. A cell cycle-specific requirement for the XRCC1 BRCT II domain during mammalian DNA strand break repair. *Mol. Cell Biol.*, v.20, p. 735-40, 2000.
- TEBBS, R. S., FLANNERY, M. L., MENESES, J. J., HARTMANN, A., TUCKER, J. D., THOMPSON, L. H., CLEAVER, J. E., PEDERSEN, R. A. Requirement for the *xrcc1* DNA base excision repair gene during early mouse development. *Dev. Biol.*, v.208, p. 513-29, 1999.
- THOMPSON, L. H., BROOKMAN, K. W., MINKLER, J. L., FUSCOE, J. C., HENNING, A., CARRANO, A. C. Mediated transfer of human DNA repair gene that controls sister chromatid exchange. *Mol. Cell Biol.*, v.5, p.881-4, 1985.
- THOMPSON, L. H., BROOKMAN, K. W., JONES, N. J., ALLEN, S. A., CARRANO, A.V. Molecular cloning of the human *XRCC1*, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol. Cell Biol.*, v.10, p.6160-71, 1990.
- THOMPSON, L. H., WEST, M. G. *XRCC1* keeps DNA from getting stranded. *Mutation Res.*, v.459, p.1-18, 2000.
- THORNTON, K. H., KRISHNAN, V. V., WEST, M. G., POPHAM, J., RAMIREZ, M., THELEN, M. P., COSMAN, M. Expression, purification, and biophysical characterization of the BRCT domain of human DNA ligase III alpha. *Protein Expr. Purif.*, v.21, p.401-11, 2001.
- TLSTY, T. D., BRIOT, A., GUALBERTO, A., HALL, S., HESS, S., HIXON, M., KUPPUSWAMY, D., ROMANOV, SAGE, M., WHITE, A. Genomic instability and cancer. *Mutat. Res.*, v.337, p.1-7, 1995.

- TOMATIS, L., HUFF, J., HERTS-PICCIOTO, I., SANDLER, D. P., BUCHER, J., BOFFETTA, P., AXELSON, O., BLAIR, A., STAYNER, L., BARRETT, J. C. Avoided and avoidable risks of cancer. *Carcinogenesis*, v.18, p.97-105, 1997.
- TOPINKA, J., BINKOVA, B., MRACKOVA, G., STAVKOVA, Z., BENES, I., DEJMEK, J., LENICEK, J., SRAM, R.J. DNA adducts in human placenta as related to air pollution and to *GSTM1* genotype. *Mutat. Res.*, v.390, p.59-68, 1997.
- TRUCCO, C., ROLLI, V., OLIVER, F. J., FLATTER, E., MASSON, M., DANTZER, F., NIEDERGANG, C., DUTRILLAUX, B., MENISSIER-DE MURCIA, J., DE MURCIA, G. A dual approach in the study of poly(ADP-ribose) polymerase: *in vitro* random mutagenesis and generation of deficient mice. *Mol. Cell Biochem.*, v.193, p.53-60, 1999.
- TSUTSUMI, M., WANG, J-S., TAKASE, S., TAKADA, A. Hepatic messenger RNA contents of cytochrome P4502E1 in patients with different P4502E1 genotypes. *Alcohol Alcohol*, v.29, p. 29-32, 1994a.
- TSUTSUMI, M., TAKADA, A., WANG, J-S. Genetic polymorphisms of cytochrome P4502E1 to the development of alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, v.107, p. 1430-5, 1994b.
- UEMATSU, F., KIKUCHI, H., MOTOMIYA, M., ABE, T., SAGAMI, I., OHMACHI, T., WAKUI, A., KANAMARU, R., WATANABE, M. Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to lung cancer. *Jpn J Cancer Res.*, v.82, p.254-6, 1991.
- UEMATSU, F., KIKUCHI, R., MOTOMIYA, M., ABE, T., ISHIOCA, C., KANAMARU, R., SAGAMI, I., WATANABE, R. Human cytochrome P450 IIE1 gene: Dra1 polymorphism and susceptibility to cancer. *Tohoku J. Exp. Med.*, v.168, p.113-17, 1992.

- UEMATSU F., IKAWA S., KIKUCHI H., SAGAMI I., KANAMARU R., ABE T., SATOH K., MOTOMIYA M., WATANABE M. Restriction fragment length polymorphism of the human *CYP2E1* (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure. *Pharmacogenetics*, v.4, p.58-62, 1994.
- UMENO, M., MCBRIDE, O., YANG, C., GELBOIN, H., GONZALEZ, F. Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry*, v.27, p.9006-13., 1988.
- VAN POPPEL, G., DE VOGEL, N., VAN BLADEREN, P.J., KOK, F.J. Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme mu. *Carcinogenesis*, v.13, p.303-5, 1992.
- VENNIT, S. Mechanisms of spontaneous human cancers. *Environ. Health Perspect.*, v.104, p.633-7, 1996.
- VILLARD, P.-H., SEREE, E. M., RE, J.-L., MEO, M. D., BARRA, Y., ATTOLINI, L., DUMENIL, G., CATALIN, J., DURAND, A., LACARELLE, B. Effects of tobacco smoke on the gene expression of the Cyp1a, Cyp2b, and CYP3a subfamilies in mouse liver and lung: relation to single strand breaks of DNA. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.148, p.195-204, 1998.
- VINEIS, P. Interactions between genetics and environmental exposures: the example of cancer. *Epid. Prev.*, v.19, p.79-81, 1995.
- VINEIS, P. & MALATS, N. Strategic issues in the design and interpretation of studies on metabolic polymorphisms and cancer. In: **Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer**. IARC Scientific publications, 148. Lyon, 1999. pp. 51-61.

- VINEIS, P., D'ERRICO, A., MALATS, N., BOFFETTA, P. Overall evaluation and research perspectives. In: **Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer**. IARC Scientific publications, 148. Lyon, 1999. pp. 403-408.
- WALKER, C. L. Cancer susceptibility genes and molecular carcinogenesis. American Association for Cancer Research Special Conference: Cancer Susceptibility Genes and Molecular Carcinogenesis. *Mol. Med. Today*, v.2, p.364-5, 1996.
- WANG, S. L., LEE, H., CHEN, K. W., TSAI, K. J., CHEN, C. Y., LIN, P. Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and lung cancer in a Taiwanese population. *Lung Cancer*, v.26, p.27-34, 1999.
- WARHOLM, M., RANNE, A., ALEXANDRIE, A., K., MONAGHAN, G., RANNUG, A. Genotypic and phenotypic determination of polymorphic glutathione transferase T1 in a Swedish population. *Pharmacogenetics*, v. 5, p.252-4, 1995.
- WATANABE, J., HAYASHI, S-I., NAKACHI, K., IMAI, K., SUDA, Y., SEKINE, T., KAWAJIRI, K. *Pst*1 and *Rsa*1 RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene. *Nucleic Acids Res.*, v.18, p.7194, 1990.
- WATANABE, J., YANG, J-P., EGUCHI, HAYASHI, S-C., IMAI, K., NAKACHI, K., KAWAJIRI, K. An *Rsa*1 polymorphism in the CYP2E1 gene does not affect lung cancer risk in a Japanese population. *Jpn J Cancer Res.*, v.86, p.245-8, 1995.
- WEI, Q., MATANOSKI, G.M., FARMER, E.R., HEDAYATI, M.A., GROSSMAN, L. DNA repair and aging in basal cell carcinoma: a molecular epidemiology study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.90, p.1614-8, 1993.

- WEI, Q. Effect of aging on DNA repair and skin carcinogenesis: a minireview of population-based studies. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, v.3, p.19-22, 1998.
- WEINBERG, R. A. The integration of molecular genetics into cancer management. *Cancer*, v. 70, p. 1653-58, 1992.
- WEINBERG, R. A. How Cancer Arises. *Scien. American*, v.275, p.62-70, 1996.
- WIDERSTEN, M., PEARSON, W. R., ENGSTROM, A., MANNERVIK, B. Heterologous expression of the allelic variant Mu-class glutathione transferases μ and ψ . *Biochem. J.*, v.276, p.519-24, 1991.
- WILD, C. P., KLEIHUES, P. Etiology of cancer in human and animals. *Exp. Toxicol. Patol.*, v.48, p.95-100, 1996.
- WOGAN, G. N. Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention: recent progress and avenues for future research. *Environ. Health Perspect.*, v.98, p. 167-78, 1992.
- WOLF, C. R. Cytochrome P-450s: polymorphic multigene families involved in carcinogen activation. *TIG*, 209-14, 1986.
- WONG, N.A., RAE, F., SIMPSON, K. J., MURRAY, G. D., HARRISON, D. J. Genetic polymorphisms of cytochrome P4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta-analysis. *Mol. Pathol.*, v.53, p.88-93, 2000.
- WOODSON, K., RATNASINGHE, D., BHAT, N.K., STEWART, C., TANGREA, J.A., HARTMAN, T.J., STOLZENBERG-SOLOMON, R., VIRTAMO, J., TAYLOR, P.R., ALBANES, D. Prevalence of disease-related DNA polymorphisms among participants in a large cancer prevention trial. *European J. Cancer Prev.*, v.8, p.441-7, 1999.



- 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. Rev. Toxicol.*, v.29, p.59-124, 1999.
- WU, X., SHI, H., JIANG, H., KEMP, B., HONG, W. K., DELCLOS, G. L., SPITZ, M. R. Associations between cytochrome *P4502E1* genotype, mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis*, v.18, p. 967-73, 1997.
- WU, X., AMOS, C. I., KEMP, H. S., JIANG, H., WAN, Y., SPITZ, M. R. Cytochrome P450 2E1 *Dra1* polymorphisms in lung cancer in minority populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.7, p.13-8, 1998.
- YU, M-W., GLADEK-YARBOROUGH, A., CHIAMPRASERT, S., SANTELLA, R. M., LIAW, Y-F., CHEN, C-J. Cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase polymorphism and susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, v.109, p.1266-73, 1995.
- YUSPA, S. H. Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis*, v.21, p.341-4, 2000.

ROSSIT, A. R. B. *Investigação molecular de polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos e ao reparo do DNA em populações brasileiras*. São José do Rio Preto, 2001. 181p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

No presente estudo investigou-se, por PCR-RFLP, a distribuição de polimorfismos nos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1* em duas populações brasileiras miscigenadas, provenientes, respectivamente, da região Norte (Pará; n=174) e região Sudeste do país (São Paulo; n=314). Adicionalmente, investigou-se dois polimorfismos no gene *XRCC1* em portadores de cirrose alcoólica no Sudeste do Brasil (n=97) e respectivos controles (n=96). As freqüências dos alelos *CYP2E1* raros e sua combinação haplotípica foram mais elevadas na região Norte (*5B: 0,092; *6: 0,158; *5B/*6: 0,089) que no Sudeste (*5B: 0,06; *6: 0,116; *5B/*6: 0,049). Não se detectou diferenças nas freqüências dos genótipos nulos para os genes *GSTT1* (0,18) e *GSTM1* (0,47). No gene *XRCC1*, o alelo *194Trp* mostrou-se menos freqüente entre os brancos (0,06) que nos mestiços (0,12), enquanto a freqüência do alelo *399Gln* revelou-se mais elevada nos brancos (0,37) que nos mestiços (0,22). Detectou-se ainda, um aumento no risco relativo de cirrose hepática, associado ao alelo *399Gln*, sendo tal associação mais evidente entre os mestiços (OR= 2,79) e entre indivíduos com idades superiores a 45 anos (OR= 2,74). Nenhuma associação foi observada entre o polimorfismo *194Trp* e o risco dessa doença. Os dados obtidos evidenciam que o polimorfismo *399Gln* do gene *XRCC1* pode ser um modulador de risco para a suscetibilidade à cirrose alcoólica.

Palavras-chave: Polimorfismos genéticos; Citocromo P450; Glutatião-S-transferases; Reparo de DNA; *XRCC1*; Cirrose alcoólica.



ROSSIT, A. R. B. *Molecular investigation of genetic polymorphisms of xenobiotic-metabolizing and DNA repair enzymes in Brazilian populations*. São José do Rio Preto, 2001. 181p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

We investigated, by PCR-RFLP, the distribution of the *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* polymorphic alleles in two mixed Brazilian populations (Pará, North region; n=174 and São Paulo; Southeastern region; n=314). In addition, we tested the hypothesis that two polymorphisms in the *XRCC1* gene are associated with increased risk of alcoholic liver cirrhosis in Southeastern Brazilian patients (n=97) and controls (n=96). The *CYP2E1* rare allele frequencies and haplotypic combination were higher in the Northern (*5B: 0.092; *6: 0.158; *5B/*6: 0.089) compared to the Southeastern population (*5B: 0.06; *6: 0.116; *5B/*6: 0.049). The deletion polymorphism frequencies for the *GSTT1* (0.18) and *GSTM1* (0.47) genes showed no differences between both populations. Regarding to the *XRCC1* gene, the 194Trp allelic frequency was lower in Whites (0.06) compared to Mestizos (0.12), whereas the 399G/n allelic frequency was higher in Whites (0.37) compared to Mestizos (0.22). We also detected an increase in the relative risk of liver cirrhosis associated with the 399G/n allele. This risk was higher among Mestizos (OR= 2.79) and among individuals over the age of 45 years (OR= 2.74). No association was observed between the *XRCC1* 194Trp polymorphism and risk of liver cirrhosis. Our results indicate that the *XRCC1* 399G/n polymorphism may be a significant risk modifier for alcoholic liver cirrhosis.

Keywords: Genetic polymorphisms; Cytochrome P450; Glutathione-S-transferases; DNA repair; XRCC1; Liver cirrhosis.

Autorizo a reprodução em fotocópia deste trabalho.

São José do Rio Preto, outubro de 2001.

Andréa Regina Baptista Rossit



